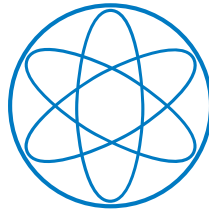


PHYSIK-DEPARTMENT



**Modellsystemstudien und Methoden
zur Probenherstellung für die
Kristallisation komplexer DNA-Objekte**

Dissertation

von

Evi Stahl



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Physik Department der Technischen Universität München
Labor für Biomolekulare Nanotechnologie

Modellsystemstudien und Methoden zur Probenherstellung für die
Kristallisation komplexer DNA-Objekte

Evi Stahl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Hendrik Dietz

2. Univ.-Prof. Dr. Friedrich Simmel

Die Dissertation wurde am 7. November 2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 25. November 2016 angenommen.

Abstract

One key goal of DNA nanotechnology is the creation of macroscopic crystals from complex DNA objects. Beyond their potential usefulness for positioning guest molecules in a three dimensional lattice, such crystalline structures could open the doors to X-ray diffraction analysis, which may provide structural feedback on designed DNA objects with atomic resolution. In 2009, Seeman and coworkers used triangle motifs to build the first designed DNA crystal exclusively basing on Watson-Crick base pair interactions. Despite this important breakthrough seven years ago and the progress that has been made in this field of research since then, the crystallization of larger DNA objects like DNA origami structures still remains an unachieved goal. Dedicated to this goal, this thesis investigates obstacles that need to be overcome towards crystallization and presents methods to provide enough sample material to follow this path experimentally.

In the first part of this thesis, the described DNA triangle motif was used as a model system to study the impact of sample heterogeneity and lattice bond strength on crystallization in a rational approach. Results of this model system study showed that crystallization of the DNA triangle was remarkably robust in various types of heterogeneous sample mixtures, as long as the solutions contained sufficient correctly assembled material to crystallize. Changes in the triangle's base composition in the position next to the dangling ends, however, drastically changed the outcome of crystallization assays. These results helped to identify the design of objects with sufficiently weak interactions as a key criterion for crystallization, while heterogeneity in self assembly reaction products seems to play a minor role.

Generating supersaturated DNA origami samples for crystallization assays represents a preparative challenge that was addressed in the second part of this thesis. With PEG-based precipitation of DNA objects and optionally, their subsequent sedimentation via ultracentrifugation, two approaches for the preparation of pure and highly concentrated samples were established and characterized. These techniques allowed the preparation of reaction mixtures at a 20 ml scale with sample yields higher than 90 % and provided a strategy to obtain several milligrams of dried DNA origami material that contained fully intact structures, as verified after redissolving the sample.

These highly concentrated DNA origami samples were used in first crystallization assays. Although these initial trials have not led to macroscopic crystals yet, they provide, together with insights gained from the model system study, valid starting points for further systematic studies, which are, thanks to the established preparation techniques, realizable at an extensive scale.

Zusammenfassung

Ein Schlüsselziel der DNA-Nanotechnologie ist die Konstruktion makroskopischer Kristalle aus komplexen DNA-Objekten. Derartige kristalline Strukturen könnten nicht nur für die Positionierung von Gastmolekülen von Interesse sein, sondern würden auch den Zugang zur Röntgenstrukturanalyse schaffen, mit der atomar aufgelöste Strukturinformationen über die entworfenen DNA-Objekte ermittelt werden könnten. Seeman und Mitarbeiter stellten 2009 den ersten designten DNA-Kristall vor, dessen Gitter sich aus DNA-Dreiecksmotiven zusammensetzt und ausschließlich auf Watson-Crick-Basenpaarinteraktionen basiert. Trotz dieses wichtigen Durchbruchs vor sieben Jahren und der seitherigen Entwicklung des Forschungsfeldes, bleibt die Kristallisation größerer DNA-Objekte, wie der DNA-Origami-Strukturen, bislang ein unerreichtes Ziel. Die vorliegende Arbeit ist diesem Ziel gewidmet und adressiert zum einen die Fragestellung, welche Hürden es sind, die auf dem Weg zur Kristallisation komplexer DNA-Objekte überwunden werden müssen, und beleuchtet zum anderen, wie es gelingen kann ausreichend Probenmaterial an DNA-Origami-Objekten zur Verfügung zu stellen, um diesen Weg zu beschreiten.

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde das beschriebene DNA-Dreieck als Modellsystem genutzt, um in einem rationalen Ansatz zu untersuchen, inwiefern das Kristallisationsvermögen von DNA-Objekten durch ihre Interaktionsstärke und die Heterogenität der Assemblierungsprodukte beeinflusst wird. Die Modellsystemstudien zeigten, dass die Kristallisation des DNA-Dreiecks auch in heterogenen Probengemischen erstaunlich robust ablief, sofern ausreichend korrekt gefaltetes Material vorhanden war. Eine Veränderung der Dreiecke an Position der Nachbarbasen zu den Sticky Ends hatte hingegen drastischen Einfluss auf ihr Kristallisationsvermögen. Diese Ergebnisse identifizieren das Design von DNA-Origami-Objekten mit ausreichend schwachen Interaktionen als wichtiges Kriterium für die Kristallisation, während die Heterogenität der Proben eine weniger wichtige Rolle zu spielen scheint.

Übersättigte DNA-Origami-Proben für Kristallisationsansätze zu erzeugen stellt eine präparative Herausforderung dar, die im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit adressiert wurde. Die PEG-basierte Fällung von DNA-Origami-Objekten sowie ihre Sedimentation mittels Ultrazentrifugation wurden als Präparationsverfahren für die Herstellung hochkonzentrierter Probenlösungen etabliert und charakterisiert. Die Methoden ermöglichten die Präparation von Faltungsansätzen im 20 ml-Maßstab mit Probenausbeuten über 90 % und erlaubten die Herstellung mehrerer Milligramm an trockenem, DNA-Origami-haltigem Material, das in wieder gelöster Form völlig intakte Strukturen enthielt.

Mit diesen hochkonzentrierten Proben an DNA-Origami-Objekten wurden erste Kristallisationsansätze durchgeführt. Wenngleich diese Startversuche noch keine makroskopischen Kristalle lieferten, zeigen sie zusammen mit den Erkenntnissen aus den Modellsystemstudien einige valide Ansatzpunkte auf, deren systematische Weiterverfolgung vielversprechend und dank der neuen Präparationsmethoden in extensivem Umfang möglich ist.

Liste der Publikationen

Stahl, E., Praetorius, F., de Oliveira Mann, C. C., Hopfner, K.-P., and Dietz, H. **Impact of Heterogeneity and Lattice Bond Strength on DNA Triangle Crystal Growth.** *ACS Nano*, **2016**, *10* (10), pp 9156–9164.

Cui, H., Seubert, B., Stahl, E., Dietz, H., Reuning, U., Moreno-Leon, L., Ilie, M., Hofman, P., Nagase, H., Mari, B. and Krüger, A. **Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes.** *Oncogene*, **2015**, *34* (28), pp 3640–3650.

Stahl, E., Martin, T.G., Praetorius, F., and Dietz, H. **Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions.** *Angewandte Chemie*, **2014**, *126* (47), pp 12949–12954.

Eingereichte Artikel

Wagenbauer, K.F., Engelhardt, F.A.S., Stahl, E., Hecht, V.K., Stömmel, P., Seebacher, F., Meregalli, L., Ketterer, P., Gerling, T., Dietz, H. **How we make DNA origami at preparative scales with application-ready quality.**

Oberhofer, A., Zimmermann, D., Rosenfeld, Y., Stahl, E., Mueller-Planitz, F., Schliwa, M., Dietz, H., and Ökten, Z. **Phosphorylation of melanophilin by PKA provides a mechanistic link between the actin and microtubule transport systems.**

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Zielsetzung	1
2	Einleitung	5
2.1	DNA-Nanotechnologie	5
2.1.1	DNA-Origami-Objekte als Präzisionswerkzeuge	6
2.1.2	Strukturinformation zu DNA-Origami-Objekten	6
2.1.3	Assemblierungen höherer Ordnung	8
2.2	Kristalline DNA-Netzwerke	8
2.2.1	Das DNA-Tensegrity-Dreieck	8
2.2.2	Andere DNA-Matrizes	12
2.3	Makromolekulare Kristallisation	14
2.3.1	Nukleation	15
2.3.2	Wachstum	17
3	Kristallisation des DNA-Dreiecks	21
3.1	Charakterisierung des Modellsystems	21
3.1.1	Versuchsbedingungen	21
3.1.2	Bildung und Kristallisation des DNA-Dreiecks	22
3.2	Stöchiometrie der Stränge	23
3.3	Kristallisation in Gegenwart von DNA-Verunreinigungen	25
3.3.1	Proteinverunreinigungen	28
3.4	Vergleich der G- und GA-Varianten	30
3.5	Stärke der Sticky-End-Interaktion	32
3.5.1	Puffer I	32
3.5.2	Vergleich von Puffer I und II	36
3.5.3	Temperaturstabilität der Kristalle	36
3.6	Ausblick: Weitere Modellsystemstudien	37
3.7	Zusammenfassung von Kapitel 3	39
4	Kristallisation in heterogenen Gemischen	41
4.1	Versuchsdurchführung	42
4.1.1	Weiterführende Charakterisierung	44
4.2	Einfluss der einzelnen Modifikationen	47

4.2.1	Strangverkürzungen	47
4.2.2	Basenfehlpaarungen	49
4.2.3	Basenpaarinsertionen und -deletionen	51
4.2.4	Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen	57
4.2.5	Ausstülpungen durch Einzelstrangdeletionen	63
4.3	Zusammenfassung und Überblick	69
4.3.1	Kristallisierende Modifikationen	69
4.3.2	Tolerierte Modifikationen	72
4.3.3	Inhibierende Modifikationen	72
4.4	Vergleich von Puffer I und II	73
4.4.1	Generelle Unterschiede	74
4.4.2	Spezielle Unterschiede	74
4.5	Stärkere Sticky-End-Interaktionen	76
4.6	Zusammenfassung von Kapitel 4	79
5	Herstellung dichter DNA-Origami-Lösungen	81
5.1	Aufreinigung und Aufkonzentration durch PEG-Fällung	82
5.1.1	Optimierung der PEG-Aufreinigung	82
5.1.2	Charakterisierung der PEG-Fällungsmethode	84
5.1.3	Herstellung hochkonzentrierter Proben	89
5.1.4	Ausblick: Lösungsmittelstabilität von DNA-Origami-Objekten	93
5.2	Ultrazentrifugation	94
5.2.1	Charakterisierung	95
5.2.2	Herstellung PEG-freier und hochkonzentrierter Proben	96
5.3	Zusammenfassung von Kapitel 5	98
6	Erste Kristallisationsansätze mit DNA-Origami-Objekten	99
6.1	Hohe Probenkonzentration	100
6.2	Ansätze mit DNA-kondensierenden Additiven	102
6.3	Zusammenfassung von Kapitel 6	105
7	Diskussion	109
7.1	Einsichten aus den Modellsystemstudien	109
7.1.1	Vergleichbarkeit der Systeme	109
7.1.2	Erkenntnisse zur Probenpräparation	111
7.1.3	Einsichten für Designs weiterer DNA-Origami-Strukturen	115
7.2	Herstellung und Kristallisation von DNA-Origami-Proben	120
7.3	Kristallisationsstudien mit dem DNA-Dreieck	123
8	Ausblick	125

Literaturverzeichnis	126
A Ergänzende Daten	145
A.1 Einfluss der Interaktionsstärke und der Temperatur	145
A.2 Kristallisation in heterogenen Gemischen	148
A.3 Faltungsanalyse der 100-Helixbündel-Objekte	153
B Material und Methoden	155
B.1 Puffer	155
B.1.1 Probenpuffer für DNA-Origami-Objekte	155
B.1.2 Kristallisationspuffer in Ansätzen mit DNA-Dreiecken	156
B.1.3 Kristallisationspuffer in Ansätzen mit DNA-Origami-Objekten	157
B.2 Material	157
B.2.1 Oligonukleotide	157
B.2.2 Zirkuläre Templatstränge	158
B.2.3 Chemikalien	158
B.3 Methoden	158
B.3.1 Herstellung von DNA-Origami-Objekten	158
B.3.2 Ansetzen der Probengemische für die Kristallisation	159
B.3.3 Ansetzen der Kristallisationstropfen	161
B.3.4 Auswertung der Tropfen	162
B.3.5 Gelelektrophorese	164
B.3.6 Negativkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie	165
B.3.7 PEG-Fällung	166
B.3.8 Ultrafiltration	166
B.3.9 Gelaufreinigung	167
B.3.10 Sedimentation mittels Ultrazentrifugation	167
B.3.11 Probenquantifizierung	168
C Sequenzen	169
C.1 DNA-Dreiecke	169
C.2 DNA-Origami-Objekte	173
C.2.1 Design und Sequenzen für das 24-Helixbündel	173
C.2.2 Design und Sequenzen für Varianten des 100-Helixbündels	175
Danksagung	175

Kapitel 1

Motivation und Zielsetzung

In lebenden Organismen sind Proteine die Träger einer unglaublichen Vielfalt an Funktionen. Beispielsweise bilden sie das Strukturgerüst, die Transportstrecken und Transportmotoren in der Zelle aus und spalten Bindungen, die ohne ihr Zutun eine Halbwertszeit von mehreren hunderttausend Jahren hätten [1]. Ferner lagern sich Proteine zu komplexen Maschinerien zusammen, passen ihre Aktivität der Umgebung an und agieren in komplexen Netzwerken, in denen Bildung, Abbau und Aktivität der Proteine reguliert sind, um den in der DNA kodierten Funktionsplan der Zelle zuverlässig auszuführen. Die Vielseitigkeit dieser molekularen Maschinen wird stets mit demselben Bauprinzip realisiert: die Sequenz einer Peptidkette, die aus den 22 proteinogenen Aminosäuren zusammengesetzt ist, bestimmt die dreidimensionale Struktur und damit Stabilität und Funktion eines Proteins. Der Großteil der Peptidkette ist hierbei ausschließlich daran beteiligt ein dreidimensionales Gerüst zu formen, in dem vergleichsweise wenige Aminosäurereste so arrangiert sind, dass sie eine funktionelle Region wie zum Beispiel eine spezifische Bindestelle oder ein katalytisch aktives Zentrum ausbilden.

Die künstliche Herstellung molekularer Nanoobjekte, die ähnlich komplexe Aufgaben erfüllen könnten, ist die Vision zahlreicher Forschungsfelder aus den Bereichen der Chemie, Biochemie, Biophysik und der Medizin. Die DNA-Nanotechnologie ist für die Erreichung dieses Ziels eine vielversprechende Strategie: Ähnlich wie Proteine basieren DNA-Nanoobjekte auf der Selbstassemblierung langkettiger Polymere mit definierten Sequenzen als Primärstrukturen, die sich zu dreidimensionalen Strukturen zusammenfinden (Abb. 1.1).

Im Gegensatz zu den komplexeren Interaktionsgefügen in Proteinen sind die Wechselwirkungen, die die Strukturbildung von DNA-Objekten bestimmen, gut genug verstanden, um die aus einer Sequenzkombination resultierende Form nicht nur berechnen, sondern gezielt konstruieren und variieren zu können [2,3]. Die programmierbare molekulare Selbstassemblierung ermöglicht die Herstellung benutzerdefiniert geformter Objekte im Nanometermaßstab. Ein Blick auf die Vielfalt der Proteinwelt lässt hoffen, dass das Potential des Bauprinzips *Selbstassemblierung aus definierten Polymerketten* in Zukunft auch die Herstellung dreidimensionaler Gerüste aus DNA ermöglichen wird, die ähnlich komplexe Funktionen wie Proteine ausführen könnten. DNA-Objekte könnten vielleicht eines Tages katalytisch aktive Zentren aus Nukleinsäuren und allen denkbaren chemischen Modifikationen synthetischer DNA bilden [4] oder als molekulare Maschinen fungieren, die dynamisch und spezifisch mit anderen Nanoobjekten interagieren [5]. Dieser Vision wird nicht zuletzt mit der Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2016 für die Entwicklung organischer Moleküle, die grundlegende Eigenschaften von molekularen Maschinen aufweisen, eine besondere Bedeutung beigemessen [6].

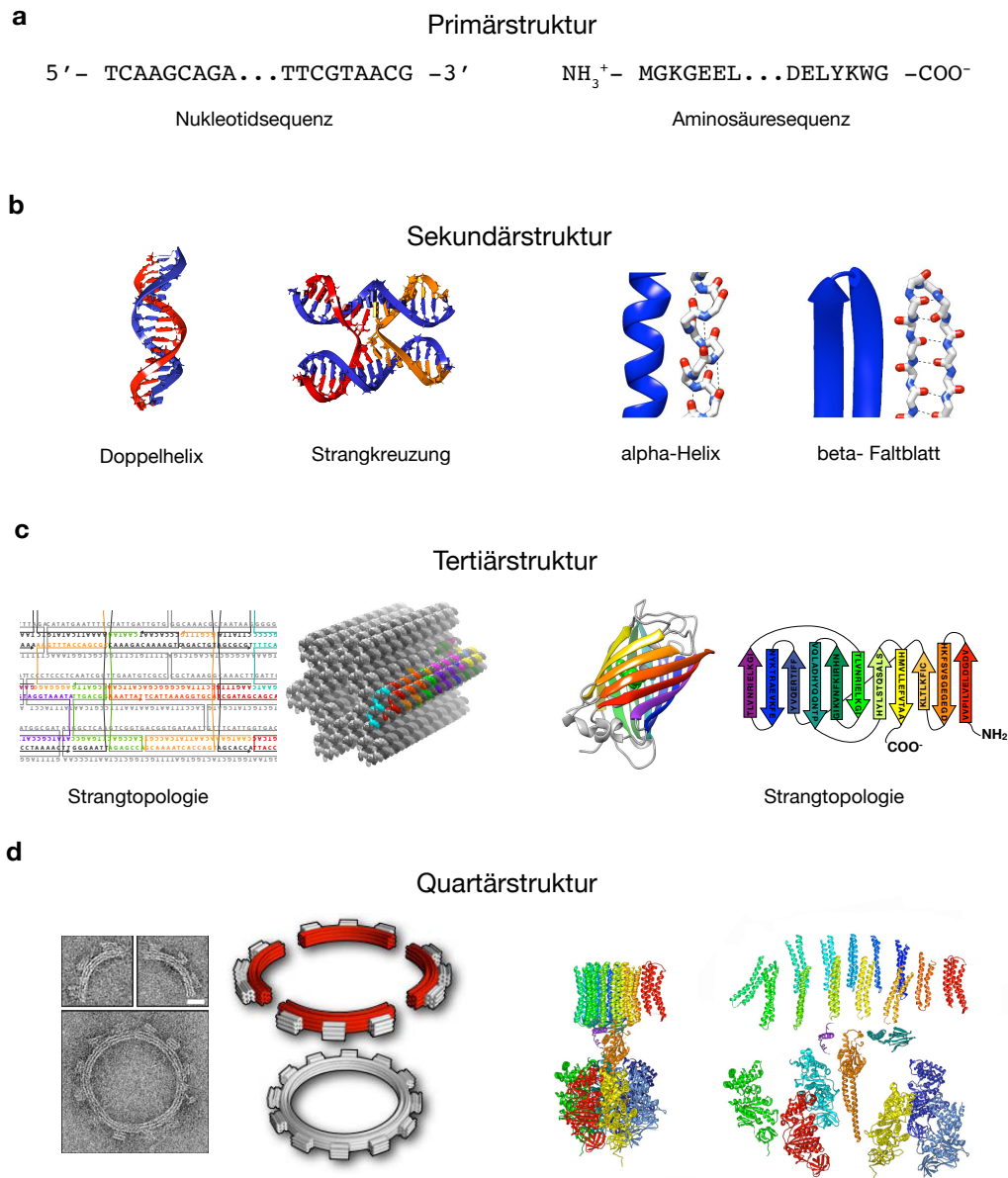


Abbildung 1.1 – Vergleich des strukturellen Aufbaus von DNA-Nanoobjekten und Proteinen. (a) Beide Makromoleküle sind kettenartige Polymere definierter Sequenz (Primärstruktur) aus Nukleotiden (links) oder Aminosäuren (rechts). (b) Die Kettenmoleküle bilden lokale strukturelle Motive in Abhängigkeit ihres sequenziellen Aufbaus aus (Sekundärstruktur). In DNA-Strukturen bilden sich Doppelhelixdomänen und Strangkrenzungen aus (links), in Proteinen führen Interaktionen entlang bzw. zwischen Abschnitten des Peptidrückgrats zur Ausbildung einer alpha-Helix bzw. eines beta-Faltblatts (rechts). (c) Die Gesamtheit aller lokalen Motive ordnet sich im dreidimensionalen Raum zu einer definierten Form mit bestimmter Strangtopologie an (Tertiärstruktur). Links: Bildausschnitt der Strangtopologie und 3D-Modell [7] eines DNA-Origami-Objekts. Die Farbkodierung markiert jeweils das gleiche Oligonukleotid. Rechts: 3D-Modell [7] und Strangtopologie des grün fluoreszierenden Proteins (GFP, 1gfl.pdb [8]). Farbkodierte Pfeile markieren beta-Faltblätter und zeigen entlang der Richtung der Primärstruktur. (d) Monomere DNA-Objekte und Proteine können sich spezifisch zu größeren Strukturen zusammenlagern (Quartärstruktur). Links: 3D-Modelle und elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Tetramers und seiner Untereinheiten; übernommen mit freundlicher Genehmigung von [9] © (2009) American Association for the Advancement of Science. Maßstab: 20 nm. Rechts: Darstellung [7] von 3D-Modellen der ATP-Synthetase in kompakter und Explosionsansicht der Untereinheiten (1e79.pdb, 1c17.pdb [10, 11]).

Komplexe Funktionen könnten über kristalline Strukturen erreicht werden

Ein wichtiger Schritt hin zur Fähigkeit, komplexe Funktionen in DNA-Objekten erzeugen zu können, sind hochauflösende Strukturinformationen über die tatsächliche Beschaffenheit einer konstruierten Struktur. Nur die genaue Kenntnis tatsächlich vorliegender struktureller Konformationen ermöglicht die Bewertung bestimmter Designstrategien. Die Fähigkeit, Kristalle aus DNA-Objekten zu züchten, würde den Zugang zur Röntgenstrukturanalyse schaffen, mit der die Struktur der DNA-Nanoobjekte mit atomarer Auflösung bestimmt werden könnte.

Darüber hinaus stellen DNA-Nanoobjekte attraktive Bausteine für kristalline Gitter dar. Auf Grund ihrer adressierbaren Komplexität ist es denkbar, dass Kristalle aus DNA-Objekten mit kontrollierbarer Beschaffenheit bezüglich ihrer Gittergeometrie, chemischen Zusammensetzung oder Porosität erzeugt werden können. Designte Kristallmatrizes könnten organische und anorganische Partikel beherbergen, um neue Anwendungen für die Bereiche der Photonik, Plasmonik oder der Katalyse zu realisieren [12–15]. Die periodische Ausrichtung von Proteinen in Kristallgittern aus DNA-Objekten könnte vielleicht sogar die Strukturauflösung komplexer Proteine ermöglichen, die alleine nicht kristallisieren würden.

Eine weitere wichtige Motivation, die Kristallisation von DNA-Objekten zu untersuchen, liegt in dem Bestreben, die dynamischen Interaktionen, die die Kristallisation von Biomakromolekülen antreiben, besser verstehen und kontrollieren zu können. In makromolekularen Kristallen liegen vergleichsweise schwache Interaktionen zwischen den Monomeren vor, die den dynamischen Interaktionen in komplexen Reaktionsnetzwerken vermutlich sehr ähnlich sind [16]. Einsichten über günstige Interaktionen, die die Kristallisation von DNA-Objekten ermöglichen, könnten daher vielleicht auch dazu beitragen, komplexere Assemblierungen höherer Ordnung und dynamisch interagierende Netzwerke aus DNA-Objekten zu erzeugen.

Modellsystemstudien können helfen, den Weg zu bereiten

Die Kristallisation komplexer DNA-Objekte bleibt allerdings bislang eine unüberwundene Herausforderung [17]. Eines der möglichen Probleme, die das Kristallisationsvermögen komplexer, mehrsträngiger DNA-Objekte beeinträchtigen könnten, liegt in der Heterogenität der Proben. Aus Selbstassemblierungsreaktionen für DNA-Objekte können neben der Zielspezies verschiedenartige heterogene Produkte wie teilweise ungefaltete oder geometrisch veränderte Objekte, sowie Oligomere und Aggregate entstehen. Ein gewisses Ausmaß an chemischer Heterogenität könnte zudem bereits im Ausgangsmaterial, den synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, in Form von verkürzten Strängen oder Strängen mit Punktmutationen vorliegen. Ein anderer potentiell problematischer Aspekt für die Kristallisation könnte die Art der Interaktion zwischen den DNA-Objekten sein. Üblicherweise wird die Oligomerisierung in 2D durch Hybridisierung kurzer, komplementärer DNA-Motive erreicht. Solche Interaktionen könnten für die Kristallisation in 3D zu stark sein.

Um die vorliegenden Fragestellungen auf rationale Weise adressieren zu können, war ein zentrales Ziel dieser Arbeit, kritische Parameter für die Kristallisation komplexer DNA-Objekte mit Hilfe eines Modellsystems zu untersuchen. Hierfür wurde das DNA-Tensegrity-Dreieck ausgewählt – ein bereits in der Literatur beschriebenes, kristallisierendes DNA-Objekt aus sieben Strängen, dessen Kristallisation ausschließlich durch Watson-Crick-Interaktionen vermittelt wird [18]. Mit Hilfe von insgesamt 40 verschiedenen, gezielt erzeugten Modifikationen des Dreiecksmotivs sollte der Einfluss der Probenheterogenität und der Interaktionsstärke zwischen den kristallisierenden DNA-Objekten untersucht werden. Obwohl das DNA-Dreieck deutlich kleiner als komplexe DNA-Origami-Objekte ist, können Parameter, die sich für den

durch Watson-Crick-Interaktionen vermittelten Kristallisationsprozess des DNA-Dreiecks als kritisch erweisen, auch für die Kristallisation komplexerer DNA-Objekte von entscheidender Bedeutung sein.

Die Herstellung ausreichender Probenmengen ist ein Schlüsselziel

Eine praktische und unausweichliche Hürde für die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten besteht in der Herstellung ausreichender Probenmengen, mit denen übersättigte Lösungen der DNA-Objekte erzeugt werden können, aus denen die Kristallisation erfolgen kann. Die Bedingungen, bei denen die Selbstassemblierung komplexer DNA-Objekte erfolgreich stattfinden kann, liegen im nanomolaren Konzentrationsbereich, wohingegen für die Kristallisation ähnlich großer Objekte Konzentrationen im mikromolaren Konzentrationsbereich empfohlen werden [19–21]. Dieser Konzentrationsunterschied kann mit Hilfe geeigneter Aufreinigungs- und Konzentrationsmethoden überwunden werden, die zugleich die Handhabung großer Probenmengen und hohe Probenausbeuten ermöglichen. Mit derartigen Präparationsmethoden können die niedrigen Konzentrationsbedingungen für die Produktion der Objekte von den hohen Konzentrationsanforderungen für deren Kristallisation entkoppelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, bekannte Methoden aus der Biochemie für die Herstellung dichter und reiner DNA-Origami-Probenlösungen zu charakterisieren. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden können nicht nur der Probenvorbereitung für die Kristallisation dienen, sondern ebnen auch den Weg für neue Anwendungen der DNA-Nanotechnologie mit ähnlich hohem Probenbedarf wie die Kristallisation.

Kapitelstruktur der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit gibt zunächst einen Überblick über in der Literatur beschriebene aktuelle Beispielanwendungen der DNA-Nanotechnologie und über Netzwerke aus DNA-Motiven, die bereits erfolgreich kristallisiert wurden. Auch einige grundlegende Aspekte der makromolekularen Kristallisation werden erläutert (Kapitel 2). Zentrale Aspekte der durch Watson-Crick-Interaktionen vermittelten Kristallisation werden anschließend am Beispiel des DNA-Tensegrity-Dreiecks als Modellsystem untersucht (Kapitel 3). Im Folgenden werden weitere Versuchsreihen mit dem Dreiecksmotiv vorgestellt, in denen der Einfluss der Probenheterogenität auf das Kristallisationsvermögen des Modellsystems untersucht wurde (Kapitel 4). Kapitel 5 stellt dann verschiedene Methoden vor, die zur Herstellung dichter Probenkonzentrationen von DNA-Origami-Objekten dienlich sind und Kapitel 6 fasst bisherige Erkenntnisse aus Kristallisationsansätzen mit DNA-Origami-Objekten zusammen. In Kapitel 7 werden die Ergebnisse und Erkenntnisse aus den Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, hinsichtlich ihrer Bedeutung für weitere Kristallisationsansätze mit DNA-Origami-Objekten diskutiert. Die Arbeit schließt mit einem Ausblick auf zukünftige Entwicklungen, die für den weiteren Weg zur Kristallisation komplexer DNA-Objekte womöglich relevant werden (Kapitel 8).

Kapitel 2

Einleitung

2.1 DNA-Nanotechnologie

Der Begriff DNA-Nanotechnologie bezeichnet ein Forschungsgebiet, das sich mit der Selbstassemblierung von Nanostrukturen aus DNA befasst. Seit ihrer Entwicklung vor ca. 30 Jahren wurden vielseitige Ansätze entwickelt, um immer größere und komplexere Objekte aus oder mit Hilfe von DNA zu assemblieren [22].

Ein Teilgebiet der DNA-Nanotechnologie bildet die DNA-Origami-Methode und ihre Anwendungen. Bei diesem Ansatz findet der Selbstassemblierungsprozess zwischen einem über 7000 Basen langen, zirkulären Templat-Einzelstrang und ca. 200 verschiedenen kurzen DNA-Einzelsträngen statt [23]. Einzelne Abschnitte auf jedem kurzen Einzelstrang sind zu verschiedenen Regionen auf dem langen Templatstrang revers-komplementär. In einer Selbstassemblierungsreaktion hybridisieren die kurzen Einzelstränge im Gemisch unter Ausbildung zahlreicher spezifischer Strangkrenzungen mit revers-komplementären Abschnitten des Templatstrangs, der dadurch zu einer definierten, kompakten Struktur kondensiert wird (Abb. 2.1).

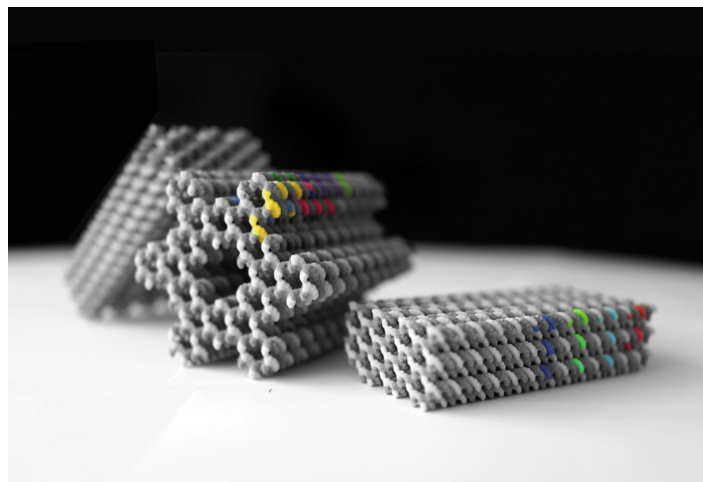


Abbildung 2.1 – Abbildung von Strukturmodellen verschiedener DNA-Origami-Objekte. Die 3D-gedruckten Modelle stellen die atomare Struktur von DNA-Origami-Objekten dar. Der lange Templatstrang ist dunkelgrau eingefärbt, kurze Einzelstränge sind hellgrau oder bunt markiert. Die bunten Markierungen heben die Pfade einzelner Klammeroligonukleotide hervor, die den Templatstrang durch Hybridisierung an mehrere Regionen kondensieren.

Die Sequenzen der Einzelstränge können so programmiert werden, dass sie diskrete Objekte mit komplexen Formen und mechanischen Eigenschaften aus insgesamt mehreren tausend einzeln adressierbaren Basenpaaren ausbilden. Durch chemische Modifikation definierter Positionen in den synthetischen Einzelsträngen lassen sich die Origami-Objekte zudem multifunktional erweitern.

2.1.1 DNA-Origami-Objekte als Präzisionswerkzeuge

Mit dem DNA-Origami-Ansatz lassen sich komplexe Formen und funktionelle Modifikationen einzelner Positionen kombinieren, um Gastmoleküle präzise zu positionieren, zu ummanteln und zum Teil auch die Form anderer Materialien zu begrenzen (Abb. 2.2). In der Literatur finden darüber hinaus Beispiele, in denen DNA-Origami-Objekte für die Positionierung von Enzymen zur Verstärkung ihrer Reaktionskaskaden [24], für die Interaktion mit Lipidmembranen [25–27], für verschiedene Einzelmolekülstudien [28, 29], für die Strukturanalyse von Proteinen [30] oder für die Positionierung eines Fluorophors in photonischen Kristallen verwendet wurden [12]. Würde die Herstellung von DNA-Origami-Kristallen gelingen, könnte dieses Potential auf quasi-unendliche, dreidimensionale Gitter übertragen werden und neue Anwendungen im Bereich der Photonik, Plasmonik und der Katalyse ermöglichen [13–15].

In einer kürzlich beschriebenen Studie wurde gezeigt, dass das dreidimensionale Gerüst individueller DNA-Origami-Objekte genutzt werden kann, um die Position funktioneller Gruppen in diskreten Schritten mit einer Feinheit von bis zu 0.04 nm einzustellen [31] (Abb. 2.2 a). Diese Arbeit beschreibt damit das erste Beispiel, in dem die Positionierung in einer synthetischen DNA-Nanostruktur mit ähnlicher Präzision wie in Proteinen erreicht wurde. Die beschriebene Strategie ist ein vielversprechender Ansatz, der durch hochauflösende Strukturinformation zu den positionierten Elementen komplementiert werden könnte.

2.1.2 Strukturinformation zu DNA-Origami-Objekten

In der Literatur wird die strukturelle Beschaffenheit von DNA-Origami-Objekten überwiegend durch Abbildung mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) oder mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) im Negativkontrastverfahren beschrieben. Beide Methoden erlauben eine vergleichsweise einfache und schnelle Probenhandhabung, liefern jedoch nur relativ grobe Auflösungen im Bereich einiger Nanometer. Flexible Strukturdesigns werden zunehmend auch durch Kryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen (Kryo-EM) und 3D-Rekonstruktionen aus den Kryo-EM-Datensätzen beschrieben [36–38]. Trotzdem existiert bislang nur eine einzige hochauflösende Kryo-EM-Dichtekarte für die Struktur eines DNA-Origami-Objekts, die eine Auflösung von 11.5 Å erreicht [39]. Diese Daten zeigen, dass die tatsächliche Struktur der DNA-Doppelhelixdomänen in den Origami-Objekten von den idealisierten Designmodellen abweicht, dass aber besonders der Kern der Objekte ausreichend definiert ist und hier die präzise Positionierung funktioneller Gruppen möglich sein kann. Die Röntgenstrukturanalyse aus kristallinen Materialien könnte den Zugang zu Dichtekarten der Objekte mit atomarer Auflösung schaffen. Die Dichtekarten könnten, ebenso wie im Forschungsgebiet der Protein-Strukturbiologie, die strukturellen Informationen aus AFM und TEM ergänzen.

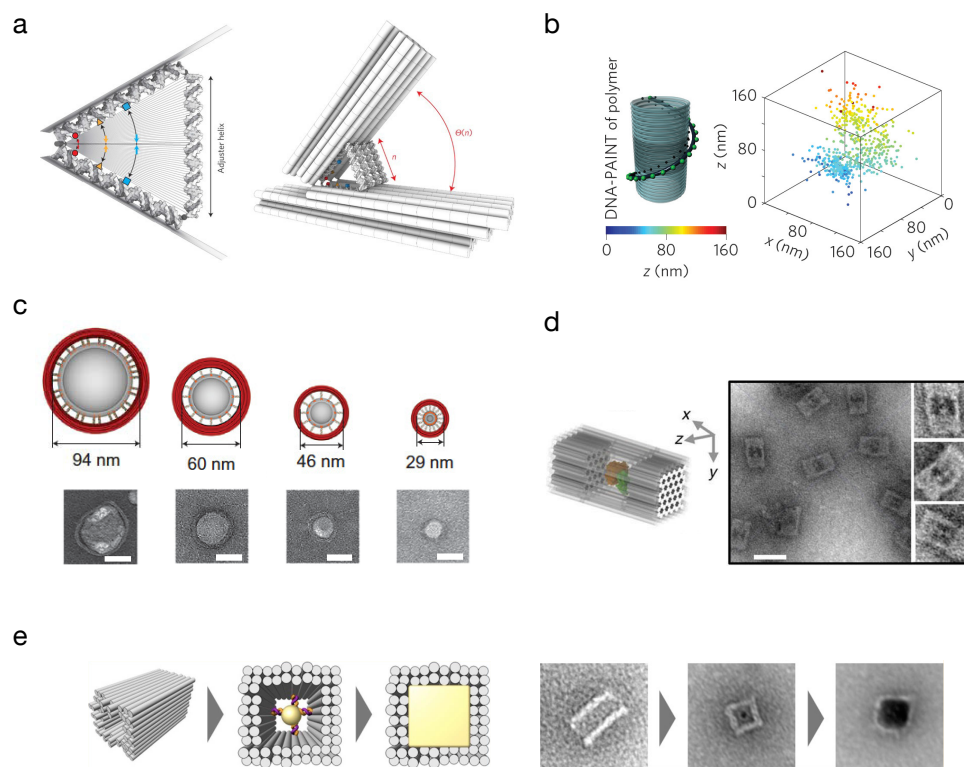


Abbildung 2.2 – Positionierung von reaktiven Gruppen und Gastmolekülen durch DNA-Origami-Objekte. (a) Präzise Positionierung von Fluorophoren und reaktiven Thiolgruppen. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [31]; © (2016) Nature Publishing Group. (b) Alignment eines synthetischen Polymer-Drahts mit Elementen aus einzelsträngiger DNA. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [32]; © (2015) Nature Publishing Group. (c) DNA-Origami-vermittelte Bildung von Liposomen. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [33]; © (2016) Nature Publishing Group. (d) Beherbergung von Proteinen in abgeschlossenen Hohlräumen. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [34]; Creative Commons Attribution 4.0 Internationale Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). (e) DNA-Container, die zur Beherbergung von Goldnanopartikeln und als Begrenzung des Goldclusterwachstums dienen. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [35]; © (2014) American Chemical Society. Maßstäbe: 50 nm.

2.1.3 Assemblierungen höherer Ordnung

Die Vision, kristalline Materialien aus DNA-Objekten konstruieren zu können, legte ursprünglich den Grundstein für die DNA-Nanotechnologie, die sich mittlerweile zu verschiedenen Forschungszweigen weiterentwickelt hat [22]. Neben dem DNA-Origami-Ansatz (Abb. 2.3 a,b) zählen auch der sogenannte Tile-Brick-Ansatz [40], bei dem ausschließlich kurze synthetische DNA-Einzelstränge verwendet werden (Abb. 2.3 c), und die Selbstassemblierung DNA-beschichteter Nanopartikel zum Forschungsgebiet der DNA-Nanotechnologie (Abb. 2.3 d, e). Verschiedene Interaktionsstrategien werden verfolgt, um Assemblierungen höherer Ordnung aus DNA-Objekten zu erreichen [41]. Netzwerke aus Origami-Objekten wurden zum Beispiel erfolgreich durch Basenpaarstapelwechselwirkungen zwischen formkomplementären Oberflächenelementen (Abb. 2.3 a) oder durch spezifische Sticky-End-Interaktionen zwischen verschiedenen kurzen Einzelstrangüberhängen an den Helixenden der Origami-Objekte erzeugt [42] (Abb. 2.3 b). Netzwerke aus modularen, deutlich kleineren Tile-Brick-Bausteinen basieren ebenfalls auf der spezifischen Hybridisierung zwischen komplementären Einzelstrangregionen der Tiles [43] (Abb. 2.3 c). Die dreidimensionale Assemblierung DNA-beschichteter Goldnanopartikel basiert hingegen auf der Hybridisierung zahlreicher gleicher Sequenzen an der Oberfläche radialsymmetrischer Goldpartikel. Die Anordnung in dreidimensionalen Kristallgittern ergibt sich dann aus dem effektiven Interaktionsradius der beschichteten Goldnanopartikel [44] (Abb. 2.3 d). Andere Ansätze zeigen die Verwendung geometrisch definierter DNA-Origami-Objekte als Platzhalter zwischen den Goldnanopartikeln als vielversprechende Strategie für die dreidimensionale Ausbildung kristalliner Netzwerke [45] (Abb. 2.3 e).

Die genannten Strategien erwiesen sich als erfolgreiche Ansätze für die Bildung zwei- und dreidimensionaler Netzwerke mit hunderten bis tausenden einzelnen Partikeln (vgl. Abb. 2.3). Die Kantenlänge der Netzwerke erreicht damit allerdings maximal einige Mikrometer, wohingegen Kristalle, die sich für die Röntgenstrukturanalyse eignen, meist eine Kantenlänge von 50-200 μm haben [16]. Solche Kristalle würden aus mehreren Milliarden bis einigen Billionen komplexer DNA-Objekten bestehen.

2.2 Kristalline DNA-Netzwerke

Kristalline DNA-Matrizes, die sich für die Röntgenstrukturanalyse eignen, wurden erfolgreich aus einigen kleineren DNA-Motiven mit Molekulargewichten unter 60 kDa gezüchtet. Zu diesen Objekten zählt die Klasse der DNA-Tensegrity-Dreiecke – eines von insgesamt zwei bekannten Systemen, die ausschließlich auf Basis von Watson-Crick-Interaktionen und in geplanten Gittergeometrien kristallisieren [18, 47].

2.2.1 Das DNA-Tensegrity-Dreieck

Begriffsklärung

Das Wort *Tensegrity* leitet sich aus den englischen Begriffen *tension* (Zugspannung) und *integrity* (Zusammenhalt) ab. Tensegrity beschreibt ein Konstruktionsprinzip aus Kunst und Architektur, das diskontinuierliche Druckelemente mit kontinuierlichen Zugelementen kombiniert. Bei ausreichender Vorspannung im System entsteht aus dem Zusammenspiel von Zug- und Druckelementen ein stabiles Tragwerk definierter Form. Liu *et al.* prägten den Begriff des DNA-Tensegrity-Dreiecks, als sie anhand eines DNA-Dreiecksmotivs erstmals die Anwendbarkeit des makroskopischen Konstruktionsprinzips für mikroskopische DNA-Objekte

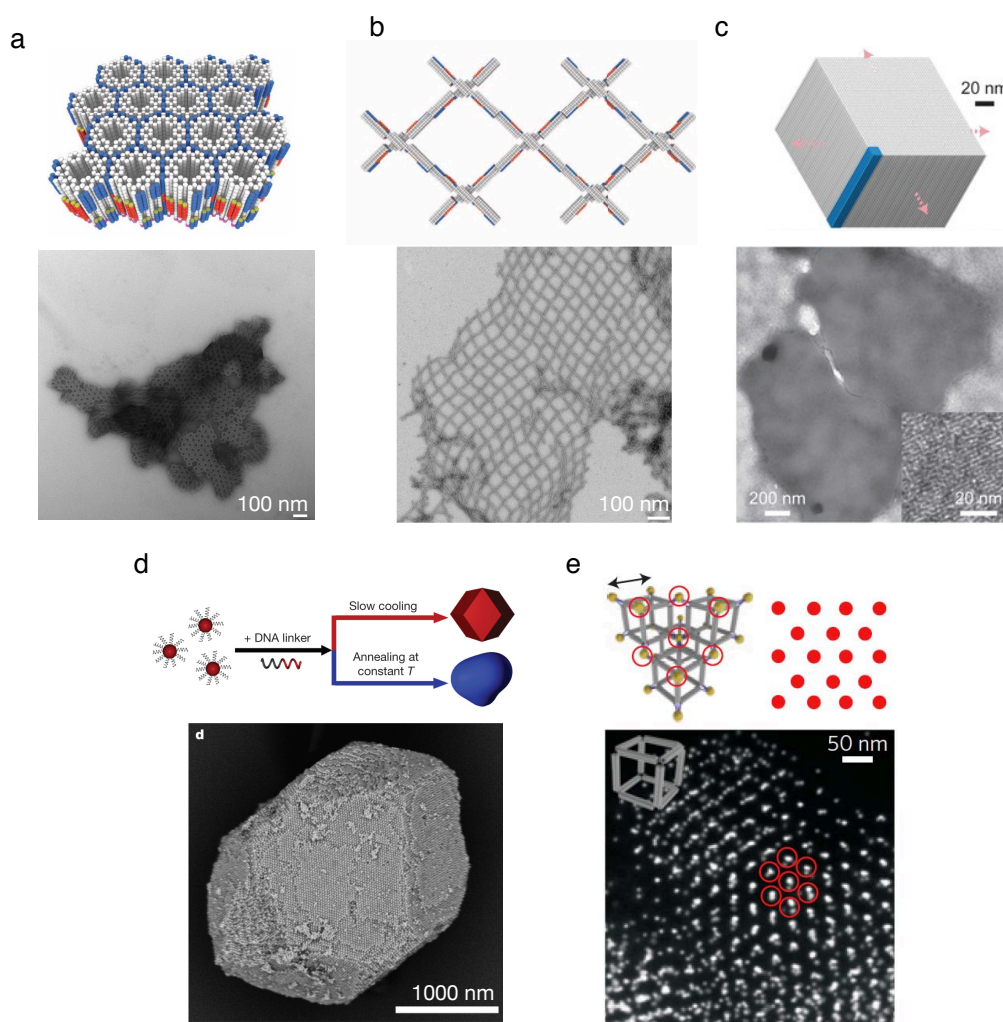


Abbildung 2.3 – DNA-vermittelte Assemblierungen höherer Ordnung. (a, b) Zweidimensionale Gitter aus DNA-Origami-Objekten auf Basis von formkomplementären Oberflächenelementen (a) oder von Sticky-End-Interaktionen (b). Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [42]; © (2015) American Association for the Advancement of Science. (c) Zweidimensionale Gitter mit definierten Schichttiefen aus DNA-Tiles. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [43]; © (2014) Nature Publishing Group. (d) Mikrokristalle aus DNA-beschichteten Goldnanopartikeln. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [46]; © (2013) Nature Publishing Group. (e) Dreidimensionale Gitter, deren Geometrie durch DNA-Origami-Polyeder definiert ist, die als Platzhalter zwischen Goldnanopartikeln fungieren. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [45]; © 2016, Nature Publishing Group.

vorstellten [48]. In ihrer Arbeit beschreiben die Wissenschaftler die strukturelle Integrität eines biegesteifen DNA-Motivs, dessen starre, dreidimensionale Form sich aus der Verknüpfung dreier kurzer DNA-Duplexe durch an sich flexible Holliday-Struktur motive ergibt. Isolierte Holliday-Strukturen weisen an der Kreuzungsstelle Rotationsfreiheitsgrade um die verknüpfenden Rückgratstränge auf [49]. Im Tensegrity-Dreiecksmotiv sind die frei drehbaren Kreuzungsstellen räumlich ineinander verschränkt und definieren ein nicht planares, gleichseitiges Dreieck, dessen Seiten aus durchgängigen Doppelhelixdomänen bestehen (vgl. Abb. 2.4 a-c).

Die Konstruktionsweise dieses DNA-Motivs ist sehr eng mit dem makroskopischen Prinzip von Tensegrity verwandt, im Sinne der Definition liegt hier allerdings keine echte Tensegrity vor, weil sich die Druckelemente — hier die Doppelhelizes — berühren. Der Künstler Kenneth Snelson, der zusammen mit dem Architekten Richard Buckminster Fuller als der Begründer des Tensegrity-Prinzips gilt, beschreibt verschränkte Motive wie das DNA-Dreieck als Einheit einer gedachten Flechtgewebezelle, die er als Vorstufe von Tensegrity-Konstruktionen bezeichnet und die sich unter Verwendung ausreichend steifer Materialien zum Weben dreidimensionaler Gitter eignen [50, 51] (Abb. 2.4 e). Beispiele für vorgespannte Tensegrity-DNA-Strukturen folgten später für DNA-Origami-Objekte [52].

Der erste designte DNA-Kristall

Basierend auf der Konstruktion von Liu *et al.* wurde von Nadrian Seeman und seinen Mitarbeitern ein deutlich kleineres Dreieck¹ entwickelt, das als erstes designtes DNA-Motiv makroskopische, dreidimensionale Kristalle ausbildete und als Tensegrity-Dreieck bekannt wurde [18].

Das DNA-Tensegrity-Dreieck setzt sich aus nur drei verschiedenen Oligonukleotiden zusammen, die im Verhältnis 3:3:1 assemblieren (Abb. 2.4 a-c). Die Holliday-Kreuzungen im Dreiecksmotiv gewährleisten eine intrinsische Flexibilität des DNA-Objekts (Abb. 2.4 c) [53]. Die Seiten des Dreiecks spannen im Kristall ein dreidimensionales Gitter aus Duplexdomänen auf, die über Sticky Ends verknüpft sind. Jedes Dreieck bildet im Kristallgitter insgesamt sechs Kontakte zu sechs verschiedenen Nachbarn aus (Abb. 2.4 d).

Ein zentrales Anwendungsziel der dreidimensionalen DNA-Matrizes ist die Beherbergung von Gastmolekülen, die durch das kristalline DNA-Gitter fixiert werden und dann mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden können. Die Dreieckskristalle enthalten zwischen den Monomeren größere rhomboedrische Hohlräume mit einem Volumen von bis zu 200 nm^3 [17, 18] (Abb. 2.4 e, f). Diese Hohlräume durchziehen das ganze Kristallgitter in mehreren Kanälen und sind daher von außen für größere Gastmoleküle zugänglich (Abb. 2.4 f). Das Kristallgitter des DNA-Dreiecks ist damit makroskopisch betrachtet ein hochporöses Material mit hohem Flüssigkeitsanteil, was eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringe Auflösung der Kristallstruktur von $4\text{--}5 \text{ Å}$ sein könnte [17, 54].

Weitere Studien zu DNA-Dreieckskristallen

Neben dem bekanntesten DNA-Dreieck mit zwei Rückgratumdrehungen pro Seite demonstrierten Zheng *et al.* auch die Kristallisation von Dreiecksmotiven mit längeren Seiten aus drei bzw. vier kompletten Rückgratumdrehungen (Abb. 2.5). Die längeren Dreiecksseiten erzeugen entsprechend größere Hohlräume von bis zu 1000 nm^3 in den Kristallen. Die großen

¹Die Seitenlänge des DNA-Dreiecks aus Liu *et al.* betrug $77\text{--}80$ Basenpaare [48], die aus Zheng *et al.* betrug 21 Basenpaare [18].

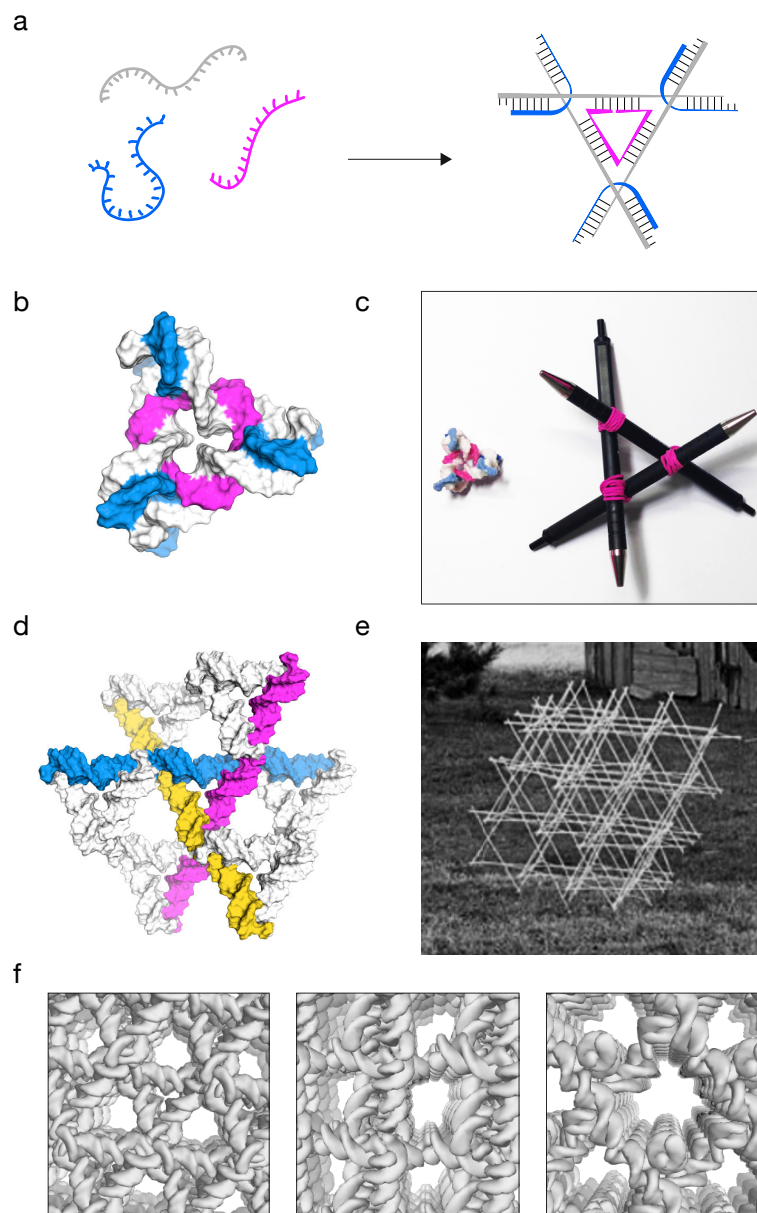


Abbildung 2.4 – Das DNA-Tensegrity-Dreieck. (a) Schematische Darstellung der Assemblierung und Strangtopologie des DNA-Tensegrity-Dreiecks. (b) 3D-Modell aus der Kristallstruktur (3gbi.pdb [18]). rot, M-Strang; weiß: L-Strang; blau: S-Strang. (c) Abbildung makroskopischer Modelle für das Dreiecksmotiv. Links: 3D-Druck; rechts: mechanisches Modell, das die Steifigkeit der Doppelhelixdomänen und die Flexibilität der Holliday-Kreuzungen veranschaulicht. (d) 3D-Modell der Interaktionen eines DNA-Dreiecks im Kristallgitter zu seinen sechs Nachbarn (3gbi.pdb [18]). Durchgängige Helixachsen sind farblich hervorgehoben. (e) Abbildung eines dreidimensionalen Webwerks aus Bambusstäben. Übernommen aus [50] mit freundlicher Genehmigung des Urhebers Kenneth Snelson. (f) Darstellung der Hohlräume im Dreieckskristall in Aufsicht (links) und Seitenansicht (Mitte), sowie in einer der drei möglichen Ansichten entlang der Helixachsen (rechts). 3D-Modelle zeigen eine grobe Oberflächendarstellung von 3×3 Einheitszellen in der Kristallstruktur (3gbi.pdb [18]). Die Darstellung der 3D-Modelle erfolgte mit dem Programm Chimera [7].

Hohlräume dieser Kristalle eignen sich theoretisch gut für die Beherbergung größerer Gastmoleküle, allerdings sind sie vermutlich auch Ursache dafür, dass für diese Kristalle ein deutlich schlechteres Streuvermögen beobachtet wurde [17, 18, 54, 55]. Eine mögliche Strategie, das Streuvermögen der Dreieckskristalle zu verbessern, zeigte sich in der Verwendung von DNA-Strängen mit Phosphatgruppen an den 5'-Enden [56].

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Dreiecksmotive auch in komplexeren Gitteranordnungen mit zwei verschiedenen Monomeren pro Einheitszelle kristallisieren und dass sich der Einbau verschiedener Dreiecksspezies in das Kristallgitter mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Dreieckssträngen optisch verfolgen lässt [57]. Anhand fluoreszenzmarkierter DNA-Gastmoleküle wurde später ein erstes Beispiel für einen Wirtskristall aus DNA-Dreiecken demonstriert. Die DNA-Gastmoleküle bildeten eine Tripelhelixstruktur um die Doppelhelixdomänen in der Kernregion des Dreiecks aus [58].

Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die Kristalle der DNA-Dreiecke nur in Lösungen mit hohem Salzgehalt stabil sind. Mit Hilfe eines DNA-Gastmoleküls, das eine Tripelhelixstruktur um die interagierenden Sticky Ends zwischen zwei Dreiecken bildet, konnte die Stabilität der Kristalle aber auch in Lösungen mit geringerem Salzgehalt signifikant erhöht werden [59]. Die Triplett-bildenden Oligonukleotide wurden außerdem genutzt, um photoreaktive Interkalatoren an definierte Positionen in die Kristallgitter einzubringen und dadurch die Stabilität der Kristalle nach einer lichtinduzierten Verknüpfungsreaktion zu erhöhen [60].

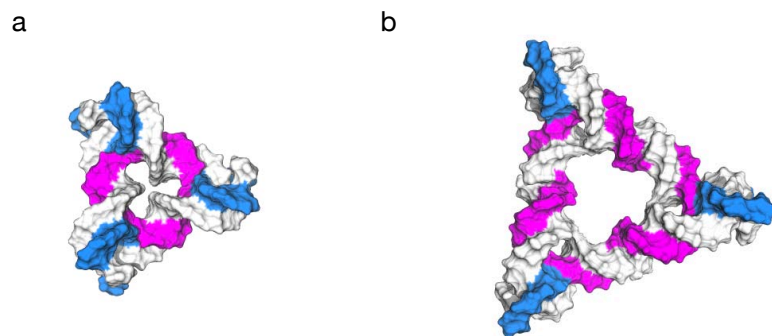


Abbildung 2.5 – 3D-Modelle unterschiedlich großer Dreiecksmotive. (a) GA-Variante mit 38 kDa; Seitenlänge 21 bp (3gbi.pdb [18]). (b) GA-Variante mit 60 kDa; Seitenlänge 32 bp (3ubi.pdb [55]). Die Darstellung der 3D-Modelle erfolgte mit dem Programm Chimera [7]. Die Struktur des Dreiecksmotivs mit einer Seitenkantenlänge von 42 bp ist in der Proteindatenbank nicht hinterlegt.

2.2.2 Andere DNA-Matrizes

Watson-Crick-basierte Netzwerke

Erst kürzlich wurde eine zweite Klasse von DNA-Motiven vorgestellt, die ausschließlich auf Grund von Watson-Crick-Interaktionen kristallisieren. Diese DNA-Motive basieren auf dem Konstruktionsprinzip des DNA-Tensegrity-Dreiecks und waren ursprünglich als Tensegrity-Vierecke bzw. -Sechsecke geplant. In der Kristallstruktur der Proben zeigte sich allerdings, dass die Gitter eine andere Anordnung aufwiesen [47].

Ähnlich wie die Dreieckskristalle bestehen diese Netzwerke aus kurzen, steifen Doppelhelixdomänen, die über Holliday-Kreuzungen miteinander verknüpft sind und kurze Sticky-End-Interaktionen zu anderen Duplexdomänen ausbilden. Anders als im Dreiecksmotiv sind die

Duplexdomänen hier allerdings nicht ineinander verschränkt, sondern durch einen zentralen Kernstrang aligniert (Abb. 2.6 a). Dieser repetitive Kernstrang windet sich durch vier bzw. sechs benachbarte Doppelhelixdomänen und erzeugt eine dreifach symmetrische Rotationsachse der Duplexdomänen, in der der Kernstrang selbst nicht aufzulösen ist [47] (Abb. 2.6 b). Die Struktur des DNA-Netzwerks konnte mit einer Auflösung von 3 Å bestimmt werden.

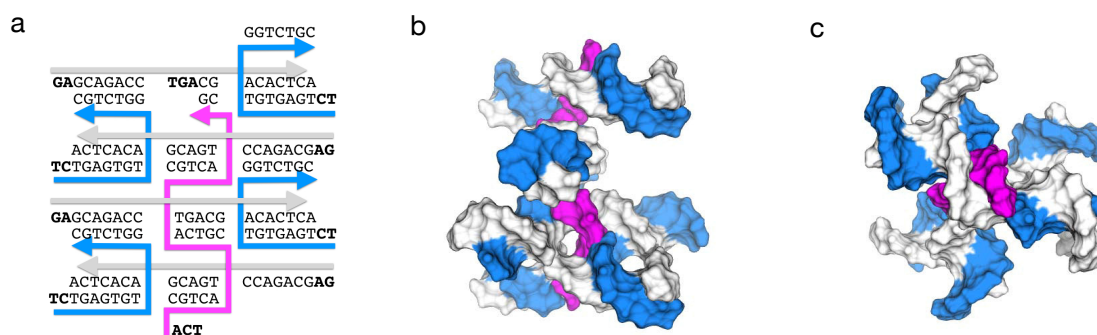


Abbildung 2.6 – Weitere 3D-DNA-Matrix, die ausschließlich auf Watson-Crick-Interaktionen beruht. (a) Tatsächliche Strangtopologie der Untereinheit im DNA-Netzwerk von Simmons *et al.*, die als Tensegrity-Viereck geplant war. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von [47]; © (2016) American Chemical Society. Farbkodierung wie in (b,c); Pfeilspitzen markieren die 3'-Enden der Oligonukleotide; fettgedruckte Buchstaben markieren Sticky-End-Interaktionen (b,c) Ausschnitt aus der Kristallstruktur 5kek.pdb [47], dargestellt in zwei Ansichten. (b) Die Seitenansicht zeigt die schraubenartig angeordneten, kurzen Duplexdomänen, die über einen zentralen Templatstrang (rot) und Strangkreuzungen zwischen benachbarten Duplexdomänen (blau) verknüpft sind. Die Interaktion entlang der Duplexachsen wird über Sticky-End-Interaktionen zwischen zwei überhängenden Basen vermittelt. (c) Die Aufsicht auf das DNA-Motiv zeigt die 3-fache Rotationsachse der schraubenartig angeordneten Duplex-Ebenen. Farbkodierung wie in (a). Die Darstellung der 3D-Modelle erfolgte mit dem Programm Chimera [7].

Netzwerke mit anderen Nukleotidinteraktionen

Paukstelis *et al.* veröffentlichten 2004 das erste dreidimensionale DNA-Gitter, das auf unerwarteten Gitterinteraktionen eines 13-mers basiert [61,62]. Dieses 13-mer bildet einen Homoduplex mit zentralem, antiparallelem B-Form-Kern, in dem sich die Rückgrate der Stränge kreuzen. Das Zentrum des B-Form-Kerns kann nicht-kanonische oder kanonische Basenpaare enthalten [63]. Die Homoduplexe interagieren wiederum über parallele, nicht-kanonische GGA-GGA-Motive – sog. Homopurin-Kreuzungen – zu definierten strukturellen Regionen (Abb. 2.7 a). In dieser definierten und reproduzierbaren Geometrie bildet im Kristallgitter jedes 13-mer insgesamt zwölf durchgängige, kanonische und nicht-kanonische Basenpaare mit jeweils drei anderen 13-meren aus. Die 13. Position jedes Oligonukleotids ist in der Kristallstruktur nicht aufgelöst und für die Kristallisation nicht notwendig [17,61].

Wie die Dreieckskristalle enthält auch dieses Gittersystem durchgängige Hohlräume, die sich für die Aufnahme von Gastmolekülen eignen würden. Die Hohlräume des Kristallgitters lassen sich durch Untereinheiten mit längeren B-Form-Abschnitten vergrößern, wobei die Kristalle – vermutlich wegen der größeren Hohlräume – ebenfalls ein schlechteres Streuvermögen aufweisen [17,61]. Eine potentielle Anwendung der porösen DNA-Kristalle als molekulare Siebe wurde in der Literatur beschrieben [64]. Weitere Untersuchungen zu den DNA-Gittern zeigten, dass sich die Kristallgitter auch aus heterogenen Oligonukleotidgemischen mit verschiedenen Sequenzen im B-Form-Kern bildeten [63]. Es wurde außerdem demonstriert, dass

die Stabilität der DNA-Kristalle durch Verwendung von Crosslinking-Reagenzien erhöht werden kann [65].

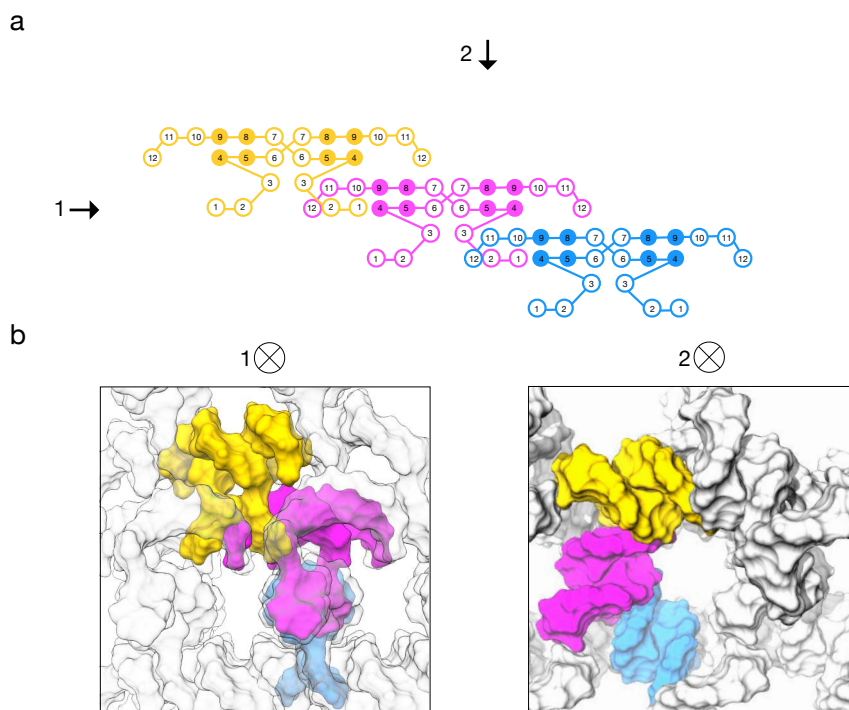


Abbildung 2.7 – Modelldarstellung einer Kristallstruktur mit nicht-kanonischen Basenpaaren. (a) Schematische Darstellung interagierender 13-merer. Homoduplexe mit B-Form-Kern aus jeweils zwei 13-meren sind in der gleichen Farbe (gelb, rot, blau) markiert. Kreise und Zahlen markieren die Basen mit Strangrichtung vom 5'- zum 3'-Ende (Sequenz siehe [17, 61, 63]). Gefüllte Kreise markieren Basen, die Watson-Crick-Basenpaare ausbilden; leere Kreise markieren Basen, die nicht-kanonische Basenpaare ausbilden. (b) 3D-Modell der Kristallstruktur 1p1y.pdb [61] in den Ansichten (1) und (2) wie Pfeile in (a). Farbkodierung wie in (a). Die 3D-Modelle wurden mit dem Programm Chimera dargestellt [7].

2.3 Makromolekulare Kristallisation

Der Begriff Kristallisation beschreibt den physikalischen Prozess der Bildung einer neuen, kristallinen Phase aus einer metastabilen, übersättigten Phase, wie sie beispielsweise in einer Schmelze, einer Lösung, einem Gas oder einem Aerosol vorliegen kann. Qualitativ folgt die Kristallisation von Makromolekülen denselben Prinzipien wie die Kristallisation kleiner Moleküle und Ionen, allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede in quantitativen Aspekten der Prozesse. So enthalten makromolekulare Kristalle meist deutlich höhere Flüssigkeitsanteile, sind kleiner und sie benötigen deutlich höhere Grade an Übersättigung und zeigen deutlich langsamere Kristallisationsraten als beispielsweise die Kristallisation vergleichsweise einfacher Ionengitter. Die Hauptursache dieser Unterschiede wird dem deutlich größeren Ausmaß an Anisotropie zugeschrieben [66–68], die für die größeren, komplexer aufgebauten und chiralen Makromoleküle vorliegt. Interessanterweise zeigten Messungen, dass die energetischen Beiträge zur Kristallisation, pro Molekül gerechnet, für einzelne Ionen und große Makromoleküle in einer vergleichbaren absoluten Größenordnung liegen, was bedeutet, dass die Interakti-

onsenergie pro Oberfläche in makromolekularen Kristallen wesentlich geringer ist [69, 70]. Dies spiegelt sich beispielsweise in der deutlich höheren Fragilität von Protein- und DNA-Kristallen gegenüber externen Faktoren wie Temperatur, Berührung oder Veränderungen der Umgebungslösung wider [16, 71–73].

Formell lässt sich die Kristallisation in die beiden Teilprozesse Nukleation und Wachstum unterteilen, die sich in der Praxis aber auch überlagern können. Selbst bei idealen thermodynamischen Gegebenheiten bezüglich der Probenlösung und der Partikelbeschaffenheit sind beide Prozesse kinetisch kontrolliert und hängen in unterschiedlichem Ausmaß von der Übersättigung der Probenlösung, der Temperatur, der Dichte und dem Ionengehalt der Lösung und möglicherweise von weiteren vorhandenen Kosolventien ab. Auf Grund dieser komplexen Überlagerung sind die Vorhersage und auch die quantitative Beschreibung von Kristallisationsvorgängen nach wie vor eine Herausforderung und wurden nur in wenigen robust kristallisierenden Modellsystemen konsequent untersucht [69, 70, 74–76]. Die daraus erlangten Einsichten und grundsätzliche molekulare und energetische Betrachtungen von Nukleation und Wachstum können dazu beitragen, auch den Verlauf und vor allem mögliche Hürden komplexerer Kristallisationsprozesse besser zu verstehen.

2.3.1 Nukleation

In seiner ursprünglichen Bedeutung beschreibt der Begriff Nukleation das erste Auftreten einer neuen thermodynamischen Phase aus einer anderen Phase. Dieser Prozess erfordert die Überwindung einer Energiebarriere und ist der limitierende Schritt des Phasenübergangs. Eine theoretische Formulierung für die Nukleation wurde zuerst für die Bildung von Tropfen aus übersättigten Gasen formuliert und später auf die Bildung einer kristallinen Phase aus Schmelzen und Lösungen zur klassischen Nukleationstheorie (CNT) erweitert [68, 75, 77]. Die CNT wird auch aktuell in der Literatur als Ansatzpunkt herangezogen, um beispielsweise Aspekte der Selbstassemblierung von DNA-Nanostrukturen oder Viruskapsiden zu beschreiben [78, 79].

Klassische Nukleationstheorie

Näherungsweise lassen sich grundlegende thermodynamische Aspekte der makromolekularen Nukleation auch aus Perspektive der homogenen Nukleation kleiner Moleküle nachvollziehen. Im folgenden Abschnitt werden grundlegende Aspekte der CNT beleuchtet, wie sie unter anderem in [68, 75–77, 80] beschrieben sind.

Die homogene Nukleation betrifft den einfachen Fall der zufälligen Keimbildung durch Zusammentreffen von Monomeren im freien Raum – so z.B. in einer übersättigten Lösung². In dieser metastabilen Phase assoziieren ständig einige Monomere zu größeren Keimen, die sich schnell wieder auflösen und neu bilden. Die Triebkraft der Keimbildung ist hierbei die Reduktion des chemischen Potentials der Partikel durch den Phasenübergang. Die freie Energie dieses Vorgangs hängt gemäß Gleichung (2.1) vom Volumen der gebildeten Keime ab:

$$\Delta G_V = -\frac{4\pi r^3}{3} \rho_c \Delta \mu \quad (2.1)$$

²Nukleationsprozesse, die an Grenzflächen oder an Oberflächen der Gefäßwand, an Verunreinigungen oder an Aggregaten stattfinden, werden als heterogene Nukleation bezeichnet und sind stark vom Winkel und der Beschaffenheit der Kontaktpunkte zwischen der fremden Oberfläche und dem Nukleationskeim abhängig.

In diesem Volumenterm der freien Energie ΔG_V steht r für den Radius eines kugelförmigen Keimes, ρ_c bezeichnet die Teilchendichte im Kristall bzw. im Keim und $\Delta\mu$ entspricht der Differenz des chemischen Potentials eines Partikels in Lösung und im Kristall. Mit der Ausbildung einer neuen Phase ist aber auch die Ausbildung einer Grenzfläche zwischen der alten und der neuen Phase notwendig. Die energetischen Kosten für diesen Prozess hängen gemäß Gleichung (2.2) von der Oberfläche des Keims ab:

$$\Delta G_S = 4\pi r^2 \gamma \quad (2.2)$$

In diesem Oberflächenterm der freien Energie ΔG_S bezeichnet γ die Grenzflächenspannung zwischen der Kristalloberfläche und der Lösung. Nach der klassischen Nukleationstheorie hängt die freie Energie eines gebildeten Keims von diesen beiden Energietermen ab und ist proportional zum Radius des Keimes (Abb. 2.8):

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_S = -\frac{4\pi r^3}{3} \rho_c \Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma \quad (2.3)$$

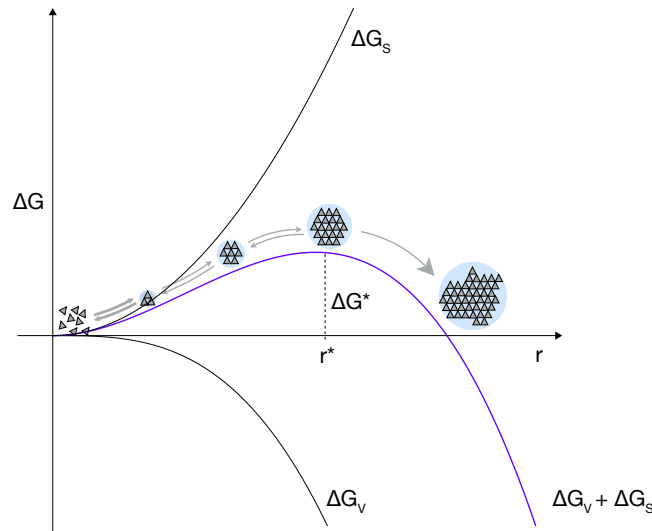


Abbildung 2.8 – Schematische Darstellung der freien Energie gebildeter Keime nach der klassischen Nukleationstheorie. Die freie Energie (ΔG) eines Nukleationskeimes ist als Summe des Volumenterms (ΔG_V) und des Oberflächenterms (ΔG_S) dargestellt (violette Linie). ΔG^* bezeichnet die Aktivierungsenergie für die Bildung eines sphärischen Keimes mit kritischer Größe (r^*). Hellblau hinterlegte Flächen deuten die sphärische Betrachtung der Nukleationskeime an.

Für kleine Keime steigt die freie Energie demnach mit dem Wachstum, sodass sie eher dazu tendieren sich wieder aufzulösen. Erst wenn ein Keim eine kritische Größe überschreitet, überwiegt der Anteil des Volumenterms, und der Keim wächst weiter zu Kristallen (Abb. 2.8). Die Bildung postkritischer Keime ist der limitierende Schritt der Nukleation. Der kritische Radius r^* ergibt aus der Bedingung $\frac{d}{dr} \Delta G|_{r=r^*} = 0$ wie folgt:

$$r^* = \frac{2\gamma}{\rho_c \Delta\mu} \quad (2.4)$$

Durch Einsetzen von r^* in Gleichung (2.3) ergibt sich für die Aktivierungsenergie der Nukleation folgender Zusammenhang:

$$\Delta G^* = \frac{16\pi}{3} \frac{\gamma^3}{(\rho_c \Delta\mu)^2} \quad (2.5)$$

Aus diesem Zusammenhang wird deutlich, dass sowohl die Höhe der freien Energiebarriere als auch die Größe des kritischen Keimes von der Teilchendichte, also dem Übersättigungsgrad der Lösung abhängen. Die Gleichung zeigt außerdem den Einfluss der Grenzflächenspannung und der Lösungsmittel- und Kristallkontaktinteraktionen, die den Unterschied des chemischen Potentials in Lösung und im Kristall beeinflussen.

Die Nukleationsrate J folgt schließlich einer Boltzmannverteilung, die wie folgt von der Aktivierungsenergie für die Bildung eines kritischen Keims abhängt:

$$J = Zj\rho_N e^{-\Delta G^*/k_B T} \quad (2.6)$$

Hier entspricht ρ_N der Teilchendichte und $\rho_N e^{-\Delta G^*/k_B T}$ der Anzahl kritischer Keime pro Volumeneinheit. Z steht für den Zeldovich-Faktor, der die Wahrscheinlichkeit beschreibt, dass ein kritischer Keim weiterwächst und j steht für die Rate, mit der ein Monomer an den kritischen Keim assoziiert [76, 77, 81].

Nichtklassische Nukleation

Einige Annahmen der klassischen Nukleationstheorie sind starke Vereinfachungen der tatsächlichen Zusammenhänge während der makromolekularen Kristallisation. Hierzu zählen beispielsweise die Annahmen, dass Nukleation und Wachstum auf der Assoziation einzelner Monomere beruhen oder dass sich kugelförmigen Keime mit gleichmäßiger Oberflächenenergieverteilung bilden. Dies beschreibt besonders für Keime aus anisotropen Makromolekülen nicht korrekt. Für sehr kleine Keime aus wenigen vergleichsweise großen Molekülen, wie sie laut CNT in stark übersättigten Bedingungen vorliegen müssten, ist auch die getrennte Betrachtung des Keimvolumens und der Keimoberfläche fraglich [77, 82, 83]. Trotzdem sind in der Literatur einige Beispiele beschrieben, in denen experimentelle Beobachtungen der Proteinkristallisation durch die Ansätze der klassischen Nukleationstheorie beschrieben werden können [75], obwohl dies nicht als Beweis für das Zutreffen der Annahmen in der CNT gesehen werden kann [84, 85].

Andere Experimente und Simulationen legen hingegen nahe, dass die Nukleation von Makromolekülen, aber auch von kleinen Molekülen, über die Bildung von Zwischenstufen wie präkristallinen Clustern, Aggregaten oder dichten Flüssigphasen abläuft [74, 80, 82–84]. In diesen Ansätzen gewinnt die Notwendigkeit ausreichend schwacher Interaktionen für mögliche Umorganisation der präkristallinen Vorstufen an Bedeutung [16, 72]. Sie lassen sich insgesamt unter dem Stichwort *Nichtklassische Kristallisation* zusammenfassen und beziehen sich oft sowohl auf die Nukleation als auch auf das Wachstum der Kristalle (Abb. 2.9) [80].

2.3.2 Wachstum

Sobald die kritische Größe eines Kristallkeimes überschritten ist, wird das Kristallwachstum ein thermodynamisch bevorzugter Prozess, der im Vergleich zur Nukleation schnell ablaufen kann. Dies führt rasch zu einer Reduktion der Teilchendichte um die Kristalloberfläche und zur Entstehung einer Depletionszone um den Kristall, in der die Nukleation neuer Keime unterdrückt ist. Die Rate des Kristallwachstums hängt dann unter anderem vom Transport der

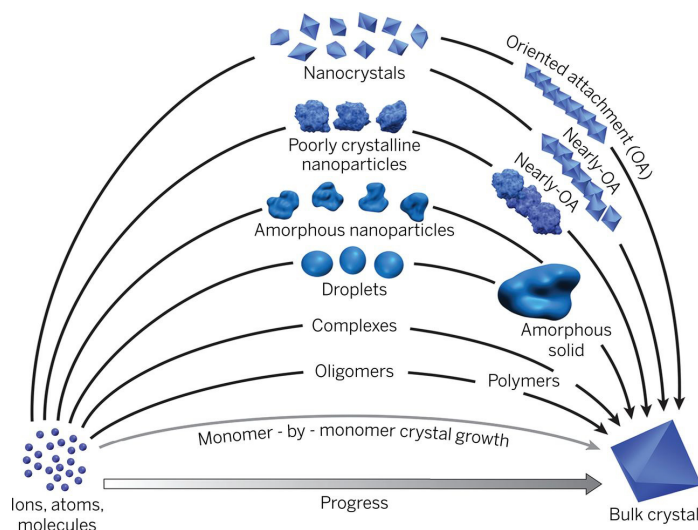


Abbildung 2.9 – Schematische Darstellung verschiedener nichtklassischer Nukleationspfade während des Kristallwachstums kleiner Moleküle und Makromoleküle. Nichtklassische Nukleation zieht für den Reaktionspfad der Kristallbildung mehrere mögliche Zwischenstufen in Betracht. OA: *Oriented attachment*, vororientierte Partikelassoziation. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [80]; © (2015) American Association for the Advancement of Science.

Teilchen aus der Gesamtlösung hin zur Kristalloberfläche ab. Neben der Diffusion der Partikel zur Kristalloberfläche spielen hier Konvektionsströme, die auf Grund von Dichtegradienten in der Gesamtlösung entstehen können, sowie Dichtegradienten der solvatierenden Moleküle, die durch den Einbau eines Makromoleküls in das Kristallgitter frei werden, eine Rolle für die Partikelverteilung in der Nähe der Kristalloberfläche [16, 66, 68, 72, 75].

Wachstumsprozesse makromolekularer Kristalle lassen sich auf Grund ihrer Molekülgröße und der langsameren Wachstumsraten der anisotropen Monomere anschaulich und zeitaufgelöst mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersuchen [72]. Extensive Studien, in denen die Oberfläche wachsender Protein-, Virus- und tRNA-Kristalle abgebildet wurden, haben das qualitative Verständnis zu Wachstumsmechanismen von makromolekularen Kristallen geprägt [72, 86].

Die Experimente zeigten zunächst, dass das postkritische Wachstum von Kristallen sowohl nach dem Modell der klassischen Nukleationstheorie durch Assoziation von Monomeren, als auch nach nichtklassischen Modellen – beispielsweise durch die Assoziation ganzer Einheitszellen, definierter Oligomere und verschiedener Aggregatsformen – erfolgen kann. Unterschiedliche Wachstumsmechanismen können hierbei gleichzeitig an derselben Kristalloberfläche auftreten oder in Abhängigkeit externer Faktoren ineinander übergehen [80, 82, 86, 87].

Wachstumsmechanismen

Grundsätzlich wachsen makromolekulare Kristallgitter nach den gleichen Mechanismen wie anorganische Kristalle, allerdings mit deutlich langsameren Raten. Um klassische und nichtklassische Kristallisationsmodelle zu verallgemeinern lässt sich das Wachstum als Assoziation von Wachstumseinheiten betrachten, die aus Monomeren, Oligomeren oder Clustern bestehen können. In AFM-Studien von Protein- und tRNA-Kristallen wurden folgende Mechanismen beobachtet:

1. Tangentiale Flächenexpansion durch Assoziation von Molekülen an existierende Stufenformationen (Abb. 2.10 a).
2. Ausbildung neuer Stufen durch zweidimensionale Nukleation auf glatten Flächen (senkrecht Wachstum, Abb. 2.10 a).
3. Dreidimensionale Nukleation mehrschichtiger Keime auf glatten Oberflächen, von denen aus tangentialer Flächenexpansion in mehreren Schichten stattfinden kann. Die Nukleation dieser Keime findet über Zwischenstufen entweder bereits in Lösung oder durch Orientierung eines Aggregats an der Kristallordnung der Oberfläche statt und wurde bislang ausschließlich für das Wachstum makromolekularer Kristalle beobachtet (Abb. 2.10 c, d).

Die Prozesse (2) und (3) entsprechen heterogenen Nukleationsereignissen auf der Oberfläche, für die, ähnlich wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, eine Aktivierungsbarriere überwunden werden muss. Die zwei- bzw. dreidimensionale Nukleation wird daher als der limitierende Faktor des Kristallisationswachstums betrachtet. Ein weiterer typischer Effekt der sowohl für das Wachstum anorganischer als auch makromolekularer Kristalle beobachtet wurde, ist die Bildung von Schraubenversetzungen, die auf Grund von Wachstumsdefekten oder Verunreinigungen entstehen können (Abb. 2.10 b) [66].

Für die Inkorporation eines Makromoleküls ist des Weiteren das Zusammentreffen mit einer Wachstumsstufe, die Ausrichtung der anisotropen Moleküle und die Ausbildung kor-

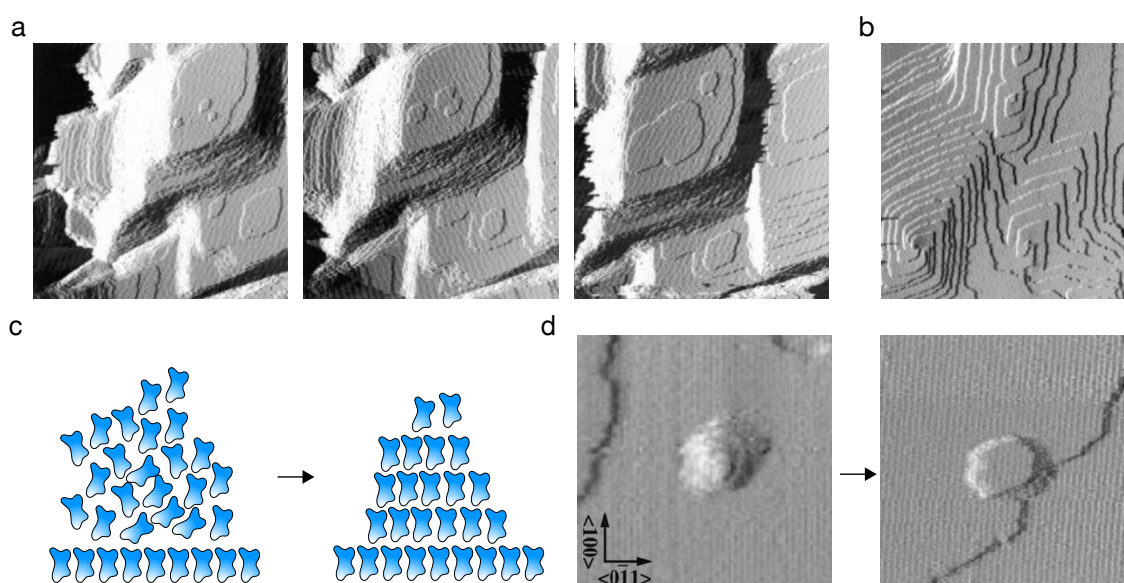


Abbildung 2.10 – Wachstumsmechanismen in makromolekularen Kristallen. AFM-Aufnahmen wachsender Kristallgitter der Phenylalanin-tRNA aus Hefezellen (a,b) und des Proteins Thaumatin (d). **(a)** Zeitreihe derselben Wachstumsregion nach 0 min (links), 6 min (Mitte) und 12 min (rechts). Die Aufnahmen zeigen tangentiales Flächenwachstum und die Bildung neuer Schichten durch zweidimensionale Nukleation. **(b)** Beispielabbildung einer Kristalloberfläche, die mit Schraubenversetzungen wächst. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [86]; © (1997) Oxford University Press (a,b). **(c)** Schematische Darstellung der Ausrichtung vorgeformter Aggregate an der kristallinen Oberfläche. Adaptiert aus [72] **(d)** Beispielabbildung für eine dreidimensionale Nukleation wie in (c) für das Protein Thaumatin. Übernommen mit freundlicher Genehmigung von [72]; © (2000) Annual Reviews.

rekter Interaktionen mit einer Bindestelle auf der wachsenden Kristallfläche notwendig, die wiederum von externen Parametern wie der Temperatur, dem pH-Wert der Lösung oder dem Ionengehalt der Lösung abhängen können. Besonders für Wachstumsmechanismen, die ungeordnete Vorstufen enthalten, sind Umorganisationsvorgänge in den Partikelarrangements von zentraler Bedeutung (Abb. 2.10 c).

Ende des Kristallwachstums

Ein Kristall wächst maximal so lange, bis die Löslichkeitsgrenze der zu kristallisierenden Objekte unterschritten ist und das System nicht mehr im metastabilen Zustand vorliegt [16, 75].

Zusammenfassung von Kapitel 2

Aus dem Überblick über den aktuellen Forschungsstand der DNA-Origami-Nanotechnologie wurde ersichtlich, dass diese Methode ein großes Potential für die Erzeugung funktioneller und dynamischer Präzisionswerkzeuge birgt, die auch die komplexe Organisation von Gastmolekülen ermöglichen würden. Obwohl über DNA-vermittelte Partikelinteraktionen bereits mehrere hundert bis tausend Partikel in zwei- und dreidimensionalen Gittern arrangiert werden konnten, wurde die Bildung makromolekularer Kristalle aus Milliarden von Partikeln bislang nur für vergleichsweise kleine DNA-Motive berichtet.

Die theoretische Betrachtung von Nukleation und Wachstum macht deutlich, dass die Kristallisation ein exergoner Prozess ist, in dem, sofern es dem System gelingt eine kritische Keimgröße zu überschreiten, die Assemblierung von Partikeln zu einem geordneten Gitter energetisch bevorzugt ist. Allerdings ist die Herstellung übersättigter Lösungen besonders für die Kristallisation von Makromolekülen eine notwendige Voraussetzung, damit sowohl Nukleation als auch Wachstum ablaufen können. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz, warum bisher zwar mikrokristalline Arrangements erzeugt werden konnten, die Grenze zu makroskopischen Kristallen aber nur für kleine, in ausreichenden Mengen herstellbare DNA-Motive überschritten werden konnte.

Hinweise auf komplexe Nukleations- und Wachstumsmechanismen, die den Kristallisationsprozess von Makromolekülen zu dominieren scheinen, legen außerdem nahe, dass gerade in übersättigten Lösungen zwischen der Bildung notwendiger reversibler und unerwünschter irreversibler Aggregate ein schmaler Grat liegt, der über Erfolg und Misserfolg eines Kristallisationsprozess entscheidet.

Die nähere Untersuchung der existierenden DNA-Kristalle als Modellsysteme kann womöglich dazu beitragen, Parameter zu identifizieren, die die Gratwanderung makromolekularer Kristallisationsprozesse negativ beeinflussen oder nicht wesentlich verändern. Dies wird im Folgenden in einer Reihe von Experimenten angestrebt, die das Kristallisationsvermögen des DNA-Tensegrity-Dreiecks charakterisieren, herausfordern und in manchen Fällen auch inhibieren.

Kapitel 3

Kristallisation des DNA-Dreiecks

Um kritische Parameter für die Kristallisation komplexer DNA-Objekte zu identifizieren, wurden Modellsystemstudien mit einem in der Literatur beschriebenen, kristallisierenden DNA-Objekt – dem DNA-Tensegrity-Dreieck – durchgeführt. Dieses Kapitel beschreibt das Kristallisationsverhalten eines DNA-Tensegrity-Dreiecks mit G- und C-Überhängen an den 5'-Enden der DNA-Duplexe. Zu diesem Zweck wurde untersucht, inwiefern die Probenkonzentration, die Stöchiometrie der Einzelstränge und die Anwesenheit von Störfaktoren, sowie die Temperaturbedingungen und die Interaktionsstärke zwischen den DNA-Dreiecken das Kristallisationsverhalten dieses Modellsystems in zwei verschiedenen Puffersystemen beeinflussen. Die Kristallisation des Modellsystems wurde außerdem mit einer in der Literatur beschriebenen Variante des DNA-Dreiecks verglichen und für einige Beispiele wurde die Stabilität der gebildeten Kristalle bei höheren Temperaturen untersucht.

3.1 Charakterisierung des Modellsystems

3.1.1 Versuchsbedingungen

Das DNA-Dreiecksmotiv diente in dieser Arbeit als einfaches, mehrsträngiges Modellsystem, dessen Kristallisationsverhalten unter verschiedensten Ausgangsbedingungen charakterisiert wurde. Um die Vergleichbarkeit des Kristallisationsverhaltens in allen Versuchen zu garantieren, wurden die Kristallisationsansätze unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die DNA-Stränge des Dreiecksmotivs wurden mit Puffer zu einem Tropfen vermischt, in einer langsamen Temperaturrampe in vier Tagen von 60 °C auf 20 °C abgekühlt und anschließend konstant bei 20 °C gehalten. Während dieser Zeit reduzierte sich das Ausgangsvolumen des Tropfens um ca. 90 %, bis die Tropfenvolumina und die relative Luftfeuchtigkeit in der abgeschlossenen, durch die Reservoirlösung abgesättigten Probenkammer equilibriert waren (Abb. 3.1a).

Kristallisationsansätze von Proteinen und Nukleinsäuren sind häufig durch extensive Screenings der Pufferbedingungen und weiterer Kofaktoren geprägt. Komplexe Pufferzusammensetzungen können die Viskosität und die Löslichkeit der Partikel sowie die Reichweite und effektive Stärke der Partikelinteraktionen beeinflussen. Diese Arbeit beschreibt hingegen die Kristallisation des DNA-Dreiecks in einem minimalen Puffersystem (Puffer I) und vergleicht die experimentell beobachteten Ergebnisse mit dem komplexeren System (Puffer II) aus der Originalpublikation [18]. Puffer I ist an die Faltungsbedingungen für DNA-Origami-Strukturen angelehnt und enthält neben der Puffersubstanz Tris-HCl nur Magnesiumchlorid,

um die negative Ladung der Phosphatrückgrate in den DNA-Molekülen zu kompensieren. Puffer II enthält typische Komponenten eines DNA-Kristallisationsscreens wie beispielsweise neben Tris-HCl und Magnesiumchlorid auch Magnesiumacetat, Natriumkakodylat und Ammoniumsulfat (Abb. 3.1b). Die beiden Puffer unterscheiden sich in mehreren Aspekten, die nicht komplett voneinander getrennt werden können.

- Puffer II enthält neben divalenten Kationen auch monovalente Kationen, beides in höherer Konzentration als Puffer I. Hierdurch sind die Ladungsabstoßung der DNA-Moleküle und die Stabilität der Watson-Crick-Interaktionen beeinflusst.
- Kakodylat- und Sulfationen wirken hygroskopisch, wodurch die Löslichkeit der DNA im Tropfen herabgesetzt sein kann.
- Ammoniumionen sind volatil und können während der Aufkonzentration die Kationenstärke und den pH-Wert der Proben tropfen verändern.
- Die Aufkonzentration der Proben tropfen durch die Reservoirlösung aus 1.7 M Ammoniumsulfat ist etwas höher als durch ein Reservoir aus einer zehnfachen Stammlösung von Puffer I.

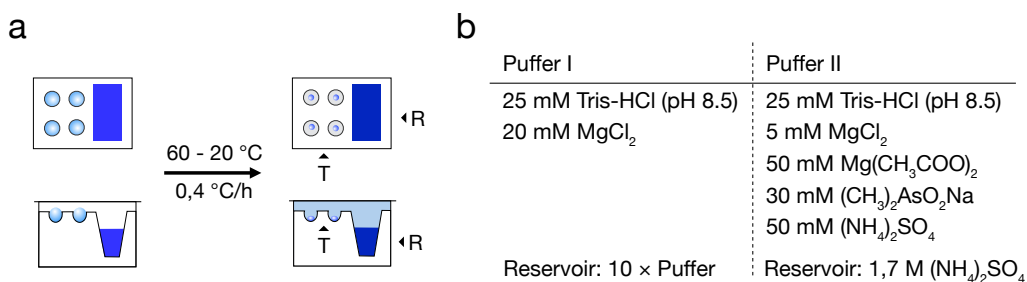


Abbildung 3.1 – Versuchsdurchführung und Puffersysteme. (a) Schematische Darstellung der Kristallisationsansätze nach der *Sitting-Drop*-Methode in der Draufsicht (oben) und Seitenansicht (unten) der Probenkammern. T markiert die Proben tropfen, R markiert die Reservoirlösung. (b) Auflistung der Komponenten in Puffer I und Puffer II.

3.1.2 Bildung und Kristallisation des DNA-Dreiecks

Das DNA-Dreiecksmotiv setzt sich aus drei verschiedenen Oligonukleotiden (L, M und S) zusammen, die im Verhältnis 3:1:3 assemblieren und ein Dreiecksmotiv mit 5'-Überhängen ausbilden. Über diese sogenannten *Sticky Ends* kann jedes DNA-Dreieck mit sechs weiteren Dreiecken interagieren und ein dreidimensionales Kristallgitter aufbauen (Abb. 3.2 a). Um diesen Zwei-Schritt-Prozess zu charakterisieren und auch im Hinblick auf abgewandelte Ausgangsmischungen, wie sie in Kapitel 4 beschrieben werden, interpretieren zu können wurde zunächst die Ausbildung des DNA-Dreiecks in Lösung und die Konzentrationsabhängigkeit des Kristallisationsprozesses untersucht.

Die Bildung des DNA-Dreiecks erfordert die Präsenz der drei Stränge L, M und S und erfolgt bereits nach einer im Vergleich zu den Kristallisationsbedingungen schnellen Temperaturrampe (65–20 °C in einer Stunde) bei 10 mM Magnesiumchlorid und einer M-Strangkonzentration von 6 μM . Die assemblierten DNA-Dreiecke weisen entsprechend ihrer Größe eine ähnliche Laufweite wie ein DNA-Duplex aus 60 Basenpaaren auf und sind auch nach

zehnfacher Verdünnung und während den Versuchsbedingungen der Gelelektrophorese stabil (Abb. 3.2b). Schwächere Banden mit schnellerer Laufweite deuten an, dass die Probe auch geringe Mengen an Nebenprodukten enthält. Da die DNA-Einzelstränge in den Kristallisationstropfen allerdings bei deutlich höheren Proben- und Kationenkonzentrationen assemblieren, ist davon auszugehen, dass die Faltungsausbeute von DNA-Dreiecken in den Kristallisationstropfen tendenziell höher als in den gelelektrophoretischen Mobilitätsanalysen ist.

Die hier untersuchte Variante mit G-Überhängen an den 5'-Enden der L-Stränge und C-Überhängen an den 5'-Enden der S-Stränge (G-Variante) bildete in beiden Puffersystemen üblicherweise nach fünf bis zehn Tagen Kristalle mit Parallelotop-förmiger Kristalltracht (Abb. 3.2c). Um den Vergleich mehrerer Ansätze zu erleichtern wurde ein Punktesystem eingeführt, das die Kristalle anhand ihrer Form und Größe, anhand eventueller Verwachsungen, sowie anhand beobachtbarer Defekte in den Seitenflächen oder -kanten bewertet (Abb. 3.2d, siehe auch Abb. B.1). Eine Kristallwertung von 100 Punkten entspricht beispielsweise einem makellosen, rhomboedrischen Kristall mit einer Kantenlänge von 200 μm .

Die Kristallisation des DNA-Dreiecksmotivs wurde über einen Bereich von 0,6–60 μM Probenkonzentration im equilibrierten Tropfen untersucht. Nach zehn Tagen und erneut nach etwa 150 Tagen Inkubationszeit wurden die Ansätze lichtmikroskopisch dokumentiert. Im Konzentrationsbereich von 20–60 μM DNA-Dreieck kristallisierte die G-Variante in Puffer I ebenso reproduzierbar wie in Puffer II in allen angesetzten Tropfen (Abb. 3.2c, d). Bei geringeren Konzentrationen wurde das Kristallwachstum des DNA-Dreiecks in Puffer I stochastisch: nur in manchen Tropfen bildeten sich kleine Kristalle ($\sim 50 \mu\text{m}$ Kantenlänge), in den meisten Tropfen waren, trotz identischer Bedingungen, zunächst keine makroskopischen Kristalle zu erkennen. Nach deutlich längerer Inkubationszeit von bis zu 150 Tagen hatten sich jedoch auch hier in allen Tropfen Kristalle von ähnlicher Größe gebildet (Abb. 3.2c, oben). In Puffer II kristallisierte das DNA-Dreieck auch bei geringen Konzentrationen von bis zu 6 μM bereits nach zehn Tagen, nach längerer Inkubationszeit wurden keine zusätzlichen Kristallisationsereignisse beobachtet (Abb. 3.2c, unten). Niedrigere Kristallwertungen für Kristalle, die in Puffer II wuchsen, spiegeln einen Trend zu stärkeren Defekten an den Seitenflächen der Kristalle wider, was auf eine schnellere Wachstumsrate bei diesen Pufferbedingungen schließen lässt. Dies zeigte sich insbesondere bei niedrigen Probenkonzentrationen, bei denen die Wachstumsrate in Puffer II im Bereich von zehn Tagen lag, während die Rate für das Kristallwachstum in Puffer I zum Teil deutlich langsamer war (Abb. 3.2c, d). Die in 3.1.1 aufgelisteten Eigenschaften von Puffer II führen insgesamt zu einer erhöhten Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation der DNA-Dreiecke, was eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede in den Wachstumsraten sein kann.

Eine genaue Messung der Kristallisationsraten in Puffer I und II wären weitere Schritte um die Kinetik der DNA-Dreieckskristallisation in diesen beiden Bedingungen besser zu verstehen. Dies wurde beispielsweise in anderen in der Literatur beschriebenen Arbeiten mit Hilfe von Mikrofluidik-Ansätzen erreicht, mit denen die zeitaufgelöste Auswertung zahlreicher paralleler Kristallisationstropfen möglich ist [76].

3.2 Stöchiometrie der Stränge

Bei der Assemblierung mehrsträngiger Objekte kann die Stöchiometrie der Einzelstränge das Verhältnis zwischen korrekten und defekten Strukturen beeinflussen. Besonders teilweise assemblierte Objekte könnten das Kristallwachstum durch kompetitive Wechselwirkungen mit dem Kristallgitter stören. Um den Einfluss der Stöchiometrie der Einzelstränge L, M

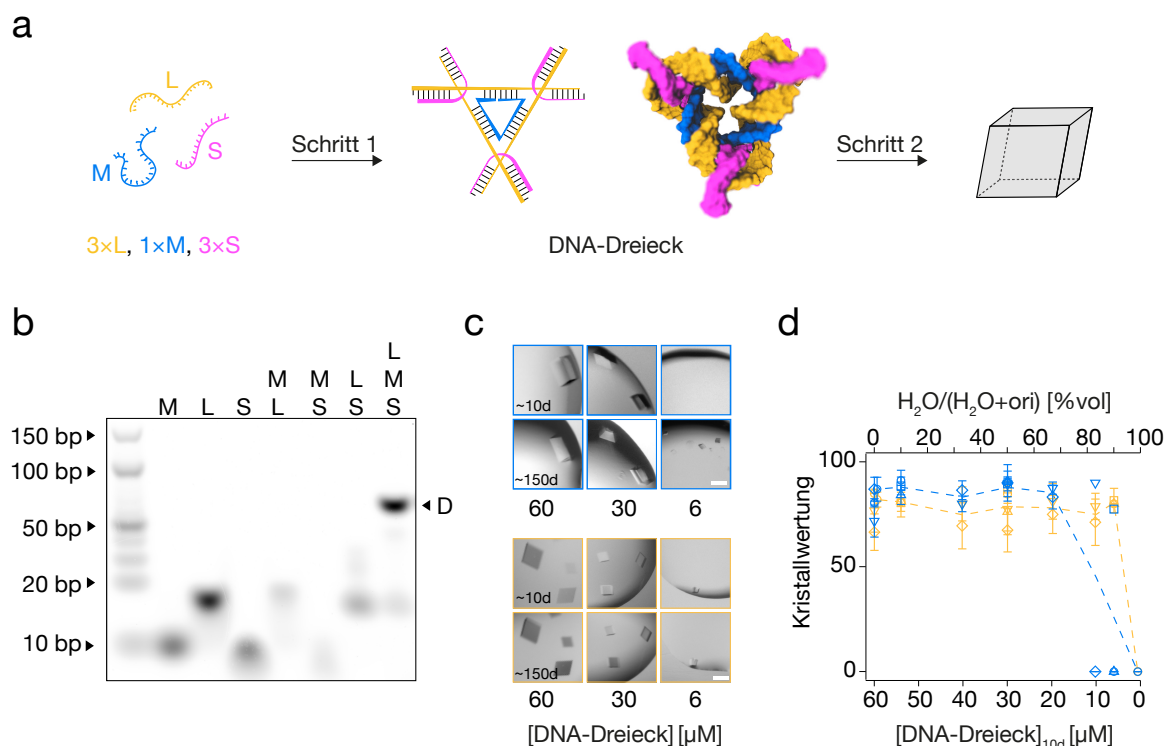


Abbildung 3.2 – Kristallisation des DNA-Dreiecks als Funktion der Probenkonzentration. (a) Schematische Darstellung des Reaktionswegs zur Bildung von DNA-Dreieckskristallen aus den Oligonukleotiden L, M und S. 3D-Modell: 3gbi.pdb [18] (b) Abbildung einer gelelektrophoretischen Mobilitätsanalyse der Stränge L, M, und S und ihrer Mischungen. D markiert die Laufweite des DNA-Dreiecksmotivs. (c) Typische Bilder von Kristallen, die in Puffer I (blau) bzw. Puffer II (gelb) gewachsen waren. Gezeigt sind dieselben Tropfen nach 10 (oben) und nach 150 (unten) Tagen Inkubationszeit. Maßstab: 100 µm. (d) Kristallwertung aus je vier identischen Tropfen in Abhängigkeit von der Probenkonzentration. Die untere x-Achse zeigt die Probenkonzentration in den equilibrierten Tropfen, die obere x-Achse gibt die entsprechende Verdünnung der Ausgangsprobe (0) durch Zugabe von Wasser an. Sie dient dem Vergleich mit Experimenten aus Kapitel 2, bei denen statt Wasser modifizierte Stränge zur Probe gemischt wurden. Gestrichelte Linien dienen der optischen Führung; Farbmarkierung wie in (c); Symbole (Rauten, Vierecke, Kreise, Dreiecke nach oben und nach unten) markieren Daten aus fünf verschiedenen Kristallplatten; Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus je vier Tropfen an. Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

und S auf die Kristallisation des DNA-Dreiecks zu untersuchen, wurden drei Titrationsreihen angesetzt, in denen die Konzentration von je einem der Stränge L, M oder S entsprechend der angegebenen stöchiometrischen Faktoren (0,3–2) in Bezug auf die Originalzusammensetzung $L:M:S=3:1:3$ verändert wurde.

Das DNA-Dreieck kristallisierte selbst für starke Missverhältnisse der Einzelstränge innerhalb von zehn Tagen. In Tropfen mit 0,3-fachem Unterschuss des S-Strangs bildeten sich zunächst keine Kristalle innerhalb von zehn Tagen, doch auch hier wurden in Puffer I nach etwa 150 Tagen kleine Kristalle beobachtet (Abb. 3.3 a, b). Bei diesen Bedingungen lag ein 3,3-facher Überschuss der L- und M-Stränge über den S-Strang vor. Auf Grund der Stöchiometrie der Stränge im DNA-Dreieck ist davon auszugehen, dass hier in Lösung viele fehlgefaltete DNA-Dreiecke vorliegen und die effektive Konzentration intakter DNA-Dreiecke im equilibrierten Tropfen geringer als die theoretisch möglichen 18 µM war. Die langsame Kristallisationsrate und die kleine Größe der Kristalle, die sich nach 150 Tagen gebildet hatten,

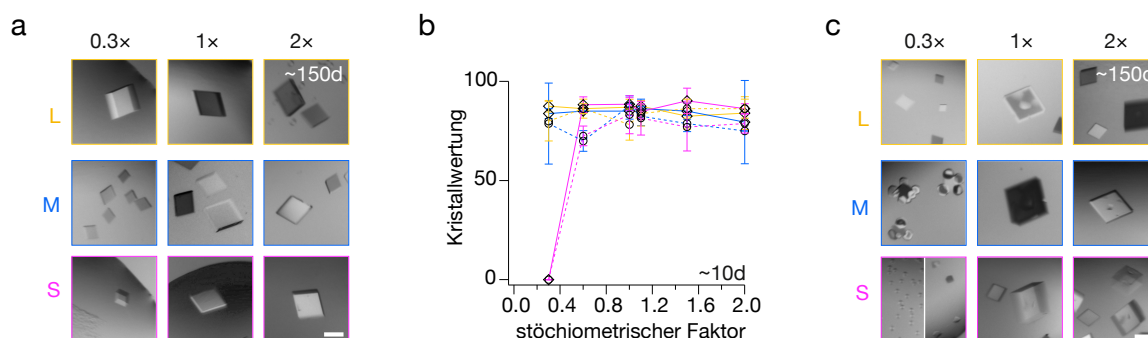


Abbildung 3.3 – Kristallisation des DNA-Dreiecks in stöchiometrischem Ungleichgewicht der Einzelstränge L, M, und S. Typische Kristallbilder und Kristallwertungen aus den Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen der Stränge L, M oder S. **(a)** Kristalltropfen mit Puffer I nach 150 Tagen. **(b)** Kristallwertungen für Puffer I (Rauten) und Puffer II (Kreise) nach zehn Tagen Inkubationszeit. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen an. **(c)** Kristalltropfen mit Puffer II nach 150 Tagen. Im Rahmen links unten sind Bildausschnitte zweier Tropfen mit identischen Bedingungen gezeigt. Maßstäbe: 100 μm . Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

ähnelten dem Kristallisationsverhalten des DNA-Dreiecks bei korrekter Stöchiometrie und einer Konzentration von 6 μM (vgl. Abb. 3.2 c). Bei 0,6-fachem Unterschuss des S-Strangs lag immer noch ein signifikanter Überschuss der L- und M-Stränge vor (1,8-fach), die effektive Konzentration intakter Dreiecke war hier im Vergleich zum 0,3-fachen Unterschuss allerdings höher. Bei diesen Bedingungen bildeten sich trotz Gegenwart fehlgefalteter Nebenprodukte innerhalb von zehn Tagen große Kristalle. Insgesamt deuten diese Resultate darauf hin, dass eher die Konzentration an intakten DNA-Dreiecken als die potentiell störenden Interaktionen fehlgefalteter Dreiecke mit dem Kristallgitter ausschlaggebend für die Kristallisation ist.

In Puffer II kristallisierte die Probe mit 0,3-fachem Unterschuss des S-Strangs nicht innerhalb von zehn Tagen, im Gegensatz zu Proben mit geringen Konzentrationen, aber korrekter Strangstöchiometrie (siehe Abb. 3.2 b). Nach 150 Tagen hatten sich in drei der vier Tropfen Sphärolithe gebildet und nur ein Tropfen enthielt kleine Kristalle (Abb. 3.3 c). Bei einem 0,3-fachen Unterschuss des M-Strangs bildeten sich zunächst typische DNA-Kristalle innerhalb von zehn Tagen, jedoch waren diese nach 150 Tagen Inkubationszeit von kristallinen Aggregaten überwachsen (Abb. 3.3 b, c). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die stärkere Kristallisationstriebkraft, die für Puffer II beobachtet wurde, in Mischungen mit einem hohen Anteil defekter Nebenprodukte von Nachteil sein kann. Nichtsdestotrotz zeigten die Experimente insgesamt, dass die Kristallisation des DNA-Dreiecksmotivs auch in zum Teil starken stöchiometrischen Ungleichgewichten reproduzierbar abläuft und nur in Grenzfällen beeinträchtigt ist.

3.3 Kristallisation in Gegenwart von DNA-Verunreinigungen

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts stellten bereits dar, dass die Kristallisation des Modellsystems auch für falsch eingestellte Strangstöchiometrien robust abläuft. Um diese Robustheit weiter zu testen, wurde das Kristallisationsverhalten in Gegenwart anderer Oligonukleotide mit zufälligen Sequenzen untersucht. Hierfür wurde eine Kompetitorenmischung aus 179 verschiedenen, jeweils 42 Basen langen Oligonukleotiden erstellt, mit den drei Strängen des DNA-Dreiecks vermischt und zur Kristallisation angesetzt (Abb. 3.4 a). Die Sequenzen

der Kompetitorenstränge entsprachen revers-komplementären Abschnitten einer Variante des M13-Phagen-genoms, das üblicherweise in der Herstellung von DNA-Origami-Objekten Verwendung findet. Eine Sequenzanalyse der Kompetitorenmischung ergab, dass für jeden der Dreiecksstränge mehr als 1000 Möglichkeiten existierten, drei Basen lange Watson-Crick-Interaktionen mit den Kompetitoren auszubilden. Für sieben Basen lange Interaktionen existierten in der Kompetitorenmischung immer noch 14 revers-komplementäre Abschnitte zum M-Strang (Abb. 3.4 b).

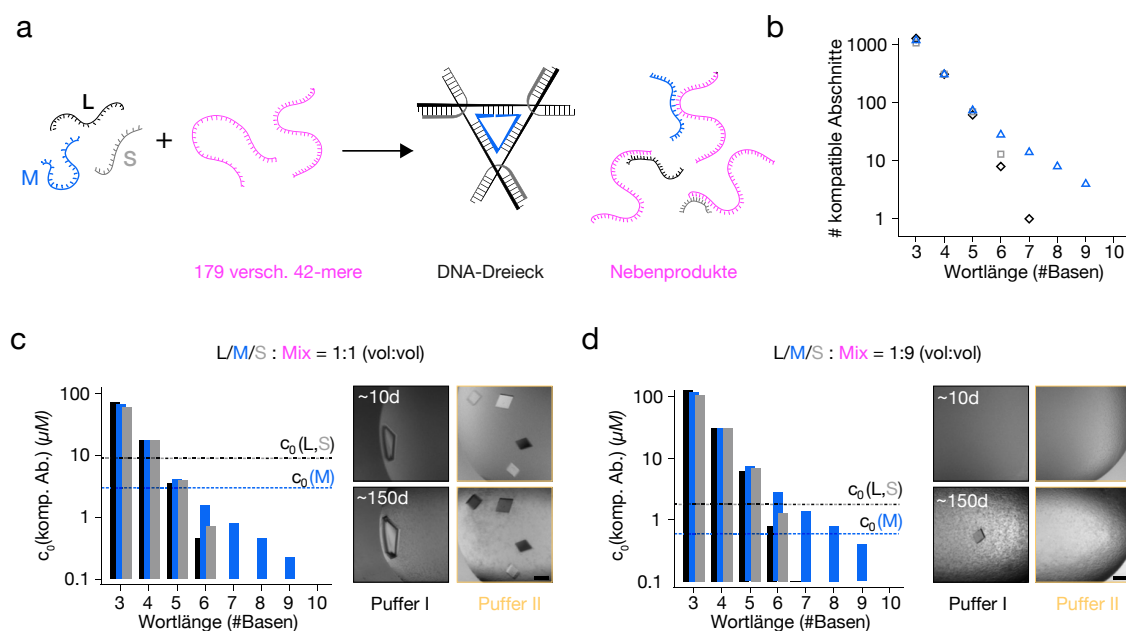


Abbildung 3.4 – Kristallisation des DNA-Dreiecks in Gegenwart kompetitierender Stränge. (a) Schematische Darstellung erwarteter Produkte und Nebenprodukte der Assemblierungsreaktion der Dreiecksstränge L, M und S in Gegenwart einer Mischung aus 179 verschiedenen 42-meren mit Zufallssequenz. (b) Statistik der revers-komplementären Regionen in den zufälligen Kompetitoren mit den Dreieckssträngen L (schwarze Raute), M (blaue Dreiecke) oder S (graue Vierecke). (c, links) Vergleich der Konzentrationen der Dreiecksstränge L, M und S (gestrichelte Linien) mit den effektiven Konzentrationen der revers-komplementären Abschnitte zwischen den 179 Kompetitorensträngen und den Dreieckssträngen L, M oder S (Säulen, Farbkodierung wie in (b)). Die Werte geben die Anfangskonzentration in einem 1:1 (vol:vol)-Gemisch aus Dreieckssträngen und Kompetitorenmischung an. (c, rechts) Typische Bilder von Kristallen, die bei der angegebenen Konzentration in Puffer I (schwarz) und Puffer II (orange) gewachsen waren und nach etwa zehn (oben) bzw. nach etwa 150 Tagen (unten) dokumentiert wurden. (d) Daten wie in (c), aber für ein 1:9 (vol:vol)-Gemisch aus Dreieckssträngen und Kompetitorenmischung. Maßstäbe: 100 μm . Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

Bei einem 1:1(vol:vol)-Mischungsverhältnis der Dreiecksstränge mit der Kompetitorenmischung entsprach die maximale Konzentration der DNA-Dreiecke im equilibrierten Tropfen 30 μM , während die effektive Konzentration drei Basen langer revers-komplementärer Abschnitte 700 μM betrug, und sieben Basen lange revers-komplementäre Abschnitte noch in einer effektiven Konzentration von 8 μM vorlagen (Abb. 3.4 c, Abbildung listet Anfangskonzentrationen in den Tropfen). Trotz der Gegenwart der Kompetitoren bildeten sich die DNA-Dreiecke in diesen Mischungen in beiden Puffern robust aus und kristallisierten innerhalb

von zehn Tagen. Kristalle aus diesen Gemischen wurden von Carina C. de Oliveira Mann¹ in einer ersten Testmessung auf ihr Streuvermögen von Röntgenstrahlung² untersucht. Diese Daten stellen eine grobe Kartierung des Streuvermögens aus vier Winkeleinstellungen dar, können jedoch nicht zur Indexierung der Kristalle, zur Bestimmung der Raumgruppe oder zur Auflösung der Kristallstruktur verwendet werden. Kristalle, die in Gegenwart der Kompetitorenstränge in Puffer I bzw. Puffer II gewachsen waren, erzeugten ähnliche Streumuster mit Reflexionen vergleichbarer Auflösung wie Kristalle, die in Abwesenheit störender Stränge gewachsen waren (Abb. 3.5). Diese Daten deuten an, dass das Streuvermögen der Kristalle durch die Präsenz der Störfaktoren nicht stark negativ beeinflusst wurde. Die tatsächliche Auflösung der Kristalle kann auch von Kristall zu Kristall schwanken (vgl. Abb. 3.5 a und Abb. 4.11 a) und erfordert die Messung kompletter 360° Datensätze in kleinen Rotationschritten, deren Messung im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte.

In Kristallisationsansätzen, in denen der Anteil von Kompetitoren weiter erhöht und die maximal mögliche Konzentration von DNA-Dreiecken im equilibrierten Tropfen auf 6 μM verringert wurde, bildeten sich in beiden Puffern keine Kristalle nach zehn Tagen. Nach längerer Inkubationszeit von etwa 150 Tagen bildeten sich in Puffer I jedoch neben Präzipitaten auch kleine Kristalle mit typischer, Parallelotop-förmiger Morphologie. Das Kristallisationsverhalten des Dreiecksmotivs entsprach in Puffer I, auch in Anwesenheit zahlreicher anderer Oligonukleotide, im Wesentlichen dem konzentrationsabhängigen Kristallisationsverhalten in Abwesenheit anderer Stränge, das in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde.

In Puffer II zeigten sich Unterschiede im Kristallisationsverhalten in An- und Abwesenheit der kompetitierenden Stränge. In Abwesenheit der Kompetitoren kristallisierten die DNA-Dreiecke auch in Tropfen mit vergleichsweise geringen Konzentrationen von 6 μM Dreiecken innerhalb von zehn Tagen (vgl. Abb. 3.2 c, d). Nach dieser Zeit hatten sich in Puffer II jedoch in Anwesenheit der Kompetitorenstränge keine Kristalle, dafür aber bereits Präzipitate gebildet. Dies deutet an, dass die DNA-Moleküle im Tropfen, darunter vermutlich auch ein Teil der DNA-Dreiecksstränge oder der bereits assemblierten DNA-Dreiecke, aggregierten. Nach 150 Tagen konnten lediglich mikrokristalline Splitter und noch stärkere Präzipitatbildung beobachtet werden (Abb. 3.4 d). In Puffer II war das Kristallwachstum demnach in Tropfen mit starkem Hintergrund der Kompetitorenstränge und niedrigen Konzentrationen der DNA-Dreiecke inhibiert. Auch hier zeigt sich, wie bei den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2, dass die Zusammensetzung von Puffer II für die Kristallisation geringer Probenmengen vor starkem Hintergrund fehlgefalteter und anderer DNA-Spezies von Nachteil sein kann.

Fazit aus den Experimenten mit Kompetitorensträngen

Diese Versuche zeigten zum einen, dass die Faltung des DNA-Dreiecksmotivs hochspezifisch abläuft und von der Gegenwart der zahlreichen verschiedenen 42-mere nicht gehemmt wurde. Zum anderen zeigten diese Versuche, dass sich die Kristalle auch vor dichtem Hintergrund hochkonzentrierter DNA-Stränge ausbildeten. In den equilibrierten Tropfen, in denen sich noch Kristalle bildeten, hatten die DNA-Dreiecke eine Konzentration von 30 μM bzw. 6 μM , während insgesamt eine Konzentration von 500 μM bzw. 900 μM anderen, längeren Kompetitorensträngen vorlag (Abb. 3.4 c, d). Die Präzipitatbildung in den Tropfen nach längerer Inkubationszeit deutet an, dass das DNA-Material im Hintergrund in den equilibrierten Tropfen auch nach zehn Tagen bereits nah an der Löslichkeitsgrenze war.

¹Lehrstuhl für strukturelle Molekularbiologie, AG Hopfner am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

²Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz

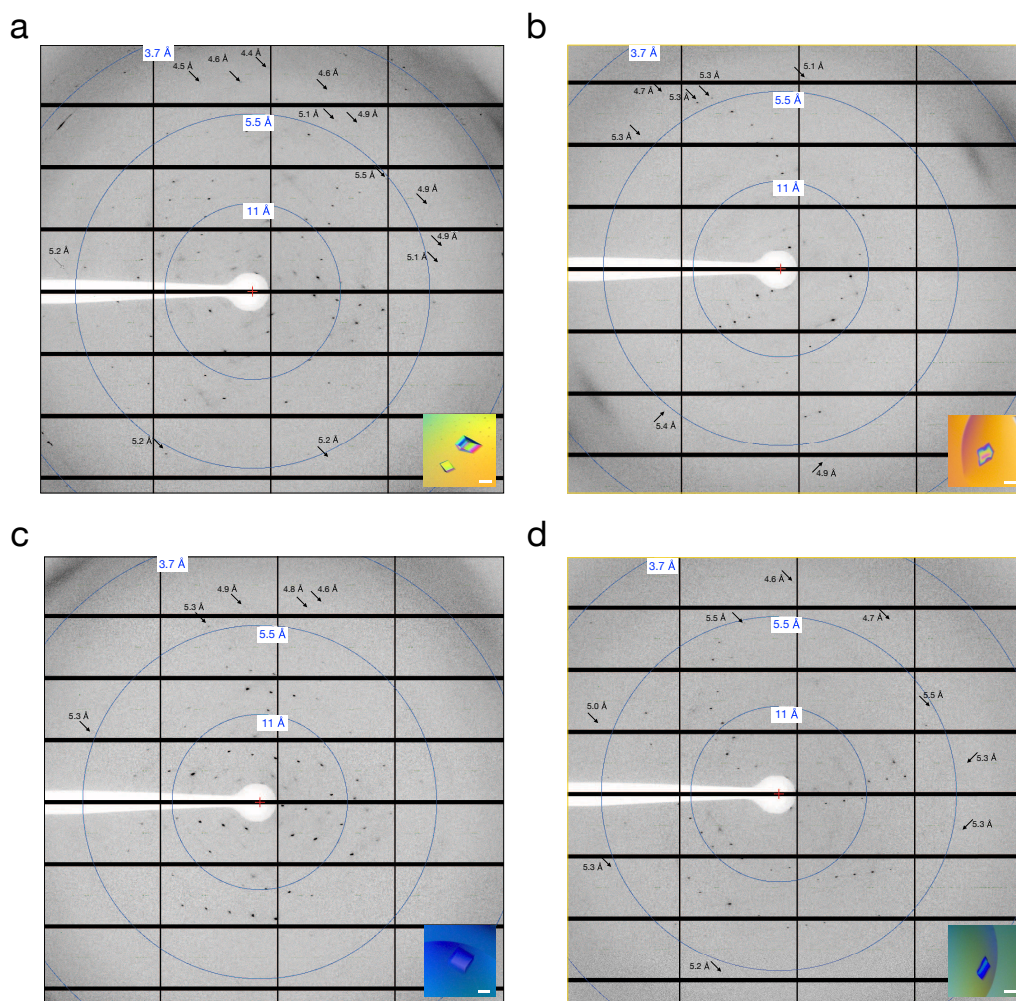


Abbildung 3.5 – Vergleich der Streumuster von Kristallen aus Tropfen mit und ohne störender Kompetitorenstränge. (a,b) Streumuster von DNA-Dreieckskristallen, gewachsen in Puffer I (a) und Puffer II (b). (c,d) Streumuster von DNA-Dreieckskristallen, gewachsen in 1:1(vol:vol)-Gemischen aus Dreieckssträngen und Kompetitorenmischung in Puffer I (c) und Puffer II (d). Bildeinsätze zeigen typische Kristalle in den Tropfen aus denen Kandidaten zur Kryokonservierung extrahiert wurden. Maßstäbe: 100 μm .

3.3.1 Proteinverunreinigungen

Als nächster Schritt in der Charakterisierung des Kristallisationsverhaltens des DNA-Dreiecksmotivs wurde dessen Robustheit gegenüber der Gegenwart einzelner Proteine getestet. Auf Grund der Vielfalt und Komplexität der Proteinwelt wird jedes Protein in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen unterschiedliche Auswirkungen auf die Kristallisation des Dreiecksmotivs haben. In dieser Arbeit wurden beispielhaft zwei Proteinkandidaten ausgewählt:

- Rinderalbumin (BSA) als generisch klebriges, aggregierendes Protein (Abb. 3.6 a).
- Das DNA-bindende Fragment des Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektorproteins (TAL-Protein) [89] als DNA-bindendes Protein mit geringer Affinität zur Armregion zweier interagierender DNA-Dreiecke (Abb. 3.6 b).

Kristallisationsansätze in Gegenwart von BSA wurden für die Puffer I und II angesetzt und lieferten vergleichbare Ergebnisse (Abb. 3.6 a zeigt Daten für Puffer I). DNA-Dreieckskristalle bildeten sich in beiden Puffern auch in Gegenwart signifikanter Proteinkonzentrationen von $30\text{ }\mu\text{M}$ BSA. Die Proteine selbst hatten keinen ersichtlichen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten der DNA-Dreiecke, allerdings störten die Pufferkomponenten der BSA-Lösung³ in 1:1 (vol:vol)-Mischungsverhältnissen von Dreiecken zu Proteinlösung bereits die Aufkonzentration der Tropfen, sodass hier keine Aussage über die Auswirkung der BSA-Proteine selbst auf das Kristallisationsverhalten der DNA-Dreiecke möglich war. Weitere Ansätze mit einer höher konzentrierten Proteinlösung oder mit ausgetauschtem Proteinpuffer wären mögliche nächste Schritte um diesen Zusammenhang näher zu prüfen.

Die Kristallisationsansätze in Gegenwart eines TAL-Proteins wurden zusammen mit Florian Praetorius⁴ durchgeführt, der das verwendete TAL-Konstrukt im Vorfeld kloniert, exprimiert und aufgereinigt hatte. Die Kristallisationstropfen wurden in Puffer II mit bereits assemblierten DNA-Dreiecken angesetzt. Die Sequenz der verwendeten Dreiecksvarianten war in der Armregion so verändert, dass zwei wechselwirkende DNA-Dreiecke eine acht Basen lange Erkennungssequenz bildeten, an die das TAL-Protein mit geringer Affinität binden konnte. Die DNA-Dreiecke kristallisierten in Gegenwart von bis zu $60\text{ }\mu\text{M}$ des DNA-bindenden Proteins, das sofort nach dem Mischen der Probenlösungen mit DNA-Dreiecken und mit Proteinen Aggregate bildete. Dies zeigt die Robustheit der Kristallisation des DNA-Dreiecks auch vor dichtem Hintergrund aus Proteinaggregaten. In Gegenwart höherer Proteinkonzentrationen bildeten sich noch dichtere Präzipitate und es wurde kein Kristallwachstum mehr beobachtet. Dies lag vermutlich zum Großteil an der Tatsache, dass die DNA-Dreiecke in den Aggregaten eingeschlossen waren. Diese Hypothese ließe sich in Kristallisationsansätzen überprüfen, die DNA-Dreiecke mit fluoreszenzmarkierten M-Strängen enthalten [90]. Eine Kolo-kalisation des Fluoreszenzsignals mit der Struktur des Präzipitats würde bestätigen, dass die DNA-Dreiecke von den Aggregaten sequestriert werden.

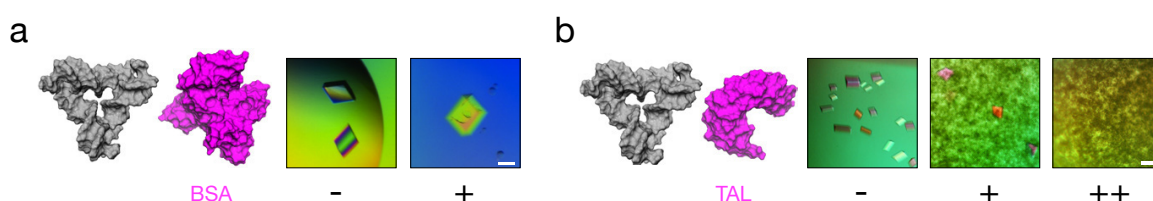


Abbildung 3.6 – Kristallisation des DNA-Dreiecks in Gegenwart von Proteinen. (a) 3D-Modelle [7] des DNA-Dreiecks (3gbi.pdb [18]) und des Proteins Rinderserumalbumin (BSA)(4f5s.pdb [91]) neben typischen Bildern von Kristallen, die bei einer DNA-Dreieck-Konzentration von $54\text{ }\mu\text{M}$ in Abwesenheit (links) und Gegenwart (rechts) von $30\text{ }\mu\text{M}$ BSA wuchsen. Bilder zeigen Daten für Puffer I. (b) 3D-Modelle des DNA-Dreiecks und eines N-terminalen Fragments eines Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektorproteins (TAL) (4osh.pdb [92]) neben typischen Bildern von Kristallisationsansätzen bei einer DNA-Dreieck-Konzentration von $60\text{ }\mu\text{M}$ in Abwesenheit (links) und Gegenwart von $60\text{ }\mu\text{M}$ (Mitte) und $120\text{ }\mu\text{M}$ (rechts) TAL-Protein in Puffer II. Maßstäbe: $100\text{ }\mu\text{m}$. Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

³Die BSA-Lösung stammte von der Firma *New England Biolabs GmbH* und enthielt $\sim 150\text{ }\mu\text{M}$ BSA, 20 mM Tris-HCl, 100 mM Kaliumchlorid, $0,1\text{ mM}$ EDTA und 50% Glycerin

⁴seit 2012 Doktorand in der AG Dietz, TU München

Fazit aus den Experimenten zu Proteinverunreinigungen

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen dass die Kristallisation des DNA-Dreiecks auch vor signifikantem Hintergrund aggregierender Proteine stattfinden kann, wenngleich zu starke Proteinaggregation und veränderte Pufferkomponenten den Kristallisationsprozess stören können. Die Aggregation der Proteine kann sowohl durch den Kontakt mit der DNA als auch durch die Mischung der Pufferkomponenten im Protein- und DNA-Puffer induziert worden sein. Die Einsichten aus diesen Experimenten sind insbesondere für die Realisierung von Wirt-Gast-Kristallen interessant, in denen DNA-Dreiecke die Kokristallisation von Peptid- und Proteinmolekülen auch vor teilweise aggregierendem Hintergrund der Gastmoleküle vermitteln könnten. Die Versuche zeigen außerdem, dass weiterführende Ansätze mit DNA-Dreiecken und Proteinen, die an das DNA-Dreieck binden, insbesondere im Hinblick auf die Identifizierung von Pufferbedingungen, die sowohl für die Kristallisation des DNA-Dreiecks als auch für die Stabilität der Proteine ideal sind, eine besondere Herausforderung sein werden.

3.4 Vergleich der G- und GA-Varianten

Die Kristallwachstumsstudien in dieser Arbeit wurden mit einer Variante durchgeführt, die G-Überhänge an den 5'-Enden der L-Stränge und C-Überhänge an den 5'-Enden der S-Stränge aufwies (G-Variante). Bisher publizierte Arbeiten beziehen sich hingegen auf ein Dreiecksmotiv mit zwei überhängenden Basen an den Duplexenden (GA-Variante: 5'-GA-Überhang am L-Strang, bzw. 5'-TC-Überhang am S-Strang; siehe auch Abb. 3.7 a) [18, 56, 58, 59, 90]. Ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen Überhänge auf das Kristallisationsverhalten der Dreiecksmotive wurde zunächst im Vergleich beider Varianten in verschiedenen Puffersystemen getestet. Hierfür wurden jeweils über 200 Kristallisationsansätze der G- bzw. GA-Variante bei einer Konzentration von 60 μM im equilibrierten Probentropfen untersucht.

Grundsätzlich bildeten beide Varianten ähnliche Kristalle mit Parallelotop-förmiger Kristalltracht. Während die G-Variante jedoch in allen Tropfen in Puffer I und II kristallisierte, bildete die GA-Variante innerhalb von zehn Tagen nur in 35 % der Tropfen mit Puffer I und in 93 % der Tropfen mit Puffer II Kristalle (Abb. 3.7 b, c). Nach deutlich längerer Inkubationszeit von etwa 150 Tagen bei einer kühleren Temperatur von 10 °C statt der üblichen 20 °C hatten sich in den meisten Tropfen mit Puffer I auch aus den GA-Varianten Kristalle gebildet, jedoch wurden zumeist zahlreiche kleine Kristalle und Mikrokristalle und nur in manchen Tropfen zusätzlich große Kristalle beobachtet (vgl. Abb. 3.2 c und Abb. 3.7 c).

Um den Einfluss des Puffersystems auf die Kristallisation der Dreiecksmotive näher zu untersuchen, wurden zwei weitere Puffer getestet, die neben Tris-HCl ausschließlich monovalente Kationen (Puffer III) oder eine Mischung aus mono- und divalenten Kationen (Puffer IV) enthielten (Abb. 3.7 d). In Puffer III kristallisierte keine der beiden Dreiecksvarianten. Hier ist zu berücksichtigen, dass die effektive Probenkonzentration des DNA-Dreiecks im equilibrierten Tropfen hier wegen der hohen Natriumchloridkonzentration in Puffer III niedriger war, als für die anderen Pufferbedingungen. Selbst bei Verwendung einer fast gesättigten, 4 M Natriumchloridlösung konnte nicht wie in den anderen Bedingungen eine zehnfache Reduktion des Tropfenvolumens erzeugt werden. Die finale Probenkonzentration der DNA-Dreiecke betrug hier in etwa 24 μM anstatt 60 μM . Die G-Variante zeigte aber auch bei einer niedrigeren Konzentration von 20 μM in anderen Pufferbedingungen durchaus immer noch reproduzierbares Kristallwachstum (Abb. 3.2 d). Die Tatsache, dass sich speziell in Puffer III keine Kristalle

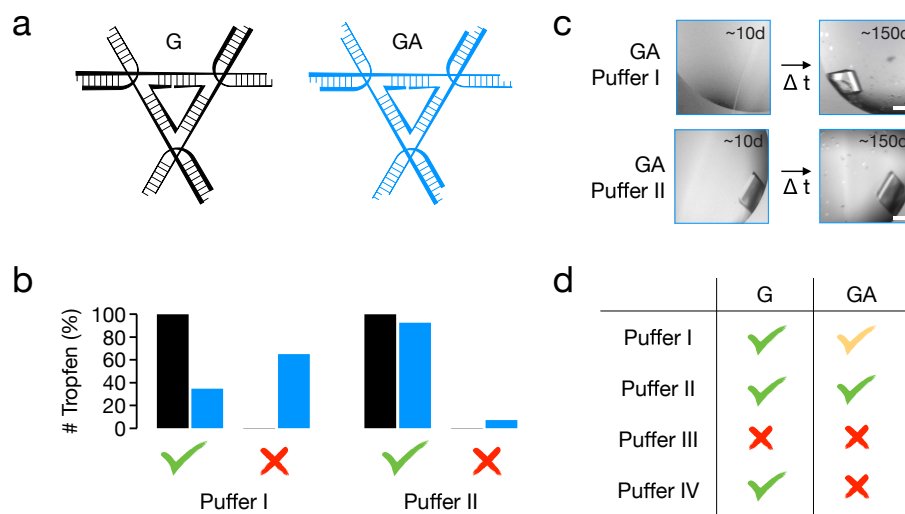


Abbildung 3.7 – Kristallisation der G- und GA-Varianten in verschiedenen Puffern. **(a)** Schematische Darstellung der G-Variante (schwarz) und der GA-Variante (blau). **(b)** Anteil der Tropfen mit (Häkchen) und ohne (Kreuzchen) Kristallwachstum in Puffer I und II bei einer DNA-Dreieck-Konzentration von $60 \mu\text{M}$ im equilibrierten Tropfen (schwarz: G-Variante, blau: GA-Variante). **(c)** Typische Kristallbilder der GA-Variante in Puffer I und II nach etwa zehn und 150 Tagen Inkubationszeit. Maßstab: $100 \mu\text{m}$. **(d)** Vergleich des Kristallwachstums der G- und GA-Varianten für vier verschiedene Puffersysteme und eine DNA-Dreieck-Konzentration von $60 \mu\text{M}$. Grünes Häkchen: Kristalle in allen Tropfen; oranges Häkchen: Kristalle in manchen Tropfen (siehe (b)); Kreuzchen: keine Kristalle in allen Tropfen ($N \approx 220$ für Puffer I und II, $N = 8$ für Puffer III und IV). Puffer I und II siehe Abb.3.1b; Puffer III: 25 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 M Natriumchlorid; Reservoir: 4M NaCl; Puffer IV: 25 mM Tris-HCl pH 8,5, 55 mM Magnesiumchlorid, 55 mM Natriumchlorid; Reservoir: zehnfache Stammlösung von Puffer IV.

bei einer Konzentration von $24\text{ }\mu\text{M}$ bildeten, legt daher nahe, dass Natriumchlorid alleine nicht als Gegenion ausreicht um die Kristallisation des DNA-Dreiecks zu ermöglichen. In Puffer IV, der Natrium- und Magnesiumionen enthält, kristallisierte die G-Variante in allen acht getesteten Tropfen. In den Proben tropfen mit der GA-Variante bildeten sich bei diesen Bedingungen jedoch keine Kristalle (Abb. 3.7 d).

Der Vergleich der beiden Dreiecksvarianten verdeutlicht, dass die Beschaffenheit des Überhangs ausschlaggebend für die Robustheit des Kristallisationsverhaltens der Dreiecksmotive sein kann. Die Versuche zur Konzentrationsabhängigkeit der Kristallisation der G-Variante in Abschnitt 3.1.2 und die Angaben zur Kristallisation der GA-Variante in vorherigen Publikationen [18, 56, 58, 59, 90] bestätigen, dass in den Proben tropfen ausreichend Material zur Kristallbildung vorhanden war. Dies wird auch dadurch deutlich, dass identische Probenmengen in Puffer II überwiegend Kristalle bildeten, während sie in Puffer I in Lösung blieben. Obwohl der Überhang der G-Variante mit nur einer Base an den 5'-Enden der Duplexe eine schwächere thermodynamische Stabilisierung der Sticky-End-Interaktion mit sich bringt, kristallisierte die G-Variante im Vergleich zur GA-Variante häufiger. Die G-Variante wies zudem eine geringere Sensibilität auf Veränderung der Pufferbedingung im Kristallisationsansatz auf. Eine Mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass zu starke Interaktionen notwendige Umorganisationen im Kristallgitter erschweren können und der Nukleations- und Kristallwachstumsprozess dadurch kinetisch inhibiert werden kann [16, 72, 93]. Die Zusammensetzung von Puffer II wäre demnach günstiger, um auch die Umorganisation stärkerer Sticky-End-Interaktionen zuzulassen.

3.5 Stärke der Sticky-End-Interaktion

Die diskutierten Unterschiede im Kristallisationsverhalten der G- und GA-Dreiecksvarianten legen den Einfluss der Interaktionsstärke auf den Kristallisationsprozess dar. Um den Bereich günstiger Interaktionsstärken für robustes Kristallwachstum enger abzustecken, wurden Sequenzvariationen der G-Variante hergestellt, die sich einzig in den Positionen der Nachbarbasenpaare zum Sticky End unterscheiden. Bei der Sticky-End-Interaktion bilden diese Basenpaare Stapelwechselwirkungen mit dem neu gebildeten Basenpaar aus den 5'-Überhängen aus (Abb. 3.8 a). Die Stärke der Basenpaarstapelwechselwirkungen ist sequenzabhängig, so dass sich für das G-C-Sticky End 16 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der beiden nächsten Nachbarnukleotidpaare ergeben.

Dreizehn dieser Sequenzvariationen wurden hergestellt, um die Stärke der G-C-Sticky-End-Interaktion fein zu modulieren und ihren Einfluss auf das Kristallisationsvermögen der DNA-Dreiecke zu untersuchen. Die effektive Interaktionsstärke der Partikel in den Proben tropfen hängt vom Zusammenspiel zahlreicher Parameter ab, wie beispielsweise der Partikelbeschaffenheit, der vorliegenden Temperatur und den Pufferbedingungen. Um diesen Zusammenhang zu berücksichtigen, wurden die 13 Sequenzvarianten vor dem Ansetzen der Kristallisationsplatten annealt, dann mit den Puffern I bzw. II vermischt und bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen inkubiert. Nach 21 Tagen wurden die gewachsenen Kristalle anhand ihrer Größe klassifiziert (Abb. 3.8 b).

3.5.1 Puffer I

Die Daten zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur und dem Sticky-End-Motiv der getesteten Varianten. In Puffer I bildete keine der Varianten Kristalle bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,

während fast alle Varianten bei 4 °C zu überwiegend kleinen Kristallen und kristallinen Splittern wuchsen. Gute Kristalle mit Kantenlängen $> 80 \mu\text{m}$ wuchsen überwiegend bei mittleren Temperaturen von 25 °C oder in Platten, die bei einem Temperaturgradienten von 60–20 °C und anschließend bei 20 °C inkubiert wurden. In den Tropfen, die nach dreiwöchiger Inkubation bei 37 °C keine Kristalle enthielten, konnten nach anschließender dreitägiger Inkubation bei Raumtemperatur Kristalle für jene Varianten beobachtet werden, die auch bei 25 °C kristallisierten. Eine Temperatur von 37 °C war demnach zu hoch für die Ausbildung von Dreieckskristallen, die DNA-Objekte bzw. die Dreiecksstränge blieben aber offensichtlich stabil und konnten aus den konzentrierten Tropfen heraus innerhalb weniger Tage kristallisieren, sobald geeignete Temperaturbedingungen gegeben waren. Eine Temperatur von 4 °C war hingegen für viele Sequenzvarianten bereits zu niedrig, um ideale Kristalle auszubilden.

Die relative Stärke der Sticky-End-Motive kann durch experimentell bestimmte thermodynamische Parameter des Nächste-Nachbarn-Modells in DNA-Duplexen [94] oder durch Parameter zu Basenpaarstapelenergien [28,95] zwischen dem neu gebildeten G-C-Basenpaar und seinen nächsten Nachbarn abgeschätzt werden. Während die Sortierung nach dem Nächste-Nachbarn-Modell keine offensichtliche Anordnung der Sequenzvarianten zeigte (vgl. Abb. A.1), lagen bei der Sortierung nach den Basenpaarstapelenergien jene Varianten, die bei mittleren Temperaturen große Kristalle bildeten, in einem Bereich von $\sim 1 \text{ kcal/mol}$ Breite dicht beieinander (Abb. 3.8 c). In diesem Bereich lagen neben der in dieser Arbeit näher untersuchten G-Variante (*aGa* in Abb. 3.8 c) vier weitere Sequenzvarianten des G-C-Sticky Ends (*tGt*, *gGa*, *aGg*, *gGg* in Abb. 3.8 c).

Bei kühleren Temperaturen kristallisierten diese fünf Varianten zunehmend in zahlreichen kleinen Kristallen und Splintern. Dagegen bildete eine andere Variante mit niedrigeren Stapelenergien (*tGg* in Abb. 3.8 c) ausschließlich bei 4 °C große Kristalle ($> 80 \mu\text{m}$), die sich bei Raumtemperatur innerhalb einiger Minuten wieder auflösten (siehe Abb. 3.9). Eine weitere Sequenzvariante mit noch niedrigerer Stapelenergie (*tGa* in Abb. 3.8 c) kristallisierte in Puffer I auch nicht bei 4 °C. Dieser Zusammenhang spiegelt thermodynamische Aspekte der abgeschätzten Interaktionsstärken wider: Dreiecke mit Sticky Ends, die mittlere Stapelenergiebeiträge durch die Nachbarbasen aufwiesen, bildeten bei mittleren Temperaturen große Kristalle aus, während die Interaktion dieser Dreiecke bei kühlen Temperaturen zu stark war, um Umorganisationen zu großen Kristallgittern zu ermöglichen. Sticky Ends mit noch schwächeren Interaktionen konnten nur bei kühlen Temperaturen stabile Kristallgitter ausbilden, die bei Raumtemperatur entsprechend instabil waren.

Die meisten Varianten, für die höhere Beiträge der Basenpaarstapelenergien als 3 kcal/mol pro Sticky End abgeschätzt wurden, kristallisierten in Puffer I entweder gar nicht, oder bildeten lediglich kleine Splitter bzw. Stäbe. Einzelne Varianten mit höheren Basenpaarstapelenergien bildeten zwar auch große Kristalle, jedoch nur bei kühleren Temperaturen von 16 °C (*cGt*) oder 4 °C (*cGc* in Abb. 3.8 c). Diese Kristalle waren im Gegensatz zu den Varianten mit niedriger Stapelenergie (*tGg*, *tGa* in Abb. 3.8 c), die ebenfalls ausschließlich bei kühleren Temperaturen kristallisierten, jedoch bei Raumtemperatur stabil. Die Temperaturstabilität der Kristalle stimmte demnach mit den zugeordneten thermodynamischen Stabilitäten aus der Abschätzung der Basenpaarstapelenergien überein. Die beobachtete Temperaturabhängigkeit wirkt allerdings unter thermodynamischen Aspekten kontrovers, weil kühlere Temperaturbedingungen zu starke Interaktionen durch geringere thermische Fluktuationen nur weiter stabilisieren. Eine ähnliche Temperaturabhängigkeit wurde aber beispielsweise auch für dieselben Versuche beobachtet, die mit der GA-Variante durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 3.4 und Abb. A.2). Es bildeten sich in Puffer I keine Kristalle bei 20 °C und 25 °C,

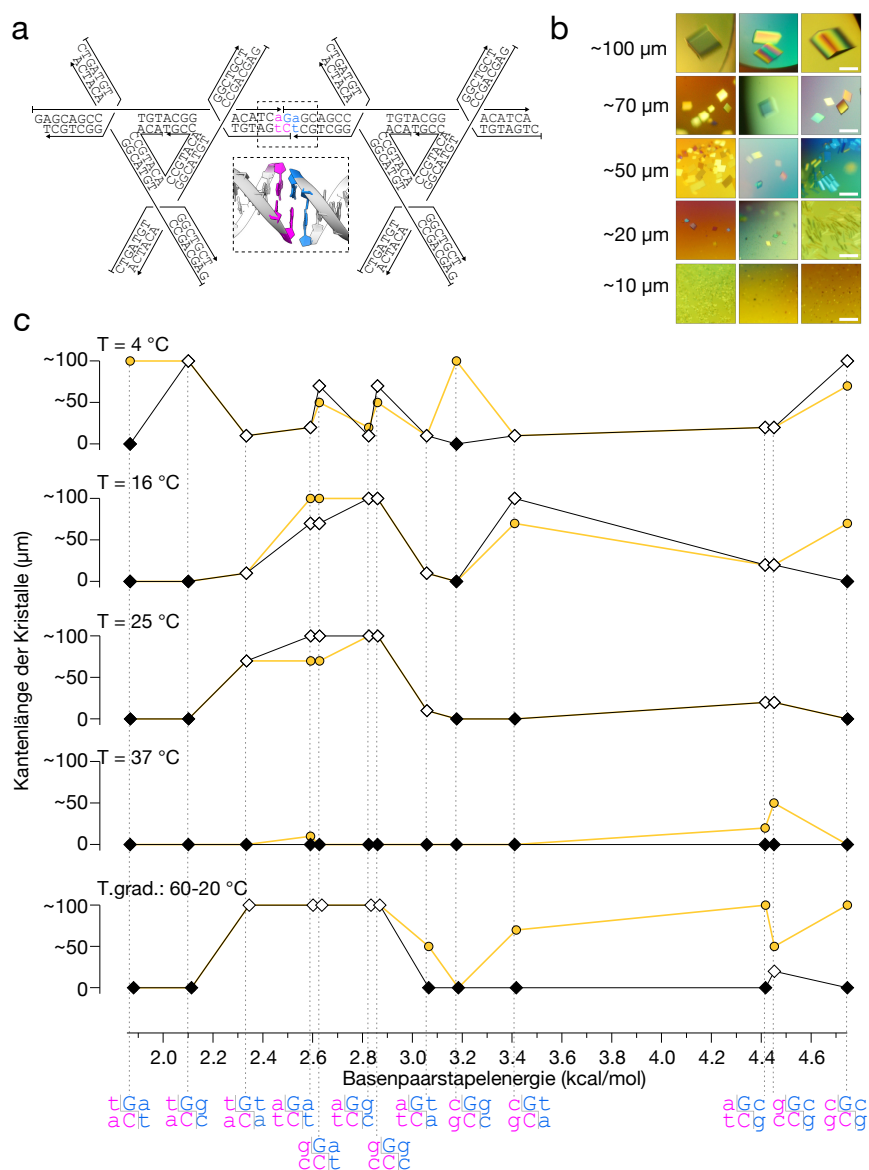


Abbildung 3.8 – Kristallisation des DNA-Dreiecks als Funktion der Interaktionsenergien und der Temperatur. (a) Schematische Darstellung der Sticky-End-Interaktion zwischen zwei DNA-Dreiecken. Der Bildeinsatz zeigt zum Vergleich ein 3D-Modell zweier Duplexe mit 5'-Überhang (3hdd.pdb [96]). (b) Typische Bilder von Kristallen der Sequenzvarianten zur Illustration der Daten in (c). Maßstab: 100 μm . (c) Klassifizierung der Kristalle in Puffer I (schwarz, Rauten) und Puffer II (gelb, Kreise) anhand ihrer Kantenlängen wie in (b). Gefüllte Rauten markieren Nullwerte (Tropfen ohne Kristallwachstum) zur optischen Führung. Die Sequenzvarianten wurden nach den Stapelenergiebeiträgen der nächsten Nachbarbasenpaare sortiert [28, 95]. Die Proben wurden separat annealt und in identischen Ansätzen bei 4, 16, 25 und 37 $^{\circ}\text{C}$ und bei einem Temperaturgradienten von 60–20 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert (Endkonzentration des DNA-Dreiecks: 60 μM). Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

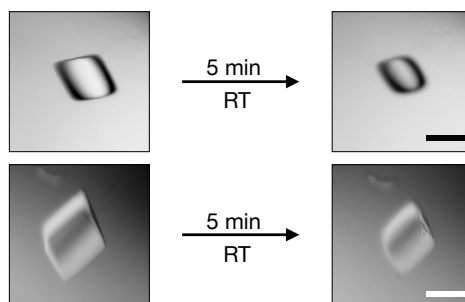


Abbildung 3.9 – Auflösen der Kristalle bei Raumtemperatur. Typische Kristallbilder zeigen, wie sich die Kristalle innerhalb weniger Minuten auflösen. Dieses Verhalten wurde für die Kristalle der Varianten *tGa*, *tGg* und *cGg* in Puffer I und II beobachtet. Maßstab: 100 μm .

während bei 16 °C große Kristalle ($\sim 100\mu\text{m}$) und bei 4 °C kleinere Kristalle ($\sim 70\mu\text{m}$) der GA-Variante wuchsen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für das bessere Kristallwachstum dieser stabiler interagierenden DNA-Dreiecke bei kühleren Temperaturen liegt möglicherweise in der Kinetik des Kristallisationsprozesses. Die kinetische Kontrolle über Reaktionsprozesse ist bei niedrigeren Temperaturen höher [97]. Ein mögliche Interpretation wäre beispielsweise, dass die schnelle Wachstumsreaktion an wenigen Nukleationskeimen unter stärkerer kinetischer Kontrolle anstelle der Bildung zahlreicher Agglomerate mit lokalem thermodynamischen Minimum bevorzugt wird. Für tRNA-Kristallen wurde für leichte Abkühlungen der Inkubationsbedingungen ein Wechsel im Wachstumsmechanismus beschrieben. Ähnliche molekulare Vorgänge wären ein weiterer Erklärungsansatz für die beobachteten Effekte [86]. Um diese und andere denkbare Hypothesen weiter zu verfolgen, wären Messungen der Kristallisationsraten und AFM-Aufnahmen des Kristallwachstums in Abhängigkeit der Temperatur hilfreich, da sie weitere Einsichten in die Reaktionspfade von stärker und schwächer interagierenden DNA-Dreiecken ermöglichen könnten.

Fazit aus den Experimenten zur Interaktionsstärke in Puffer I

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es für das DNA-Dreieck einen energetisch günstigen Bereich der Sticky-End-Interaktion gibt, der pro Interaktion etwa 2–3 kcal/mol bzw. 4–5 Einheiten thermischer Energie bei Raumtemperatur entspricht. Die tatsächliche Energiedifferenz für die Integration eines DNA-Dreiecksmotivs in das Kristallgitter hängt allerdings von den Pufferbedingungen, der Probenkonzentration und den entropischen Kosten des Kristallisationsprozesses ab. Auch die Parameter zur Abschätzung der Basenpaarstackenergien können nur zur relativen Abschätzung der Energien herangezogen werden, weil sie bei 20 mM Magnesiumchlorid bestimmt wurden, wohingegen die equilibrierten Tropfen 200 mM Magnesiumchlorid enthalten. Trotzdem legen die Daten deutlich dar, dass einige Dreiecksvarianten, die durch die vergleichsweise geringe Änderung der Nachbarbasen zum Sticky End erzeugt wurden, bereits zu stark waren um Kristalle auszubilden, während die Sticky-End-Interaktionen anderer Varianten zu schwach waren, um zu kristallisieren.

3.5.2 Vergleich von Puffer I und II

Für das komplexere Puffersystem II (siehe Abb. 3.1 b) zeigten die Daten eine ähnliche Abhängigkeit der Kristallisation von der Temperatur und den Sequenzmotiven wie in Puffer I. Insgesamt kristallisierten alle Varianten, die in Puffer I Kristalle bildeten, auch in Puffer II mit vergleichbarer Temperaturabhängigkeit. Einige Varianten kristallisierten ausschließlich in Puffer II, wie die Variante *tGa*, für die die niedrigste Basenpaarstapelenergie abgeschätzt wurde, aber auch die Variante *cGg* mit höherer abgeschätzter Stapelenergie. Die Kristalle beider Varianten lösten sich bei Raumtemperatur wieder auf, was in beiden Fällen auf eine schwache Stabilisierung durch die Sticky-End-Interaktion hindeutet (siehe Abb. 3.9).

Bei 37 °C bildeten sich auch in Puffer II keine großen Kristalle, die Varianten *aGc* und *gGc* kristallisierten hier zu Stäbchen, und die Variante *aGa* bildete Mikrokristalle, die nach drei Tagen bei Raumtemperatur zu Kristallen mit $\sim 70 \mu\text{m}$ Kantenlänge wuchsen. Es bildeten sich ähnlich wie in Puffer I nach weiteren drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur Kristalle aus allen Varianten, die auch bei konstanter Temperatur von 25 °C kristallisierten.

Die deutlichsten Unterschiede im Kristallisationsverhalten in Puffer I und II zeigten sich nach Inkubation der Tropfen von 60–20 °C und anschließend bei 20 °C. Zusätzlich zu den fünf Varianten, die auch in Puffer I große Kristalle bildeten, kristallisierten hier in Puffer II auch weitere Varianten mit höheren Basenpaarstapelenergien. In Puffer I bildeten hingegen nur einige dieser Varianten bei kühleren Temperaturen große Kristalle (*cGt*, *cGc*), andere bildeten bei allen Temperaturbedingungen Mikrokristalle (*aGc*, *gGc*). Puffer II ist demnach für die Kristallisation von DNA-Dreiecken mit stärkeren Sticky-End-Interaktionen günstiger, was die Resultate aus dem Vergleich des Kristallwachstums der G- und GA-Variante in Puffer I und II bestätigt (vgl. Abschnitt 3.4).

Der Vergleich der Puffer zeigte, dass manche ungünstigen Interaktionsstärken der Partikel zueinander, die im minimalen Puffersystem I zum Teil zu stark und zum anderen Teil auch zu schwach für die Kristallisation waren, durch das komplexere Puffersystem II kompensiert werden können. Die Tatsache, dass sowohl zu starke als auch zu schwache Interaktionen in Puffer II robuster kristallisierten, deutet an, dass das Puffersystem vielschichtig auf die Kristallisation wirkt und vermutlich thermodynamische und kinetische Aspekte der Kristallisation beeinflusst. Trotz der unterschiedlichen Wirkungsweisen der Puffersysteme, kristallisierten die fünf Sequenzvarianten mit günstigen Basenpaarstapelenergiebeiträgen von etwa 2–3 kcal/mol (4–5 kT) pro Sticky-End-Kontakt in beiden Puffersystem robust.

3.5.3 Temperaturstabilität der Kristalle

Die Experimente zu den Interaktionsstärken der DNA-Dreiecksmotive zeigten bereits, dass eine Temperaturrampe von 60–20 °C für die Kristallisation der Dreiecksmotive nicht zwingend notwendig ist. Um auch den Vorgang des langsamen Aufkonzentrierens von der Kristallisation der Dreiecksmotive zu entkoppeln, wurden Platten mit den 13 Sequenzvarianten für 20 Tage bei 50 °C inkubiert und anschließend direkt auf Raumtemperatur gebracht.

In Puffer I bildeten sich nach wenigen Tagen auch hier große Kristalle ($\sim 100 \mu\text{m}$) für jene Sequenzvarianten die auch bei konstanter Inkubation von 25 °C kristallisierten (*tGt*, *aGa*, *gGa*, *aGg* und *gGg* in Abb. 3.8 c). Allerdings wurde das Kristallisationsverhalten bei diesen Bedingungen stochastischer: nur manche der sechs identischen Tropfen bildeten Kristalle in Puffer I (Abb. 3.10 a zeigt die Variante *gGg* als Beispiel). Nach Aufheizen und erneutem Abkühlen bildeten sich jedoch auch hier typische Kristalle (Abb. 3.10 a, unten). Die Daten deuten an, dass in diesen Tropfen gehemmte Zustände vorlagen, die durch das erneute Aufheizen der

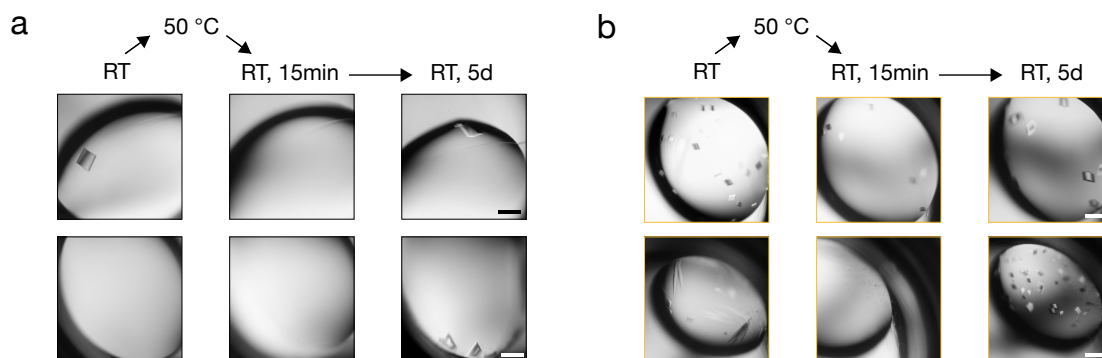


Abbildung 3.10 – Temperaturstabilität der Kristalle in Puffer I und Puffer II. Beispielbilder von Kristallisationstropfen der Variante *gGg* (siehe 3.5) in Puffer I (a) und Puffer II (b). Die Kristallplatten mit 60 μ M DNA-Dreieck (final) wurden 20 Tage bei 50 °C und anschließend fünf Tage bei 25 °C inkubiert, dann dokumentiert (links) und erneut 7 Tage bei 50 °C inkubiert, bevor sie nach kurzer Abkühlung (Mitte) und nochmals nach fünf Tagen (rechts) dokumentiert wurden. Maßstab: 200 μ m.

Tropfen aufgelöst werden konnten. Kristalle, die zuvor vorhanden und bei Raumtemperatur stabil waren, lösten sich während der Inkubation bei 50 °C komplett auf. In diesen Tropfen kristallisierten die DNA-Dreiecke erneut an einer anderen Position, wenn die Ansätze einige Tage bei Raumtemperatur gehalten wurden (Abb. 3.10 a, oben).

In Puffer II kristallisierten die fünf Varianten nach Abkühlung von 50 °C auf Raumtemperatur reproduzierbar, jedoch zu zahlreichen kleinen Kristallen und teilweise zu Stäben, was auf eine hohe Nukleations- und Wachstumsrate bei diesen Bedingungen schließen lässt. Nach Inkubation der Kristalltropfen für eine Woche bei 50 °C lösten sich die stabförmigen Kristalle komplett auf, während größere, Parallelotop-förmige Kristalle derselben Dreiecksvariante zwar schrumpften, aber bestehen blieben. Nach weiteren fünf Tagen bei Raumtemperatur wuchsen diese bestehenden Kristalle zu größeren Kristallen, während sich in Tropfen, in denen sich alle Kristalle aufgelöst hatten, neue Kristalle bildeten (Abb. 3.10 b). Diese Beobachtung veranschaulicht, dass das Kristallwachstum an bestehenden Kristallen energetisch günstiger ist als die Bildung eines neuen Nukleationskeimes kritischer Größe. Das Material im Tropfen, das zuvor auf zahlreiche Nukleationskeime verteilt viele kleine Kristalle bildete, konnte nach erneutem Abkühlen auf wenige, größere Kristalle umverteilt werden.

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass die thermodynamische Stabilität der Kristalle in Puffersystem II höher ist. Dies lässt sich durch die höhere Konzentration an Kationen und auch durch die etwas höhere Probenkonzentration im equilibrierten Tropfen erklären. In beiden Puffersystemen zeigte das DNA-Dreieck robustes Kristallwachstum, das mehrere Zyklen des Aufheizens und Abkühlens tolerierte.

3.6 Ausblick: Weitere Modellsystemstudien

Die Versuche in Abschnitt 3.5 veranschaulichten, dass die Interaktionsstärke zwischen den DNA-Dreiecken über die Veränderung der Sequenzen im Bereich der Sticky Ends moduliert werden kann, ohne dabei die Geometrie der Interaktion verändern. Durch die Veränderung der überhängenden Basen kann außerdem die Spezifität der Sticky Ends zueinander verändert werden. Diese beiden Stellschrauben ermöglichen eine Reihe interessanter Kristallisationsan-

sätze, die dazu beitragen könnten, die Mechanismen der Kristallbildung in diesem und auch anderen Systemen besser zu verstehen und manipulieren zu lernen.

In einem ersten Testversuch wurden Mischungen mit zwei Dreiecksspezies angesetzt, zwischen denen sich keine Watson-Crick-Interaktionen ausbilden konnten. Die erste Dreiecksspezies wies G- und C-Überhänge an den Duplexenden auf (*aGa*) und enthielt einen M-Strang, der mit einem *Cyanin-5*-Fluorophor markiert war. Die zweite Dreiecksspezies wies A- und T-Überhänge an den Duplexenden auf (*gAc*) und war nicht fluoreszenzmarkiert. Auch die Armlängen der beiden Varianten unterschieden sich jeweils um ein Basenpaar (Abb. 3.11). Beide Varianten wurden separat assembliert, dann in Puffer II gemischt und bei 25 °C zur Kristallisation angesetzt. Interessanter Weise bildeten sich in den Kristallisationsansätzen typische Parallelotop-förmige Kristalle, die aus farblosen Domänen des *gAc*-Dreiecks und blauen Domänen des *aGa*-Dreiecks bestanden. Die Bildung der Domänen lässt vermuten, dass während des Kristallwachstums Dreiecke mit passenden Sticky Ends und Armlängen lokal tatsächlich bevorzugt eingebaut wurden. Auf das Gesamtwachstum des Kristalls betrachtet schien hingegen der Einbau von Dreiecken ohne spezifische Watson-Crick-Interaktionen der Sticky Ends energetisch günstiger gewesen zu sein, als die Bildung zweier Kristalle – einem farblosen und einem blauen.

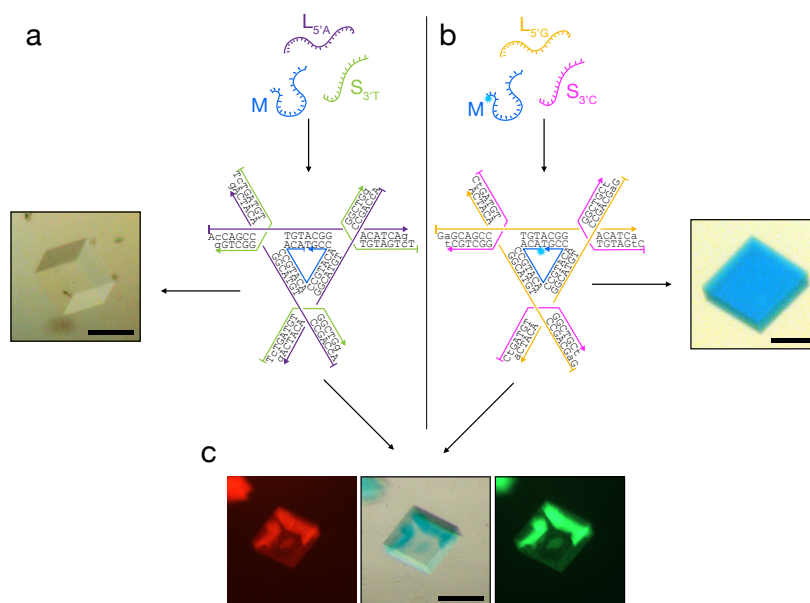


Abbildung 3.11 – Kristallisation von DNA-Dreiecken mit unterschiedlichen Sticky Ends. (a) Schematische Darstellung einer Dreiecksvariante mit A-Überhang am 5'-Ende des L-Srangs und T-Überhang am 5'-Ende des S-Srangs und Abbildung eines typischen Kristalls, der aus dieser Variante bei Raumtemperatur in Puffer II wuchs. (b) Schematische Darstellung der G-Variante mit Cyanin-5-markiertem M-Strang und Abbildung eines typischen Kristalls, der aus dieser Variante bei Raumtemperatur in Puffer II wuchs. (c) Abbildung des Kristalls, der bei Raumtemperatur in Mischungen mit Dreiecken aus (a) und (b) in Puffer II wuchs. Mitte: Weißlicht, links: Fluoreszenzbeleuchtung im Cy3-Kanal; recht: Fluoreszenzbeleuchtung im Cy2-Kanal. Maßstäbe: 100 µm.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der energetische Beitrag der Watson-Crick-Interaktion zur Stabilisierung von Duplexen vergleichsweise gering gegenüber den Stapelwechselwirkungen zwischen den Basenpaaren ist [94]. Möglicherweise ist auch während des Kristallwachstums der Energiegewinn durch den Einbau eines Dreiecks mit nicht-komplementären Sticky Ends ausreichend, um die Ausbildung eines intakten Kristallgitters zu ermöglichen. Zusammen

mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5 zeigt dieser Versuch, dass geringe Unterschiede in der Interaktionsstärke und -spezifität der kristallisierenden Objekte die Kristallbildung stark beeinflussen können. Das Modellsystem des DNA-Dreiecks erlaubt es, einige dieser Aspekte gezielt zu untersuchen, und Sortierungseffekte wie die hier beschriebenen Domänenbildung durch Fluoreszenzmarkierung einzelner Stränge zu visualisieren. Weitere Studien mit Kombinationen unterschiedlicher Interaktionsstärken und -spezifitäten könnten dazu beitragen, die energetischen und entropischen Aspekte der Kristallisation besser zu verstehen.

3.7 Zusammenfassung von Kapitel 3

Die Kristallisation des DNA-Dreiecks ist ein vergleichsweise robuster Prozess, der für die Variante *aGa* in den Puffern I und II in einem Konzentrationsbereich von 20–60 μM und bei Inkubation der Tropfen von 60–20 $^{\circ}\text{C}$ und anschließend konstanter Temperatur von 20 $^{\circ}\text{C}$ mit hoher Reproduzierbarkeit abläuft. In diesem Konzentrationsbereich wird die Kristallisation des DNA-Dreiecks weder von der Gegenwart defekter Nebenprodukte aus den Dreieckssträngen, noch von der Gegenwart potentiell störender, anderer Oligonukleotide oder Proteine beeinträchtigt.

Speziell die untersuchte *aGa*-Variante mit G-Überhängen am 5'-Ende des L-Strangs und C-Überhängen am 5'-Ende des S-Strangs zeigte geringe Anforderungen an das verwendete Puffersystem, was eine vielversprechende Eigenschaft für die Verwendung des Dreiecksmotivs zur Kokristallisation anderer Gastmoleküle ist. Die Kristallisation des Modellsystems konnte sowohl bei konstanter Temperatur während einer langsamen Aufkonzentration, als auch aus konzentrierten Lösungen durch Abkühlung der Tropfen induziert werden. Durch diese Vielseitigkeit wäre das DNA-Dreieck auch für andere experimentelle Ansätze, wie beispielsweise zeitaufgelöste Kristallisationsstudien in Mikrofluidikkammern [76] oder die Visualisierung des Kristallwachstums in AFM-Aufnahmen [86], geeignet. Die Untersuchungen in diesem Kapitel zeigten aber auch, dass diese Robustheit sensibel von geringfügigen Änderungen der Sequenz im Bereich der Sticky Ends abhängt. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung Interaktionsstärke zwischen den zu kristallisierenden Objekten, was insbesondere für die Kristallisation komplexerer Strukturen mit deutlich größeren Oberflächen eine wichtige Erkenntnis ist.

Durch Veränderung der Nachbarbasen zum Sticky End konnte die Interaktionsstärke um bis zu 2 kcal/mol pro Sticky End moduliert werden, was die gezielte Untersuchung des Einflusses der Interaktionsstärke bei ansonsten identischen Bedingungen ermöglichte. Das DNA-Dreieck ist an allen Nukleotidpositionen rational veränderbar, wodurch sich zahlreiche Möglichkeiten ergeben, den Kristallisationsprozess dieser DNA-Matrix weiter zu studieren.

Kapitel 4

Kristallisation in heterogenen Gemischen

Eine mögliche Ursache dafür, dass bislang die Kristallisation größerer, mehrsträngiger DNA-Objekte nicht erfolgreich war, könnte in der Probenheterogenität selbstassemblierter Strukturen liegen. In Reaktionsmischungen zur Selbstassemblierung, wie sie für die Herstellung von DNA-Origami-Objekten angesetzt werden, können neben der Zielstruktur verschiedenste unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Hierzu zählen beispielsweise Objekte mit fehlenden Strängen, fehlgefaltete Objekte, geometrisch veränderte Objekte oder auch Oligomere und Aggregate. Eine zusätzliche Heterogenität in den Mischungen kann durch chemische Unreinheiten in den synthetisierten DNA-Einzelsträngen verursacht werden, die Strangverkürzungen, Sequenzfehler, Insertionen oder Deletionen aufweisen können. Je nach Länge, Sequenz und Aufreinigungsgrad können bis zu 30 % der synthetisierten Einzelstränge laut Herstellerangaben¹ fehlerhaft sein [98].

Um die Auswirkung einer solchen Probenheterogenität auf die Kristallisation eines mehrsträngigen DNA-Objekts zu testen, diente das DNA-Tensegrity-Dreieck als Modellsystem. Sein in Kapitel 3 charakterisiertes Kristallisationsverhalten wurde in verschiedenen Ausgangsmischungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden gezielt heterogene Probengemische aus originalen und modifizierten Strängen erzeugt, deren Kristallisationsverhalten nach etwa zehn Tagen dokumentiert wurde. Die insgesamt 28 untersuchten Modifikationen umfassen Strangverkürzungen, Basenfehlpaarungen, Insertionen und Deletionen ganzer Basenpaare sowie Ausstülpungen, die durch Insertionen oder Deletionen in den Einzelsträngen erzeugt wurden. Verkürzungen und Sequenzfehler sind Modelle für die Heterogenität, die durch Fehler in der DNA-Synthese und in der Assemblierung der Stränge auftreten können. Basenpaarinsertionen und -deletionen verändern die Länge und die Torsion der Dreiecksdomänen. Einzelstrangausstülpungen erzeugen neben potentiellen sterischen Konflikten auch thermodynamisch unterschiedlich stabile Regionen im Objekt, das kristallisiert werden soll. Insgesamt stellen diese Störfaktoren ein Modell für das Spektrum an struktureller Heterogenität dar, wie sie auch in Reaktionsmischungen für komplexere mehrsträngige DNA-Objekte denkbar ist.

Im Folgenden wird zunächst die Durchführung und Auswertung der Kristallisationsansätze der G-Variante in Puffer I vorgestellt, deren Ergebnisse anschließend detailliert beschrieben und abschließend verglichen werden. Einzelne Unterschiede zwischen den Puffern I und II werden am Ende dieses Kapitels diskutiert und abschließend mit Ergebnissen aus Versuchsreihen mit der GA-Variante (siehe Abschnitt 3.7) verglichen.

¹Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland

4.1 Versuchsdurchführung

Um Mischungen mit definierter Probenheterogenität zu erzeugen, wurden Originalstränge mit modifizierten Dreieckssträngen gemischt. In diesen Mischungen bildeten sich neben der originalen Zielspezies auch eine pseudodefekte Dreiecksspezies mit den erzeugten Modifikationen, sowie teilweise assemblierte DNA-Dreiecke und andere Nebenprodukte der Faltungsreaktion aus (Abb. 4.1 a). Der Einfluss von insgesamt 28 Modifikationen, die bestimmte Einzel- und Doppelstrangmodifikationen in den pseudodefekten DNA-Dreiecken erzeugten, wurde in identischen Versuchsreihen getestet. In jeder Versuchsreihe wurde – ausgehend von einer Referenzprobe mit 60 μM originalem DNA-Dreieck – der Anteil eines modifizierten Strangs erhöht und gleichzeitig der Anteil des entsprechenden originalen Strangs reduziert. Die Gesamtkonzentration und das stöchiometrische Verhältnis zwischen L-, M- und S-Strängen in den Tropfen blieb dabei konstant. Die Probengemische wurden mit den Puffern I und II angesetzt und bei einer Temperaturrampe von 60–20 °C und anschließend bei konstanter Temperatur von 20 °C inkubiert (vgl. Abschnitt 3.1.1). Etwa zehn Tage nach Ansetzen der Kristallisationsplatten wurden die Tropfen lichtmikroskopisch dokumentiert. Um die Vergleichbarkeit der Versuchsreihen zu vereinfachen, wurden entstandene Kristalle anhand ihrer Morphologie bewertet und die resultierenden Kristallwertungen wurden in graphische Darstellungen der Versuchsreihen übertragen (Abb. 4.1 b, c, vgl. Abb. B.1). Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse für Puffer I erläutert und dann in Abschnitt 4.4 mit Puffer II verglichen. Eine Übersichtsdarstellung der Daten findet sich in Abschnitt A.2.

Mit steigendem Anteil modifizierter Stränge in den Gemischen nahm in den Versuchsreihen zugleich die Konzentration der originalen Dreiecksspezies in den Tropfen ab. Beim Vergleich des konzentrationsabhängigen Kristallisationsverhaltens des DNA-Dreiecks in An- und Abwesenheit modifizierter Stränge zeigten sich generell drei Verläufe der Versuchsreihen (vgl. Abb. 3.2 c, d und Abb. 4.1 b, c).

In Mischungen, in denen beispielsweise 90 % der M-Stränge modifiziert waren, konnten sich im equilibrierten Tropfen noch etwa 6 μM originale DNA-Dreiecke ausbilden. Die Daten aus Abbildung 3.2 zeigten bereits, dass bei diesen Endkonzentrationen innerhalb von zehn Tagen kein Kristallwachstum des originalen DNA-Dreiecks zu erwarten ist und sich selbst nach deutlich längeren Wartezeiten nur kleine Kristalle bildeten. Mit einem Teil der Strangmodifikationen bildeten sich aber auch in diesen Gemischen weiterhin große Kristalle, woraus sich schließen lässt, dass die modifizierten Stränge eine (leicht) veränderte DNA-Dreiecksspezies bildeten, die auch alleine kristallisierte. Diese Modifikationen werden im weiteren Verlauf als *kristallisierend* bezeichnet (Abb. 4.1 b). In manchen Versuchsreihen, die ebenfalls als *kristallisierend* klassifiziert wurden, bildeten sich Kristalle mit veränderter Kristalltracht – teilweise anstelle von oder zusätzlich zu den üblichen Dreieckskristallen. Die zumeist stabförmige Morphologie spiegelte sich in geringeren Kristallwertungen wider und ist im Detail in Abschnitt 4.2 beschrieben. Ein zweiter Teil der Strangmodifikationen erzeugte DNA-Dreiecksspezies, die nicht alleine kristallisierten. Diese modifizierten Stränge wurden in den Mischungen jedoch *toleriert* und es bildeten sich Kristalle in allen Bedingungen, in denen ausreichend originale Stränge für die Kristallisation vorhanden waren. Ein dritter Teil der Strangmodifikationen beeinflusste die Kristallisation der originalen DNA-Dreiecksspezies negativ. In Mischungen, in denen ausreichend originale Stränge vorhanden waren, wurde das Kristallwachstum durch die Präsenz dieser modifizierten Stränge gehemmt. Diese Modifikationen werden im Weiteren als *inhibierend* bezeichnet (Abb. 4.1 b).

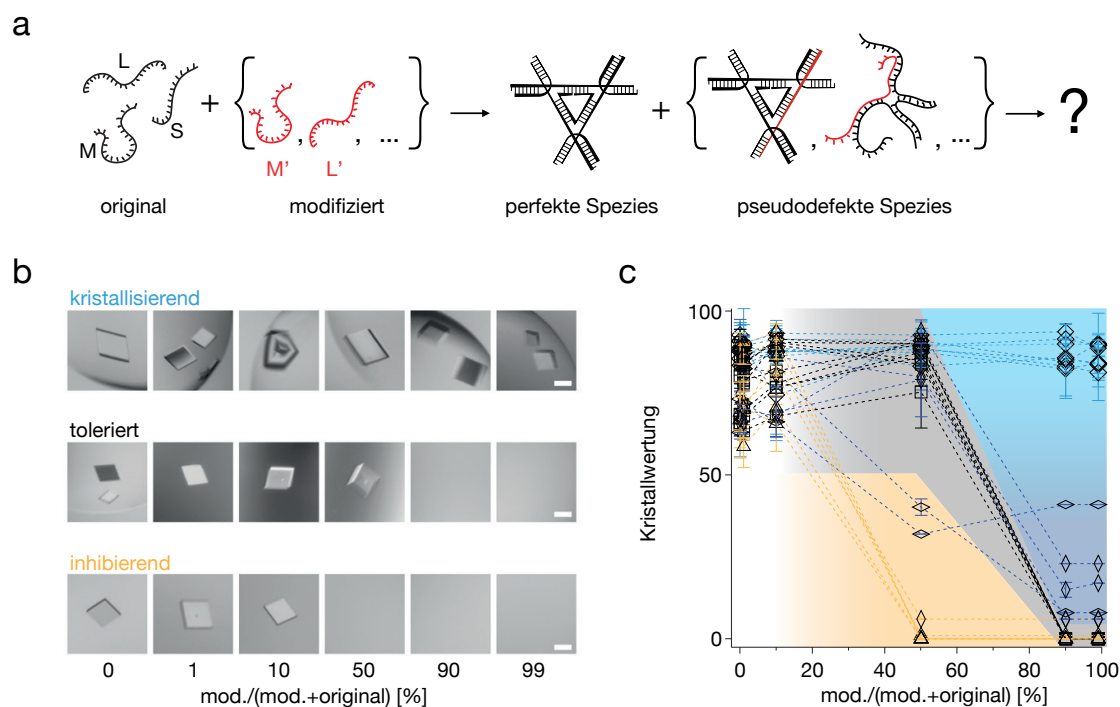


Abbildung 4.1 – Untersuchung der Kristallisation des DNA-Dreiecks in heterogenen Gemischen. (a) Schematische Darstellung der Herstellung heterogener Probengemische. Speziell modifizierte Dreieckssstränge wurden zusammen mit den originalen Strängen in Kristallisationstropfen angesetzt. Nachdruck mit freundlicher genehmigung von [88]; © (2016) American Chemical Society. (b) Bilder von typischen Kristallen zeigen Beispiele für Versuchsreihen mit *kristallisierender*, *tolerierter* und *inhibierender* Strangmodifikation. Die Stöchiometrie der Stränge sowie die absolute Strangkonzentration in den Tropfen blieb unverändert ($L+L'/S+S'=180\ \mu\text{M}$, $M+M'=60\ \mu\text{M}$). Maßstab: $100\ \mu\text{m}$. (c) Überblick über die Ergebnisse aller Versuchsreihen in Puffer I. Kristallwertungen aus je vier identischen Tropfen pro Bedingung zeigen den Verlauf der Kristallisation mit zunehmendem Anteil modifizierter Stränge. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus vier Werten an. Gestrichelte Linien zwischen den Punkten dienen der optischen Führung. Farbkodierung der gestrichelten Linien und Einfärbungen im Hintergrund heben die Klassifizierung in *kristallisierend* (blau), *toleriert* (grau) und *inhibierend* (orange) hervor. Teile dieser Abbildung sind aus [88] adaptiert.

Die Darstellung der Kristallwertungen aller Versuche zeigt, wie sich die Ergebnisse aus den Kristallisationsansätzen in die drei Klassen *kristallisierend*, *toleriert* oder *inhibierend* aufteilen (Abb. 4.1 c). Eine Ausnahme von diesen drei Klassen bildeten jene Versuchsreihen in denen Kristalle mit veränderten Kristalltrachten wuchsen, was sich in niedrigeren Kristallwertungen für diese Tropfen widerspiegelte.

Die Kristallwertungen in den identischen Referenztropfen mit ausschließlich originalen Strängen zeigten deutliche Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchsreihen (Abb. 4.1 c). Hier entsprechen niedrigere Kristallwertungen großen Kristallen mit ausgeprägten Defekten in den Kanten oder Seitenflächen, die auf zu schnelles Wachstum der Kristallgitter zurückzuführen sind [66, 72]. Die Bildung solcher großen, defekt-behafteten Kristalle wurde stets in allen Versuchsreihen einer Kristallplatte beobachtet. Hieraus lässt sich schließen, dass das schnellere Kristallwachstum durch externe Faktoren verursacht wurde, die auf alle Tropfen gewirkt hatten. Mögliche Beispiele für solche Faktoren sind die Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit am Versuchstag, die Dauer des Ansetzens der Platten, oder systematische Konzentrationschwankungen in den Tropfen – entweder auf Grund höherer Konzentration der Stränge in der Stammlösung oder auf Grund eines systematischen Fehlers im Volumen der benutzten Pipette. Trotz dieser Unregelmäßigkeiten in der Morphologie der Kristalle zeigten insgesamt alle Versuchsreihen dieselbe Konzentrationsabhängigkeit und Reproduzierbarkeit des Kristallisationsereignisses an sich, wie für das DNA-Dreieck in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Modifikationen folgt in Abschnitt 4.2.

4.1.1 Weiterführende Charakterisierung

Gelelektrophorese

Um zu untersuchen, ob die modifizierten DNA-Stränge in Dreiecksobjekte integriert werden können, wurden die modifizierten Stränge nur mit den notwendigen originalen Strängen vermischt und separat in Puffer I bei einer Konzentration von $6\ \mu\text{M}$ bezüglich des M-Strangs annealt. Die assemblierten Dreiecksmotive wurden im Vergleich zu einer Referenzprobe aus originalen Strängen mittels Gelelektrophorese ausgewertet und wird im folgenden Abschnitt 4.2 für alle Modifikationen im Einzelfall beschrieben (vgl. auch Abb. 3.2 b). Sowohl in der Reaktionsmischung als auch während der anschließenden Gelelektrophorese lagen geringere Proben- und Salzkonzentrationen vor, als in den equilibrierten Tropfen der Kristallisationsansätze. Es ist daher möglich, dass Kombinationen, für die in den Gelen keine oder nur sehr schwache Dreiecksbanden nachweisbar waren, im Tropfen trotzdem pseudodefekte Dreiecksspezies ausbildeten. Auf Grund der Stöchiometrie der Stränge im DNA-Dreieck ($L:M:S = 3:1:3$) können sich zudem in Mischungen aus originalen und modifizierten L- bzw. S-Strängen auch thermodynamisch weniger destabilisierte Spezies mit nur einem oder zwei modifizierten L- bzw. S-Strängen ausbilden.

Fluoreszenzverfolgung modifizierter Stränge

Der Einbau fluoreszenzmarkierter Stränge in die Dreiecksmotive und auch in die Kristallgitter wurde bereits in vorherigen Publikationen zu DNA-Dreieckskristallen beschrieben [90]. In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzmarkierungen an einzelnen Strängen genutzt, um den Einbau modifizierter Stränge in das Kristallgitter zu verfolgen. Zu diesem Zweck wurden für einige der modifizierten Stränge weitere Kristallisationsansätze mit zusätzlicher Fluoreszenzmarkierung an den Strängen angesetzt, die wie alle anderen Oligonukleotide auch von der

Firma Eurofins Genomics² hergestellt wurden. Modifizierte M-Stränge (M*) konnten ähnlich wie in vorherigen Publikationen [90] durch ein *Cyanin-3*-Fluorophor, das an das 5'-Ende des Phosphatrückgrates konjugiert war, markiert werden. Da die Enden der L- und S-Stränge für die Interaktion mit anderen DNA-Dreiecken essentiell sind, konnten diese Stränge nur intern an einer aminomodifizierten Thyminbase mit dem Farbstoff *ATTO-550* markiert werden (L*, S*) (Abb. 4.2 a).

Um den Einfluss der Fluorophore auf die Faltung und Kristallisation des DNA-Dreiecks beurteilen zu können, wurden zunächst fluoreszenzmarkierte Versionen der originalen Stränge gelelektrophoretisch untersucht. Die Präsenz der intern konjugierten Fluorophore in den L*- und S*-Strängen hemmte die Faltung der DNA-Dreiecke, während M*-Stränge mit hoher Ausbeute in Dreiecksmotive integriert wurden (Abb. 4.2 b). Die internen Modifikationen betrafen keine funktionellen Gruppen, die an der Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren beteiligt sind. Mögliche Ursachen der Destabilisierung durch die internen konjugierten Fluorophore sind daher eher sterische Konflikte bei der Ausbildung der Holliday-Kreuzungen und womöglich auch die Nähe der drei Fluorophore zueinander.

Kristallisationstropfen mit fluoreszenzmarkierten M*-Strängen verhielten sich wie Ansätze mit unmodifizierten Dreieckssträngen. Es bildeten sich in allen Mischungen homogene Kristalle, die auf Grund der Farbstoffmoleküle pink eingefärbt waren und unter entsprechender Beleuchtung fluoreszierten (Abb. 4.2 c). In den Gemischen wurden auch L*- und S*-Stränge in die wachsenden Kristalle integriert, weil die Strangstöchiometrie im Dreiecksmotiv es erlaubt, dass L*- bzw. S*-Stränge zusammen mit einem oder zwei der entsprechenden originalen Strängen in die Dreiecksmotive integriert werden. Allerdings bildeten sich hier keine Kristalle mehr in Gegenwart von weniger als 50 % originalen Strängen, vermutlich weil dann nicht mehr ausreichend originale Stränge für die Ausbildung von Dreiecken vorhanden waren. Stattdessen bildeten sich bei höherem Anteil an L*- oder S*-Strängen kristalline Aggregate mit ausgelöschter Fluoreszenz, was auf Kontakte zwischen den Fluorophoren schließen lässt (Abb. 4.2 d, e).

Um neben einzelnen Kristallen auch die Fluoreszenzverteilung im kompletten Tropfen zu berücksichtigen, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität in der Fläche, die von Kristallen bedeckt war, mit der mittleren Intensität des Tropfenhintergrunds aus vier identischen Tropfen verglichen. Für die Kristallisationsansätze mit M*-, L*- und S*-Strängen zeigte sich hier eine deutliche Anreicherung des Fluoreszenzsignals in der Kristallfläche. Mit zunehmendem Anteil an modifizierten Strängen erhöhte sich zwar das Hintergrundsignal in den Tropfen, die mittlere Fluoreszenzintensität der Kristallflächen nahm jedoch nicht zu und für L*- und S*-Stränge sogar ab. Die Weißlichtaufnahmen derselben Kristalle bildeten jedoch eine stärkere Einfärbung für höhere Anteile fluoreszenzmarkierter Stränge deutlich ab. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich das Verhältnis zwischen Absorption und Emission der Fluorophore in Lösung und im Kristallgitter unterscheidet. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals in den Tropfen kann daher wiedergeben, ob der Trend aus den Beispielbildern in vier identischen Tropfen ähnlich ist. Eine Aussage über den jeweiligen Anteil an markierten Strängen im Kristallgitter ist jedoch aus diesen Daten nicht möglich.

Fazit aus den Vorversuchen zur Fluoreszenzverfolgung

Insgesamt zeigen die Vorversuche zur Fluoreszenzverfolgung, dass der Einbau der Stränge mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung qualitativ nachgewiesen werden kann. Die Präsenz der

²Ebersberg, Deutschland

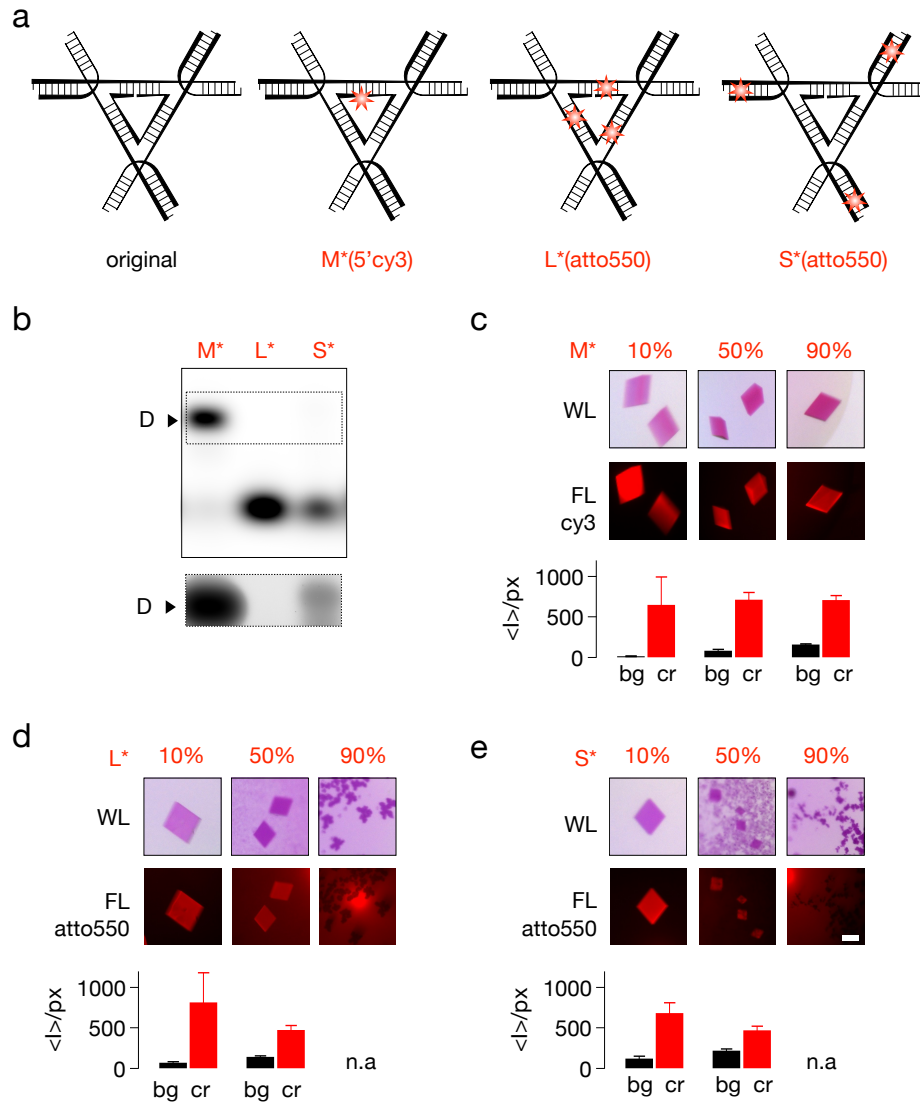


Abbildung 4.2 – Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die Faltung und Kristallisation des DNA-Dreiecks. (a) Schematische Darstellung von DNA-Dreiecken ohne Markierung (original) und mit Fluoreszenzmarkierung (*) am L-, M-, oder S-Strang. (b) Abbildung der gelelektrophoretischen Mobilitätsanalyse der fluoreszenzmarkierten Dreiecksvarianten aus (a). Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Darstellung des Bildausschnitts um die Dreiecksbande (D). (c-e, oben) Typische Kristallbilder unter Weißlicht (WL) und Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten M*-Strängen (c), L*-Strängen (d) oder S*-Strängen (e). Maßstab: 100 μm . (c-e, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen an.

Fluorophore kann allerdings den Verlauf der Kristallisation beeinflussen, weil die Fluorophore zum Teil destabilisierend auf die Ausbildung des Dreiecksmotivs wirken und die Bildung kristalliner Aggregate begünstigen. Besonders für L*- und S*-Stränge ist daher davon auszugehen, dass das Ausmaß des Einbaus eines bestimmten, markierten Strangs im Vergleich zum selben Strang ohne Fluoreszenzmarkierung geringer ist. In den im folgenden Kapitel beschriebenen Versuchen diente die Fluoreszenzverfolgung markierter Stränge der Einschätzung, ob die Modifikationen mit dem Kristallgitter wechselwirken, oder nicht.

4.2 Einfluss der einzelnen Modifikationen

4.2.1 Strangverkürzungen

Verkürzte M-Stränge

Strangverkürzungen am 3'-Ende des M-Strangs beeinträchtigen die Kernregion des DNA-Dreiecks, indem sie dort einen einzelsträngigen Abschnitt frei lassen (Abb. 4.3 a). Die modifizierten DNA-Dreiecke sind dementsprechend auch durch ein Basenpaar bzw. vier Basenpaare weniger stabilisiert, was sich in deutlich schwächeren Banden in der gelelektrophoretischen Mobilitätsanalyse widerspiegelte (Abb. 4.3 b). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Faltungsausbeuten in den equilibrierten Tropfen bei höherer Proben- und Salzkonzentration höher sind, als im Agarosegel gezeigt. In der Mischung originaler und verkürzter M-Stränge bilden sich auf Grund der Stöchiometrie der Stränge im DNA-Dreieck zwei Spezies im Gemisch: originale DNA-Dreiecke mit originalem und pseudodefekte DNA-Dreiecke mit verkürztem M-Strang.

In den Kristallisationsansätzen kristallisierten pseudodefekte DNA-Dreiecke mit um eine Base verkürzten M-Strängen auch alleine: typische Parallelotop-förmige Kristalle bildeten sich hier auch in Mischungen, in denen nicht mehr ausreichend originale Stränge vorhanden waren, um Kristalle einzig aus originalen Dreiecken zu bilden (Abb. 4.3 c). Fluoreszenzmarkierte M-Stränge mit einer Base weniger am 3'-Ende wurden auch in das Kristallgitter integriert, selbst wenn ein Überschuss an originalen M-Strängen vorlag (Abb. 4.3 d). DNA-Dreiecke mit um vier Basen verkürzten M-Strängen kristallisierten nicht mehr alleine – entsprechend der in Abschnitt 3.1.2 charakterisierten Konzentrationsabhängigkeit des DNA-Dreiecks bildeten sich Kristalle nur in jenen Tropfen mit ausreichend originalen M-Strängen im Gemisch (Abb. 4.3 c). Die um vier Basen verkürzten M-Stränge wurden aber in den Gemischen toleriert und laut Fluoreszenzverfolgung mit in das Kristallgitter eingebaut. Jedoch wurde ein deutlich geringerer Anteil der modifizierten und markierten M-Stränge in die Kristalle integriert, als für M-Stränge mit nur einer Base weniger am 3'-Ende beobachtet wurde (Abb. 4.3 d).

Verkürzte L-Stränge

Verkürzungen am 3'-Ende der L-Stränge beeinträchtigen die Sticky-End-Interaktion zwischen den DNA-Dreiecken (Abb. 4.4 a). Dreiecke mit um eine Base verkürzten L-Strängen bildeten sich mit ähnlicher Faltungsausbeute wie das originale Dreieck, während sich mit drei Basen weniger am 3'-Ende des L-Strangs keine DNA-Dreiecksbande ausbildete. Durch die Verkürzung des L-Strangs um drei Nukleotide verbleiben im modifizierten Dreiecksmotiv nur drei Basen im 3'-Bereich des L-Strangs, die mit dem komplementären 5'-Abschnitt des S-Strangs interagieren können. Die Resultate der Gelelektrophorese legen nahe, dass diese Interaktion zu schwach war, um die Assemblierung der Dreiecke alleine aus modifizierten L-Strängen zu

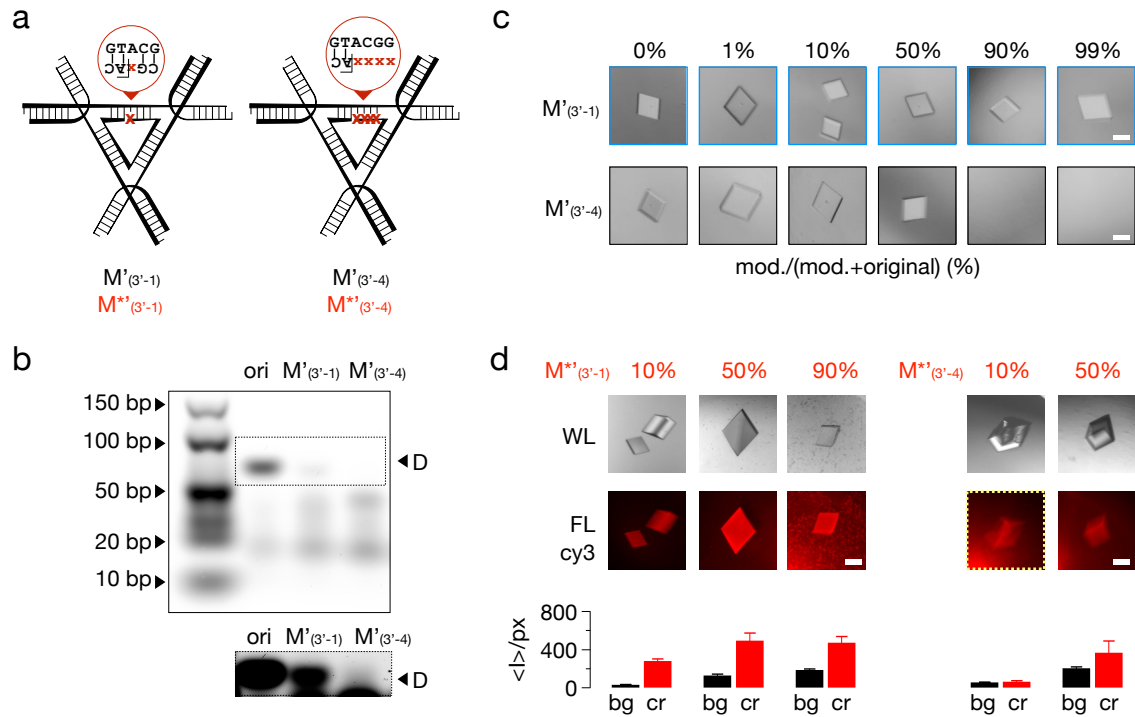


Abbildung 4.3 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit verkürzten M-Strängen. (a) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Strangverkürzungen am 3'-Ende des M-Strangs ($M'_{(3'-1)}$, $M'_{(3'-4)}$). (b) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). (c) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten M'-Strängen (mod) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen M-Strängen (original). Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Abbildung des Bildausschnitts um die Dreiecksbande (D). (d, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten M-Strängen ($M^{*'}_{(3'-1)}$, $M^{*'}_{(3'-4)}$). (d, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. Maßstäbe: 100 μm .

ermöglichen (Abb. 4.4 b). In Mischungen aus originalen und verkürzten L-Strängen konnten sich aber womöglich weniger stark destabilisierte, pseudodefekte DNA-Dreiecke mit nur einem oder zwei verkürzten L-Strängen ausbilden.

Die getesteten Strangverkürzungen am 3'-Ende der L-Stränge hatten einen inhibierenden Effekt auf das Kristallisationsverhalten der DNA-Dreiecke. Bis zu 10 % verkürzte L-Stränge wurden in den Mischungen toleriert – hier bildeten sich typische DNA-Dreieckskristalle. Tropfen mit höherem Anteil an verkürzten L-Strängen blieben jedoch klar, obwohl in ihnen theoretisch ausreichend originale Stränge enthalten waren, um DNA-Dreieckskristalle zu bilden (Abb. 4.4 c). In den Kristallisationsansätzen mit fluoreszenzmarkierten und verkürzten L-Strängen wuchsen Kristalle auch noch in Mischungen mit 50 % Anteil an modifizierten Strängen (Abb. 4.4 d). Dies lässt sich durch höhere energetische Kosten für den Einbau eines markierten L-Strangs im Vergleich zum Einbau eines unmarkierten L-Strangs in das Dreiecksmotiv erklären. Dieser energetische Nachteil schlägt sich auf die Populationsverteilung der Spezies im Gemisch nieder und bewirkt eine effektive Konzentrationserhöhung der originalen Dreiecksspezies und der pseudodefekten Dreiecksspezies mit nur einem modifizierten L-Strang. Die Fluoreszenzverfolgung zeigte, dass auch noch die am 3'-Ende um drei Nukleotide und damit stärker verkürzten und markierten L^{*}-Stränge schwach in das entstehende Kristallgitter aus überwiegend originalen DNA-Dreiecken eingebaut wurden. Dieser Sachverhalt legt nahe, dass in beiden Versuchsreihen pseudodefekte DNA-Dreiecke vorlagen, die mit den originalen Dreiecken wechselwirken konnten und dass vermutlich auch die beobachtete Inhibition der Kristallisation über diese Wechselwirkung vermittelt wurde.

4.2.2 Basenfehlpaarungen

Basenfehlpaarungen im DNA-Dreieck beeinträchtigen die thermodynamische Stabilität des DNA-Motivs und könnten potentiell die Struktur der Doppelhelixdomänen beeinflussen [94, 99–101]. Um den Einfluss von Basenfehlpaarungen im DNA-Dreieck zu testen, wurden pseudodefekte DNA-Dreiecke durch Änderung der Nukleotidsequenz an einer oder mehreren Positionen des M- oder L-Strangs erzeugt (Abb. 4.5 a–c). DNA-Dreiecke bildeten sich mit bis zu vier nicht komplementären Basen im M-Strang oder mit je einer nicht komplementären Base in den L-Strängen (Abb. 4.5 d). Die deutlich geringeren Faltungsausbeuten für DNA-Dreiecke mit insgesamt drei und vier Basenfehlpaarungen im Vergleich zu originalen Dreiecken lassen sich durch steigende thermodynamische Kosten mit zunehmender Anzahl an Basenfehlpaarungen erklären [94]. L-Stränge mit je zwei veränderten Nukleotidpositionen, die insgesamt sechs Basenfehlpaarungen erzeugen würden, bildeten zusammen mit originalen M- und S-Strängen keine DNA-Dreiecke mehr (Abb. 4.5 d).

In heterogenen Gemischen aus originalen und modifizierten DNA-Dreieckssträngen kristallisierten pseudodefekte DNA-Dreiecke mit einer, drei, und vier Basenfehlpaarungen auch alleine. Kristalle bildeten sich hier auch in Bedingungen, in denen nicht ausreichend originale DNA-Dreiecksspezies zur Kristallisation innerhalb von zehn Tagen vorhanden sein konnten (Abb. 4.5 e, f). Die Fluoreszenzverfolgung von M^{*}-Strängen, die vier Basenfehlpaarungen in den DNA-Dreiecken erzeugten, ergab, dass diese Stränge nur schwach in die Kristalle integriert wurden. Bei Überschuss an M^{*}-Strängen kristallisierten diese Ansätze im Gegensatz zu Gemischen mit unmarkierten M'-Strängen gleicher Modifikation nicht alleine. Stattdessen bildeten sich in diesen Gemischen mit 90 % M^{*}-Strängen fluoreszierende Aggregate (Abb. 4.5 g). Der Fluorophor am 5'-Ende des modifizierten M^{*}-Strangs bewirkt potentiell eine zusätzliche Destabilisierung des Dreiecksmotivs. Möglicherweise war das Dreiecksmotiv durch M-Stränge mit vier Basenfehlpaarungen und Fluoreszenzmarkierung so stark destabi-

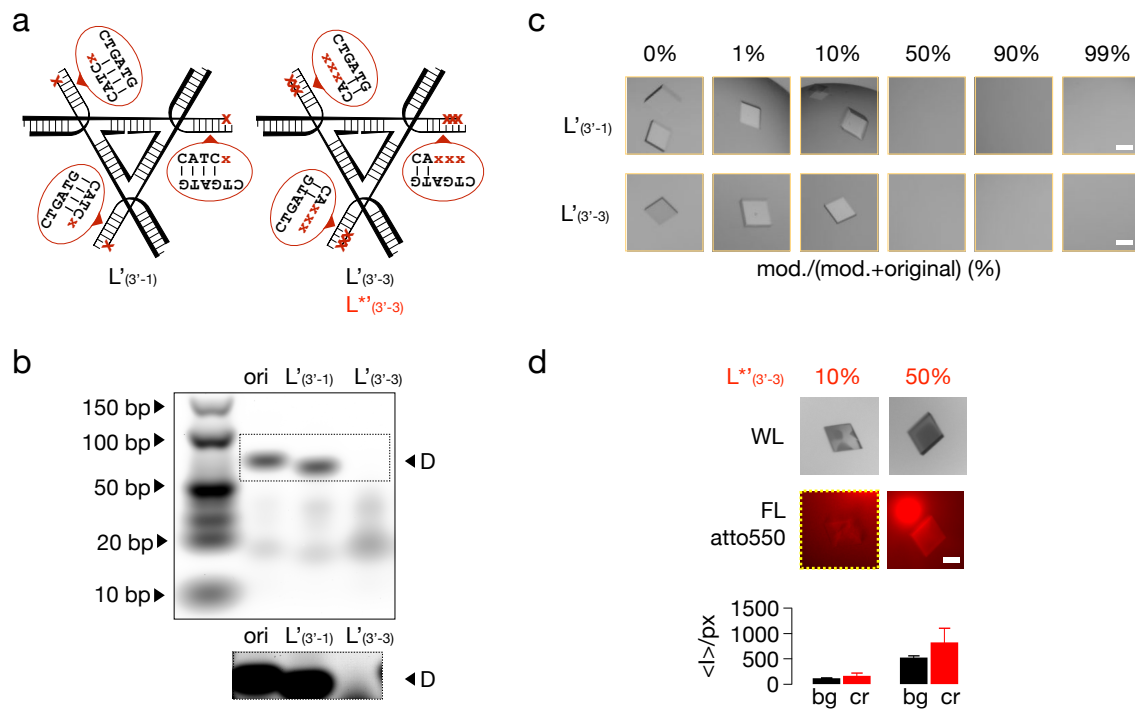


Abbildung 4.4 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit verkürzten L-Strängen. **(a)** Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Strangverkürzungen am 3'-Ende des L-Strangs ($L'_{(3'-1)}$, $L'_{(3'-3)}$). **(b)** Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori); gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Darstellung der Region um die Dreiecksbande (D). **(c)** Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten L'-Strängen (mod.) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen L-Strängen (original). **(d, oben)** Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten L-Strängen ($L^{*}_{(3'-1)}$, $L^{*}_{(3'-3)}$). Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. **(d, unten)** Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Maßstab: 100 μm .

liert, dass sich auch in den equilibrierten Tropfen nicht ausreichend pseudodefekte Dreiecke für eine Kristallisation ausbildeten. Zudem interagieren Fluorophore mit anderen Fluorophoren und Basen und könnten die Bildung kristalliner Aggregate anstelle von Dreieckskristallen bewirkt haben. Im Gegensatz hierzu bildeten sich aus Mischungen mit fluoreszenzmarkierten M*-Strängen, mit denen die Duplexdomänen im DNA-Dreieck nicht durch Basenfehlpaarungen destabilisiert wurden, reproduzierbar typische, fluoreszierende Dreieckskristalle mit Parallelotop-förmiger Kristalltracht (Abb. 4.2).

L-Stränge mit zwei nicht komplementären Basen wurden zwar in den Gemischen toleriert, es bildeten sich allerdings nur in den Bedingungen Kristalle, in denen ausreichend originale L-Stränge ($\geq 50\%$) vorhanden waren (Abb. 4.5 f). Fluoreszenzmarkierte L-Stränge mit zwei nicht komplementären Basen wurden trotzdem in das Kristallgitter eingebaut, was darauf schließen lässt, dass sie zum Teil zusammen mit originalen L-Strängen in pseudodefekte DNA-Dreiecke integriert wurden (Abb. 4.5 h). Die Daten aus der Faltungsanalyse zeigen, dass die Bildung von DNA-Dreiecken mit zwei und vier Basenfehlpaarungen möglich war (Abb. 4.5 d).

DNA-Dreiecke, die Basenfehlpaarungen enthielten, waren alle *kristallisierend*, sofern ihre Ausbildung thermodynamisch möglich war. Der strukturelle Einfluss der Basenfehlpaarungen auf das DNA-Dreiecksmotiv ist demnach so gering, dass auch pseudodefekte DNA-Dreiecke ein intaktes dreidimensionales Kristallgitter mit Sticky-End-Interaktionen zu je sechs Nachbarn ausbilden konnten. Strukturelle und gelelektrophoretische Studien von Duplexen mit Basenfehlpaarungen schreiben den hier getesteten einzelnen und doppelten Basenfehlpaarungen ebenfalls eher geringe strukturelle Effekte auf die B-Form der Doppelhelix zu [99, 101–103].

4.2.3 Basenpaarinsertionen und -deletionen

Insertionen oder Deletionen ganzer Basenpaare im DNA-Dreiecksmotiv beeinflussen die Gesamtstruktur des Dreiecksmotivs, indem sie zugleich die Länge und die Rückgratumdrehung der Duplexdomänen im DNA-Dreieck verändern [104, 105]. Die geometrische Kompatibilität der Dreiecke im Kristallgitter könnte durch diese Modifikationen beeinträchtigt werden.

Die Doppelstrangmodifikationen wurden durch Deletion oder Insertion komplementärer Basen im L- und M-Strang oder im L- und S-Strang erzeugt. Der M-Strang lässt sich in drei Abschnitte unterteilen, die Watson-Crick-Basenpaare mit jeweils einem L-Strang ausbilden. Eine Modifikation an einer Seite des DNA-Dreiecks wurde durch Kombination eines M'-Strangs mit einer Nukleotiddeletion bzw. -insertion, einem revers-komplementär modifizierten L'-Strang und zwei originalen L-Strängen im Verhältnis $L:L':M':S = 2:1:1:3$ erzeugt. Pseudodefekte Spezies mit drei modifizierten Seiten im DNA-Dreieck wurden durch M'-Stränge mit drei Nukleotidinsertionen- oder -deletionen und dem revers-komplementär modifizierten L'-Strang im Verhältnis $L':M':S = 3:1:3$ erzeugt. Doppelstrangmodifikationen in den Armregionen des DNA-Dreiecks wurden im Verhältnis $L':M:S' = 3:1:3$ erzeugt (Abb. 4.6 b und Abb. 4.7 b).

Basenpaarinsertionen

In B-Form-DNA entspricht ein zusätzliches Basenpaar einem Rotationsschritt von 34° und einem Längenzuwachs von etwa 0.33 nm (Abb. 4.6 a) [104, 105]. Im Kernbereich des originalen DNA-Dreiecks beträgt der Abstand zwischen zwei Holliday-Kreuzungen sieben Basenpaare, was einer Rotation von etwa 240° entlang des Phosphatrückgrates im M-Strang entspricht. Basenpaarinsertionen könnten im Kernbereich zu Verspannungen in den DNA-Helices führen und geometrische Veränderungen in der Gesamtstruktur des DNA-Dreiecks bewirken.

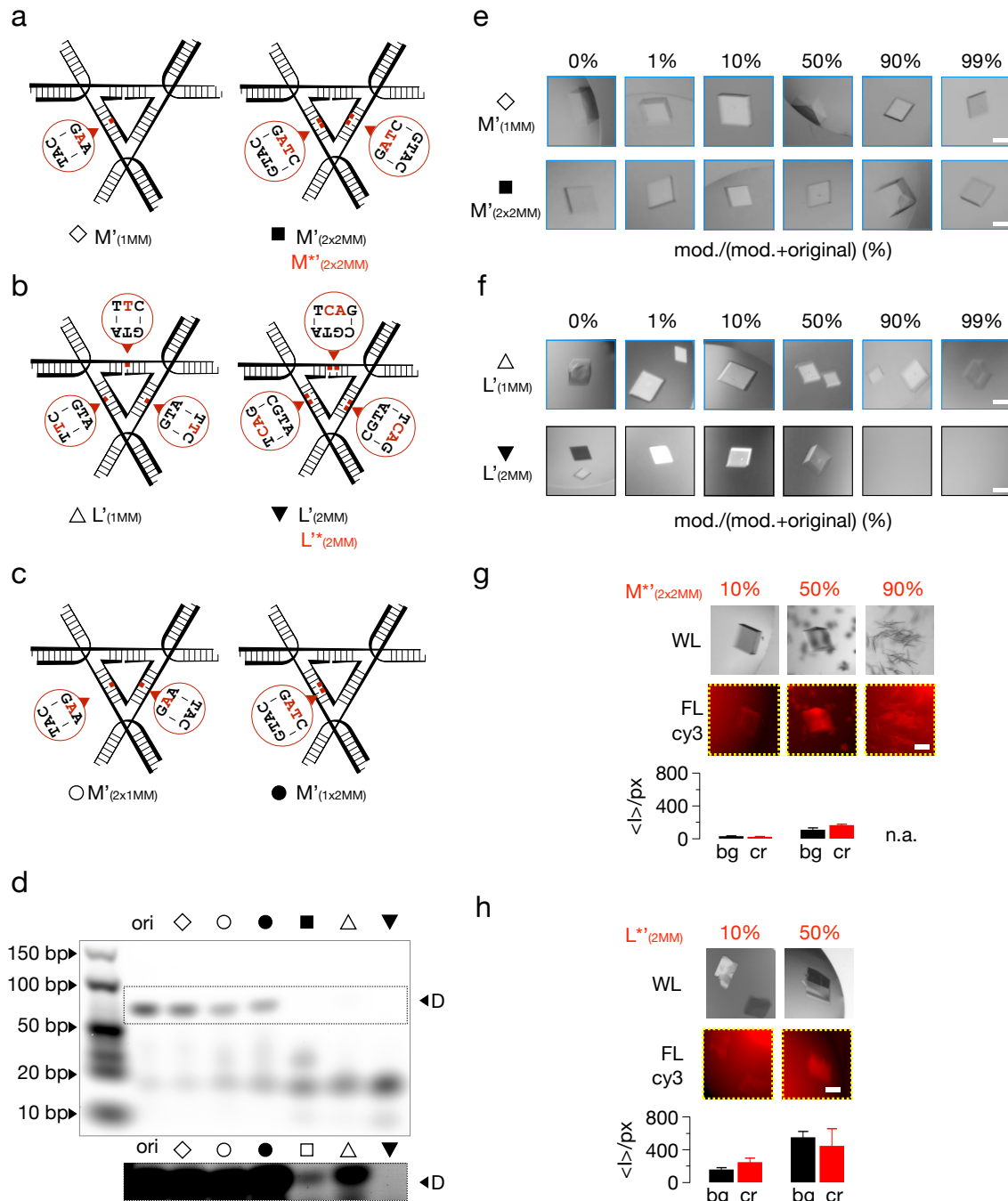


Abbildung 4.5 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Basenfehlpaarungen. (a-c) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Basenfehlpaarungen im M-Strang (a,c) und L-Strang (b). (d) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a-c) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Abbildung des Bildausschnitts um die Dreiecksbande (D). (e) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten M'-Strängen (mod) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen M'-Strängen (original). (f) Daten wie in (e) für Kristallisationsansätze mit zunehmendem Anteil an modifizierten L'-Strängen (mod) aus (b) und abnehmendem Anteil an originalen L'-Strängen (original). (g, h, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten $M^{*'}_{(2x2MM)}$ -Strängen (g) oder $L^{*'}_{(2MM)}$ -Strängen (h). Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. (g, h, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen; n.a. markiert nicht auswertbare Tropfen. Maßstäbe: 100 μm .

Die gelelektrophoretische Mobilitätsanalyse ergab, dass DNA-Dreiecke mit acht Basenpaaren in einer bzw. allen drei Seiten in der Kernregion des Dreiecks mit hoher Ausbeute falteten (Abb.4.6 b, c). Auch die Kristallisationsansätze, die diese Gemische aus pseudodefekten sowie originalen DNA-Dreiecken enthielten, gaben in allen Mischungsverhältnissen einheitliche Kristalle (Abb.4.6 d). Die Fluoreszenzdetektion markierter und modifizierter M^{*}-Stränge zeigte, dass die veränderten DNA-Dreiecke sowohl in die Kristallgitter der originalen DNA-Dreiecke integriert wurden, als auch von alleine kristallisierten, wenn nur noch vernachlässigbare Konzentrationen der originalen Dreiecke vorhanden waren (Abb.4.6 e). Vermutlich wird eine Basenpaarinsertion im Kernbereich des DNA-Dreiecks zum einen durch die Flexibilität der Holliday-Kreuzungsstelle selbst und zum anderen durch eine leichte Reduktion der nativen Torsion kompensiert.

Ein zusätzliches Basenpaar in der Armregion des DNA-Dreiecks verändert potentiell neben dem Abstand vor allem die Orientierung interagierender Dreiecke zueinander (Abb.4.6 b, rechts). Eine komplette Seite des DNA-Dreiecks besteht aus insgesamt 21 Basenpaaren, was zwei vollständigen Umdrehungen des Phosphatrückgrates entspricht und die identische Ausrichtung der Dreiecke im Kristallgitter zur Folge hat. Verdrehungen der Dreiecke relativ zueinander können potentiell zu Verspannungen im Kristallgitter führen oder das Kristallwachstum stören.

Obwohl DNA-Dreiecke mit einem zusätzlichen Basenpaar in der Armregion mit ebenso guter Ausbeute assemblierten wie originale Dreiecke und Dreiecke mit Basenpaarinsertionen im Kernbereich, kristallisierten diese Varianten nicht von alleine. Kristalle bildeten sich hier nur in jenen Bedingungen, in denen ausreichend originale DNA-Dreiecke zur Kristallisation vorhanden waren (Abb.4.6 c, d). Die Fluoreszenzverfolgung der modifizierten Stränge zeigte deutlich, dass die DNA-Dreiecke mit längeren Armregionen durchaus in die Kristalle eingebaut wurden, wenn ein Überschuss originaler L- und S-Stränge in den Gemischen vorlag (Abb.4.6 f). Diese Daten zeigen, dass die Flexibilität des Kristallgitters aus originalen DNA-Dreiecken den Einbau der pseudodefekten DNA-Dreiecke mit Basenpaarinsertionen in der Armregion tolerierte und kompensieren konnte, obwohl die Gesamtstruktur dieser pseudodefekten Dreiecksvariante offensichtlich zu stark verändert war, um auch alleine kristallisieren zu können.

Basenpaardeletionen

Durch eine Basenpaardeletion wird B-Form-DNA um etwa 0.33 nm verkürzt und der betroffene Duplex weist einen 34°-Rotationsschritt weniger auf (Abb.4.7 c) [104, 105]. Im DNA-Dreieck bewirkt das fehlende Basenpaar eine thermodynamische Destabilisierung der Kernregion sowie eine geometrische Verformung der betroffenen Doppelhelixdomänen. Dies zeigt sich in der geringeren Faltungsausbeute der DNA-Dreiecke mit verkürzten Dreiecksseiten in der Kernregion im Vergleich zu originalen DNA-Dreiecken (Abb.4.7 d). DNA-Dreiecke mit nur einer verkürzten Seite in der Kernregion assemblierten noch mit geringer Ausbeute, während Dreiecksmotive mit drei verkürzten Seiten sich überhaupt nicht ausbildeten. Im Vergleich hierzu war die Ausbeute aus der Assemblierung von Dreiecken mit Basenpaarinsertionen deutlich höher (vgl. Abb.4.6 d).

In Kristallisationsansätzen mit originalen und modifizierten Strängen, die Basenpaardeletionen im Kernbereich des DNA-Dreiecks erzeugten, wurden die modifizierten Stränge toleriert und es bildeten sich ausschließlich Kristalle in jenen Bedingungen, in denen ausreichend unmodifizierte Stränge zur Ausbildung originaler DNA-Dreiecksspezies vorhanden waren. Mit Strangmodifikationen für nur eine verkürzte Dreiecksseite bildeten sich in Mischungen mit

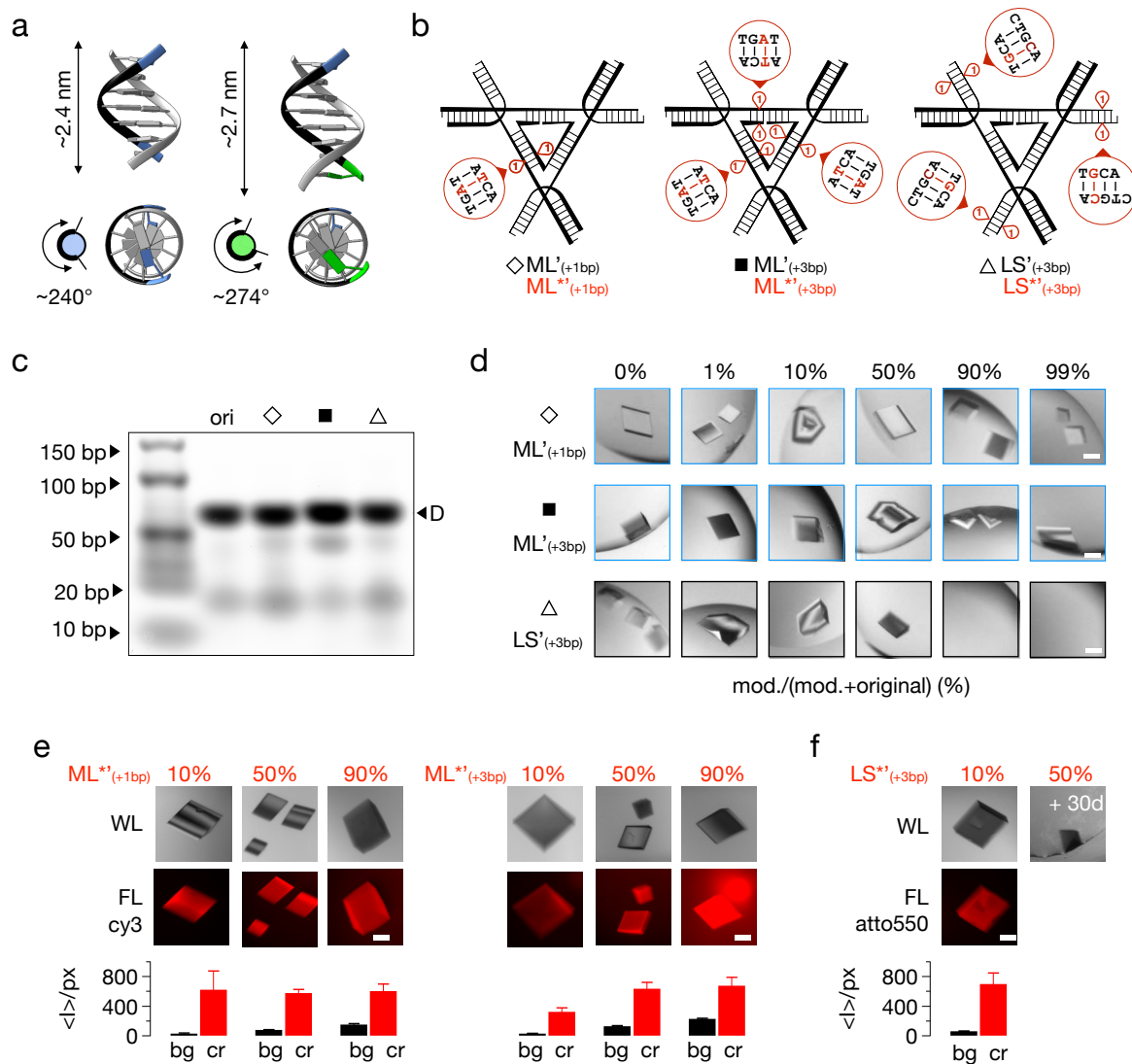


Abbildung 4.6 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Basenpaarinsertionen. (a) 3D-Modell [7] und geometrische Kenngrößen einer B-Form-DNA mit sieben (links) und acht (rechts) Basenpaaren. (4agz.pdb [106]). (b) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Basenpaarinsertionen in der Kernregion ($ML'_{(+1bp)}$, $ML'_{(+3bp)}$) und Armregion ($LS'_{(+3bp)}$). (c) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (b) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Symbole wie in (b); D markiert die Dreiecksbande. (d) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten Strängen (mod.) aus (b) und abnehmendem Anteil an entsprechenden originalen Strängen (original). (e, f, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten M*-Strängen (e) oder der S*-Strängen (f). (e, f, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Maßstäbe: $100 \mu\text{m}$.

90 % und 99 % Anteil an modifizierten Strängen Mikrokristalle, die sowohl aus den pseudodefekten DNA-Dreiecken als auch aus teilweise assemblierten DNA-Motiven bestehen könnten. Für Modifikationen mit drei verkürzten DNA-Dreiecksseiten blieben die Tropfen bei diesen Bedingungen klar (Abb.4.7 b).

Fluoreszenzmarkierte M^{*} -Stränge, die nur eine verkürzte Dreiecksseite erzeugen, wurden sehr schwach in das Kristallgitter der originalen DNA-Dreiecke integriert, was anhand der geringen Fluoreszenz der Kristalle nur in kontrastverstärkten Darstellungen der Bilder deutlich wurde. Der Großteil der fluoreszenzmarkierten Stränge war im Tropfenhintergrund verteilt und bildete dort kristalline Aggregate (Abb. 4.7 e, links). Im Gegensatz hierzu zeigten die Kristalle, die sich in Gegenwart fluoreszenzmarkierter, modifizierter Stränge für drei verkürzte Dreiecksseiten bildeten, keine Fluoreszenz und waren im Fluoreszenzkanal nicht erkennbar (Abb.4.7 e, rechts). Dies zeigte deutlich, dass diese Stränge überhaupt nicht in das Kristallgitter integriert wurden.

Varianten mit insgesamt drei Basenpaardeletionen in den Armbereichen des Dreiecksmotivs assemblierten mit ähnlicher Ausbeute wie das originale DNA-Dreieck und wurden in hohem Maße in die wachsenden Kristalle der originalen DNA-Dreiecke integriert (Abb.4.7 c, f). Ab einem Anteil von 50 % modifizierten L- und S-Strängen änderte sich die Morphologie der Kristalle in allen Tropfen von Parallelotop- zu stabförmigen, meist in sich verwachsenen Kristallen (Abb.4.7 d, unten). Diese Beobachtung wurde ebenfalls für fluoreszenzmarkierte S-Stränge reproduziert, mit denen sich fluoreszierende stabförmige Kristalle bildeten. Dies zeigt, dass die pseudodefekten DNA-Dreiecksspezies eingebaut wurden (Abb.4.7 f). Bei noch höherem Anteil an modifizierten L- und S-Strängen (und entsprechend geringerem Anteil an originalen L- und S-Strängen) bildeten sich nur noch stark verzweigte, kristalline Aggregate, die keine optische Aktivität aufwiesen (Abb.4.7 d, unten).

Die Bildung länglicher Kristalle deutet an, dass lokale Unterschiede in der Verdrehung der Helixdomänen über das Kristallgitter aufsummiert werden und erst mit höherem Anteil pseudodefekter DNA-Dreiecke in Erscheinung treten. Dies unterstreicht erneut die Flexibilität und Robustheit des Kristallgitters. Die stabförmige Morphologie deutet auf unterschiedliche Wachstumsraten an den Kristallflächen entlang und senkrecht zur Achse der kristallinen Stäbe hin. Die Verzweigungen in den kristallinen Aggregaten ab 90 % Anteil an modifizierten L- und S-Strängen deuten ebenfalls auf veränderte Wachstumsraten hin. Die fehlenden Kanten und die geringere optische Aktivität dieser Phase deutet außerdem an, dass die Aggregate keine weitreichende Fernordnung aufweisen. Die molekularen und kinetischen Ursachen für diese Wachstumseffekte konnten im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht werden.

Für Kristalle, die bei einem Anteil an 10 % bzw. 50 % modifizierten Strängen für DNA-Dreiecke mit verkürzter Armregionen gewachsen waren, wurden von Carina C. de Oliveira Mann³ Streumuster unter Röntgenbestrahlung⁴ aufgenommen (Abb. 4.8). Diese Daten stellen eine grobe Kartierung des Streuvermögens aus vier Winkeleinstellungen dar, können jedoch nicht zur Indexierung der Kristalle, zur Bestimmung der Raumgruppe oder der Kristallstruktur verwendet werden. Hierfür wäre ein kompletter 360°-Datensatz mit feinen Rotationsschritten nötig, dessen Messung im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte. Die vorhandenen Daten zeigen trotzdem die Tendenz an, dass Kristalle mit höherem Anteil pseudodefekter DNA-Dreiecke mit schlechterer Auflösung streuen. Die Streumuster

³Lehrstuhl für strukturelle Molekularbiologie, AG Hopfner am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

⁴Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz

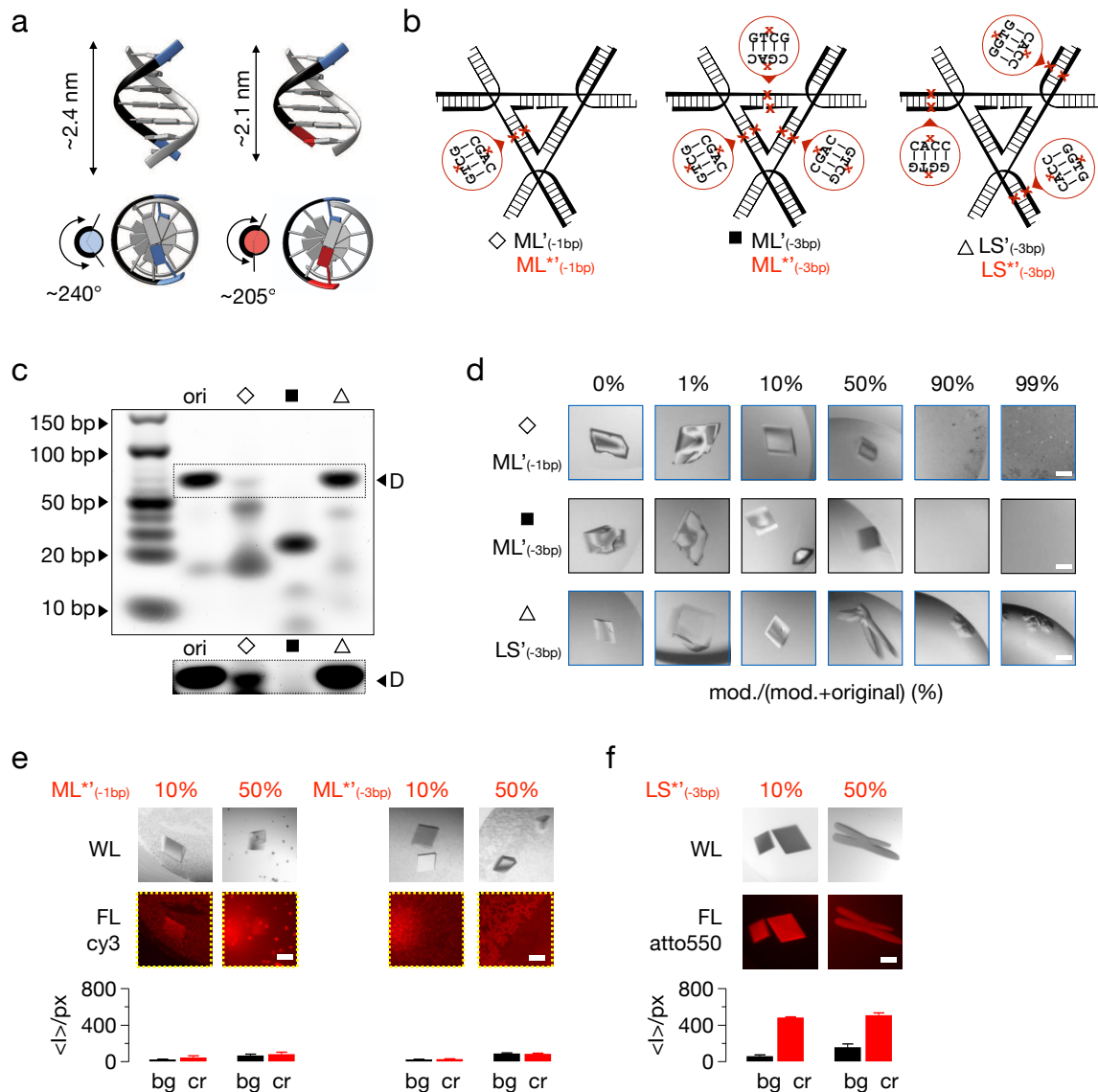


Abbildung 4.7 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Basenpaardeletionen. **(a)** 3D-Modell [7] und geometrische Kenngrößen einer B-Form-DNA mit sieben (links) und sechs (rechts) Basenpaaren. (4agz.pdb [106]). **(b)** Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Basenpaardeletionen in der Kernregion ($ML'_{(-1bp)}$, $ML'_{(-3bp)}$) und Armregion ($LS'_{(-3bp)}$). **(c)** Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (b) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Symbole wie in (b); gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Darstellung der Region um die Dreiecksbande (D). **(d)** Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten Strängen (mod.) aus (b) und abnehmendem Anteil an entsprechenden originalen Strängen (original). **(e, f, oben)** Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisierter Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten M*-Strängen (e) oder S*-Strängen (f). Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. **(e, f, unten)** Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Maßstäbe: 100 μm .

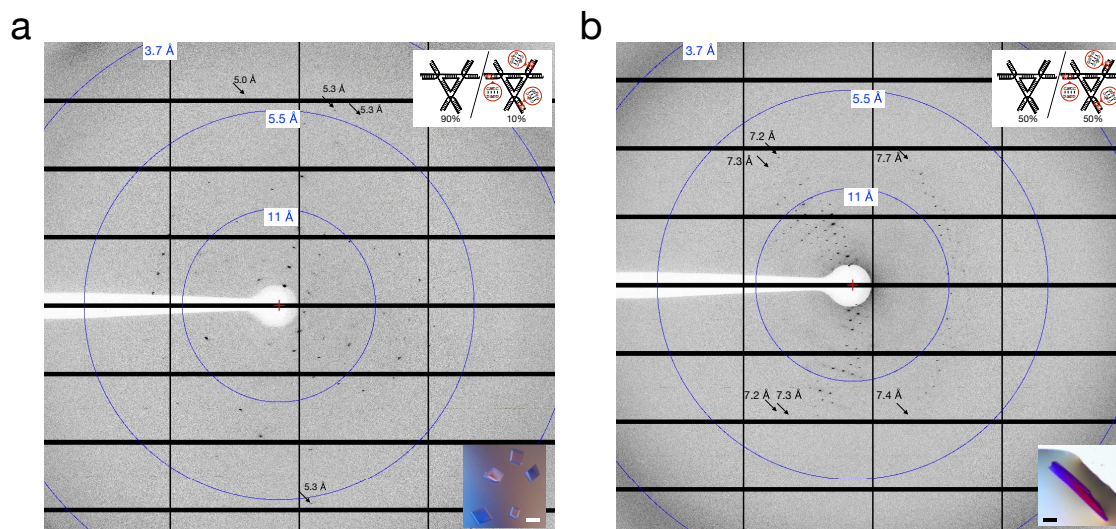


Abbildung 4.8 – Streumuster von heterogen zusammengesetzten Kristallen mit zunehmendem Anteil modifizierter Stränge. Kristalle wuchsen in Mischungen aus originalen DNA-Dreiecken und pseudodefekten DNA-Dreiecken mit verkürzter Armregion in Mischverhältnissen von **(a)** 10 % Anteil an modifizierten Strängen und **(b)** 50 % Anteil an modifizierten Strängen. Bildeinsätze zeigen schematische Darstellungen der DNA-Dreiecke im Gemisch (oben) und typische Kristalle in den Tropfen aus denen Kandidaten zur Kryokonservierung extrahiert wurden (unten). Die Einfärbung der Kristalle unter polarisiertem Weißlicht ist auf die Fluoreszenzmarkierung modifizierter Stränge zurückzuführen. Maßstäbe: 100 μm .

von Kristallen, die in Mischungen mit 10 % Anteil an modifizierten Strängen wuchsen, enthielten Reflexionen bis 5 Å (Abb. 4.8 a). Die Reflexionen in den Streumustern von Kristallen, die in Mischungen mit 50 % Anteil an modifizierten Strängen wuchsen, reichten hingegen nur bis 7 Å (Abb. 4.8 b). Eine bessere Einschätzung des Streuvermögens dieser Kristalle wäre mit kompletten Datensätzen zu den stabförmigen Kristallen im Vergleich zu Kristallen aus ausschließlich originalen DNA-Dreiecken möglich. Diese Datensätze zu messen wären nächste notwendige Schritte, um den Einfluss der veränderten Dreiecke auf die Qualität des Kristallgitters weiter zu untersuchen.

4.2.4 Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen

Insertionen in nur einem der komplementären Duplexstränge erzeugen einzelsträngige Ausstülpungen, die die betroffenen Doppelhelixdomänen thermodynamisch destabilisieren und verformen können [94, 102, 103, 107, 108]. Je nach Position der Ausstülpungen können zudem sterische Konflikte im Dreiecksmotiv auftreten. Pseudodefekte DNA-Dreiecke mit Ausstülpungen wurden durch Nukleotidinsertionen im M- oder L-Strang erzeugt. Modifizierte M-Stränge verändern ausschließlich die Kernregion des DNA-Dreiecksmotivs und bewirken auf Grund des Pfades, den der M-Strang im Motiv einnimmt, potentiell geringere sterische Konflikte als Modifikationen im Kernbereich des L-Strangs (Abb. 4.9 a, b). L-Stränge wurden außerdem im Armbereich des DNA-Dreiecksmotivs modifiziert, wo zwar geringere sterische Konflikte als im Kernbereich der L-Stränge erwartet werden, jedoch die Sticky Ends betroffen sein können (Abb. 4.9 c).

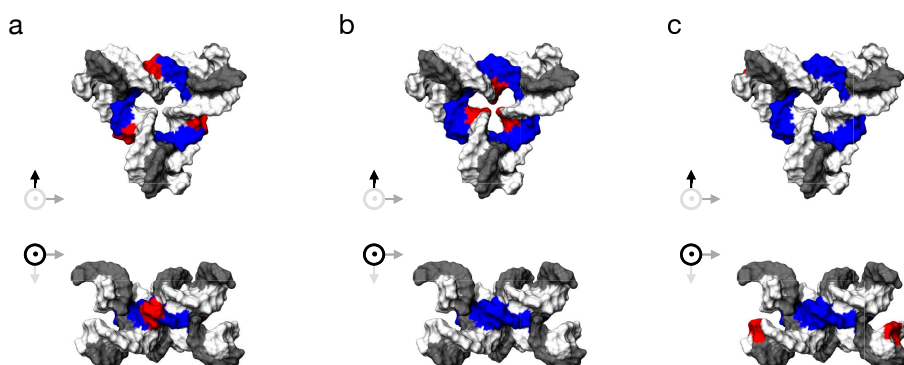


Abbildung 4.9 – Potentielle sterische Konflikte durch Einzelstrangausstülpungen in den Dreiecksmotiven. (a-c) 3D-Modell [7] des DNA-Tensegrity-Dreiecks (3gbi.pdb [18]) in zwei orthogonalen Ansichten. Farbkodierungen: blau: M-Strang; weiß: L-Strang; grau: S-Strang. Rote Markierungen zeigen die Position der Insertionen im M-Strang (a) oder in der Kernregion (b) bzw. Armregion (c) des L-Strangs.

Insertionen im M-Strang

Gelelektrophoretische Analysen der pseudodefekten DNA-Dreiecke spiegelten die zunehmende thermodynamische Destabilisierung der Dreiecke mit steigender Anzahl von Nukleotidinsertionen im M-Strang wider (Abb. 4.10 a–c): DNA-Dreiecke mit einer Ausstülpung von einer einzigen Base bildeten sich mit hoher Ausbeute, zwei Ausstülpungen von je einer Base führten bereits zu etwas geringeren Ausbeuten (Abb. 4.10 a, c). Beide Modifikationstypen kristallisierten in den Versuchsreihen zu Parallelotop-förmigen Dreieckskristallen und bildeten diese Kristalltrachten bei vernachlässigbaren Konzentrationen an originalen DNA-Dreiecken auch alleine aus (Abb. 4.10 d). Diese Resultate deuten an, dass der strukturelle Einfluss der getesteten Ausstülpungen im M-Strang des Dreiecksmotiv für das Kristallisationsverhalten der pseudodefekten Dreiecke nicht kritisch war, sodass originale und pseudodefekte Dreiecksspezies bezüglich ihrer geometrischen Interaktion kompatibel waren und die gebildeten Kristallgitter gleichermaßen ausbildeten.

Kristalle, die in Gemischen mit 50 % Anteil an modifizierten M-Strängen mit je einem zusätzlichen Nukleotid an zwei Positionen wuchsen, wurden von Carina C. de Oliveira Mann⁵ auf ihr Streuvermögen unter Röntgenbestrahlung⁶ getestet. Die gemessenen Streumuster dieser heterogen zusammengesetzten Kristalle wiesen Reflexionen mit ähnlicher Auflösung wie die Streumuster einiger Kristalle aus ausschließlich originalen DNA-Dreiecken auf (Abb. 4.11). Diese initiale Kartierung des Streuvermögens deutet an, dass der Einbau dieser pseudodefekten Dreiecksvarianten mit Einzelstrangausstülpungen keine oder nur geringe negative Effekte auf das Streuvermögen der Kristalle hat. Für konkrete Aussagen zum Streuvermögen wären allerdings komplette Datensätze von mehreren Kristallen jeder Variante notwendig, um auch den Einfluss aus Schwankungen zwischen dem Streuvermögen individueller Kristalle zu berücksichtigen (vgl. hierzu Abb. 3.5 a und Abb. 4.11 a).

Mit M-Strängen, die drei Ausstülpungen von drei bzw. fünf Basen erzeugen würden, bildeten sich bei den Bedingungen der Gelanalyse keine DNA-Dreiecke mehr (Abb. 4.10 b, c). In Mischungen aus modifizierten und originalen Strängen bildeten sich Parallelotop-förmige

⁵Lehrstuhl für strukturelle Molekularbiologie, AG Hopfner am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

⁶Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz

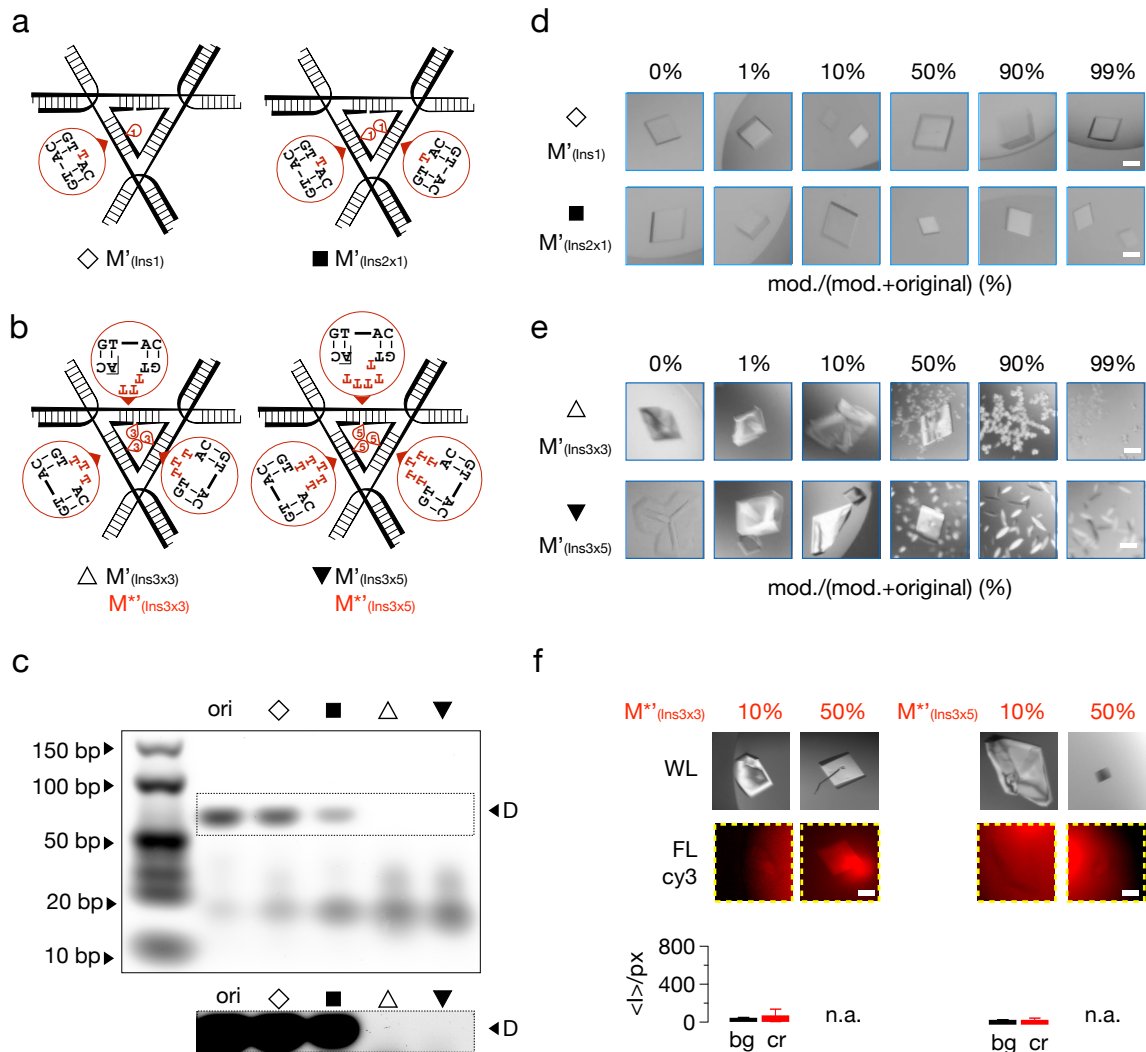


Abbildung 4.10 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Insertionen im M-Strang. (a, b) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Insertionen von (a) jeweils einem Nukleotid ($M'_{(Ins1)}$, $M'_{(Ins2x1)}$) und (b) jeweils drei bzw. fünf Nukleotiden im M-Strang ($M'_{(Ins3x3)}$, $M'_{(Ins3x5)}$). (c) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a, b) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Abbildung des Bildausschnitts um die Dreiecksbande (D). (d) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten M' -Strängen (mod.) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen M' -Strängen (original). (e) Daten wie in (e) für modifizierte M' -Stränge (mod.) aus (b). (f, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten M^{**} -Strängen ($M^{**}_{(Ins3x3)}$, $M^{**}_{(Ins3x5)}$). Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. (g, h, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen; n.a. markiert nicht auswertbare Tropfen. Maßstäbe: 100 μm .

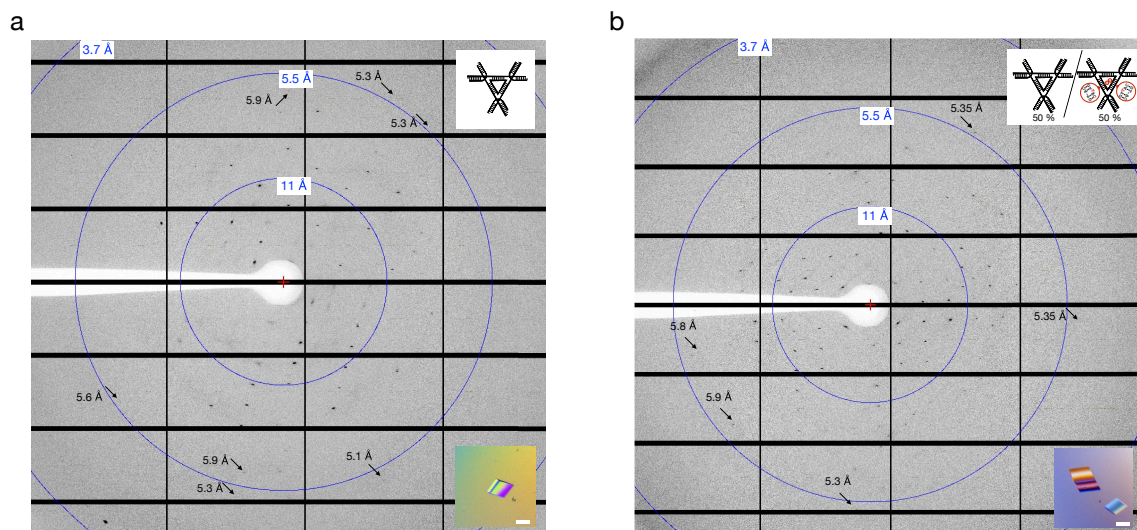


Abbildung 4.11 – Vergleich der Streumuster eines homogen und eines heterogen zusammengesetzten Dreieckskristalls. (a) Streumuster eines Kristalls aus originalen DNA-Dreiecken. **(b)** Streumuster eines heterogen zusammengesetzten Kristalls aus originalen und pseudodefekten DNA-Dreiecken mit Ausstülpungen im M-Strang. Bildeinsätze zeigen schematische Darstellungen der DNA-Dreiecke im Gemisch (oben) und typische Kristalle in den Tropfen aus denen Kandidaten zur Kryokonservierung extrahiert wurden (unten). Maßstäbe: 100 μm .

Kristalle in allen Bedingungen, die ausreichend originale DNA-Dreiecke enthielten. Ab einem Anteil von 50 % an modifizierten M-Strängen bildete sich in den Tropfen neben typischen DNA-Dreieckskristallen eine zweite kristalline Spezies. Diese zweite Spezies bildete reiskornförmige Stäbchen oder Sphärolithe und lag in Tropfen mit höherem Anteil modifizierter M-Stränge ausschließlich vor (Abb. 4.10 e). Dass sich in 1:1(vol:vol)-Mischungen aus modifizierten und originalen M-Strängen zwei Kristallspezies ausbildeten, legt nahe, dass sich die Geometrie und Energie der Wechselwirkungen in den Kristallgittern der beiden Spezies unterschieden. Die Daten aus der Gelelektrophorese deuten an, dass die Sphärolithe und reiskornförmigen Stäbchen vermutlich nicht aus DNA-Dreiecken, sondern eher aus missassemblierten Spezies bestanden (Abb. 4.10 c). In der Literatur finden sich zahlreiche strukturelle Analysen von Einzelstrangausstülpungen, die eine Verbiegung der betroffenen Duplexdomänen durch diese Modifikationen beschreiben [102, 103, 107, 108]. Die Insertionen in den M-Strängen könnten ähnliche Effekte auf die Duplexkonfiguration haben und dadurch die Bildung einer neuen kristallinen Spezies mit begünstigen. Die Ausbildung von Sphärolithen deutet allerdings auf fehlende Fernordnung der Untereinheiten in diesen Kristallaggregaten hin. Sie sind für weiterführende Röntgenstrukturanalysen nicht geeignet. Eine Röntgenstrukturanalyse der reiskornförmigen Kristalle wäre ein möglicher weiterführender Ansatz, um zu klären, ob diese Kristalle aus einer definierten Untereinheit bestehen oder ebenfalls kristalline Aggregate darstellen.

In Tropfen mit fluoreszenzmarkierten und modifizierten M^{*}-Strängen konnte die Bildung dieser zweiten kristallinen Spezies – vermutlich auf Grund der Präsenz des Fluorophors – nicht reproduziert werden (Abb. 4.10 f). In der stark kontrastverstärkten Darstellung einzelner Kristalle zeigte sich, dass fluoreszenzmarkierte Stränge mit drei zusätzlichen Basen in den drei Ausstülpungen sehr schwach in die Kristalle eingebaut wurden, obwohl die Assemblierung

der pseudodefekten DNA-Variante im Agarosegel nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 4.10 e und f). Möglicherweise war die Bildung dieser Variante bei höheren Salz- und Probenkonzentrationen im equilibrierten Tropfen trotzdem zu einem geringen Anteil möglich, wobei der größte Teil dieser M^{*} -Stränge trotzdem im Tropfenhintergrund zurückblieb, wie aus der Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ersichtlich wurde (Abb. 4.10 f, links unten). Die thermodynamisch noch stärker destabilisierte Variante mit fünf zusätzlichen Basen in den drei Ausstülpungen wurde wie erwartet überhaupt nicht in das Kristallgitter integriert (Abb. 4.10 f).

Insertionen in der Kernregion des L-Strangs

Ausstülpungen in der Kernregion des L-Strangs hatten einen stärkeren Effekt auf die Faltungsausbeute als Ausstülpungen im M-Strang. Proben mit einer Insertion von einer bzw. drei Basen in der Kernregion des L-Strangs zeigten keine klaren DNA-Dreiecksbanden im Gel (Abb. 4.12 a, c). Im stark kontrastverstärkten Bildausschnitt um die Dreiecksbande lässt sich eine schwache, etwas schnellere Bande für Proben mit einer Einzelnukleotidinsertion erkennen, was auf teilweise gefaltete oder verformte, pseudodefekte DNA-Dreiecksmotive hindeutet (Abb. 4.12 c). In heterogenen Kristallisationsansätzen hatte die Anwesenheit von L-Strängen mit einer Insertion von einem Nukleotid in der Kernregion einen inhibierenden Effekt auf das Kristallisationsverhalten des DNA-Dreiecks (Abb. 4.12 a, d). Ab einem Anteil von 50 % modifizierten L-Strängen in den Tropfen bildeten sich nur noch Sphärolithe ohne weitreichende Fernordnung aus, die auch bei einem Überschuss von modifizierten Strängen über originale Stränge vorlagen. L-Stränge mit einer Insertion von drei Nukleotiden wurden hingegen in den Gemischen toleriert und es bildeten sich Kristalle in allen Tropfen mit ausreichender Konzentration an originalen Einzelsträngen (Abb. 4.12 a, d).

Die stärkere Beeinträchtigung durch L-Stränge mit einer Einzelnukleotidinsertion lässt sich dadurch erklären, dass sich mit L-Strängen, die Einzelstrangausstülpungen von drei Nukleotiden im Kernbereich verursachen würden, auf Grund höherer thermodynamischer Kosten und sterischer Konflikte vermutlich keine oder kaum pseudodefekte Dreiecksspezies ausbildeten, die die Kristallisation der originalen DNA-Dreiecke hätten stören können. Für L-Stränge mit Einzelnukleotidinsertion war hingegen die Bildung einer pseudodefekten DNA-Dreiecksspezies wahrscheinlicher. Diese Hypothese bestätigte sich in der Fluoreszenzverfolgung markierter $L^{*'}_{(Ins1)}$ -Stränge, die trotz der zusätzlichen thermodynamischen Kosten für die interne Markierung schwach in die Kristalle integriert wurden. In Anwesenheit dieser $L^{*'}_{(Ins1)}$ -Stränge bildeten sich – im Gegensatz zu entsprechend modifizierten, unmarkierten L^* -Strängen – auch bei einem Anteil von 50 % noch Kristalle (vgl. Abb. 4.12 b, f). Dieser Unterschied im Kristallisationsverhalten ist darauf zurückzuführen, dass intern markierte L^* -Stränge generell weniger in die Dreiecksmotive eingebaut werden, wodurch die Populationsverteilung originaler und pseudodefekter DNA-Dreiecke zugunsten höherer effektiver Konzentrationen an originalen Dreiecken beeinflusst wird (vgl. Abb. 4.2 und Abb. 4.12 f).

Insertionen in der Armregion des L-Strangs

Mit L-Strängen, die Nukleotidinsertionen von einer bzw. drei Basen im Armbereich des DNA-Dreiecks enthielten, konnten sich pseudodefekte DNA-Spezies mit etwas geringerer Faltungsausbeute als die originalen DNA-Dreiecke klar ausbilden (Abb. 4.12 b, c). Dies legt nahe, dass die Destabilisierung der Dreiecksmotive durch Nukleotidinsertionen in der Armregion im Vergleich zur Kernregion geringer ist. In Kristallisationsansätzen kristallisierten diese pseu-

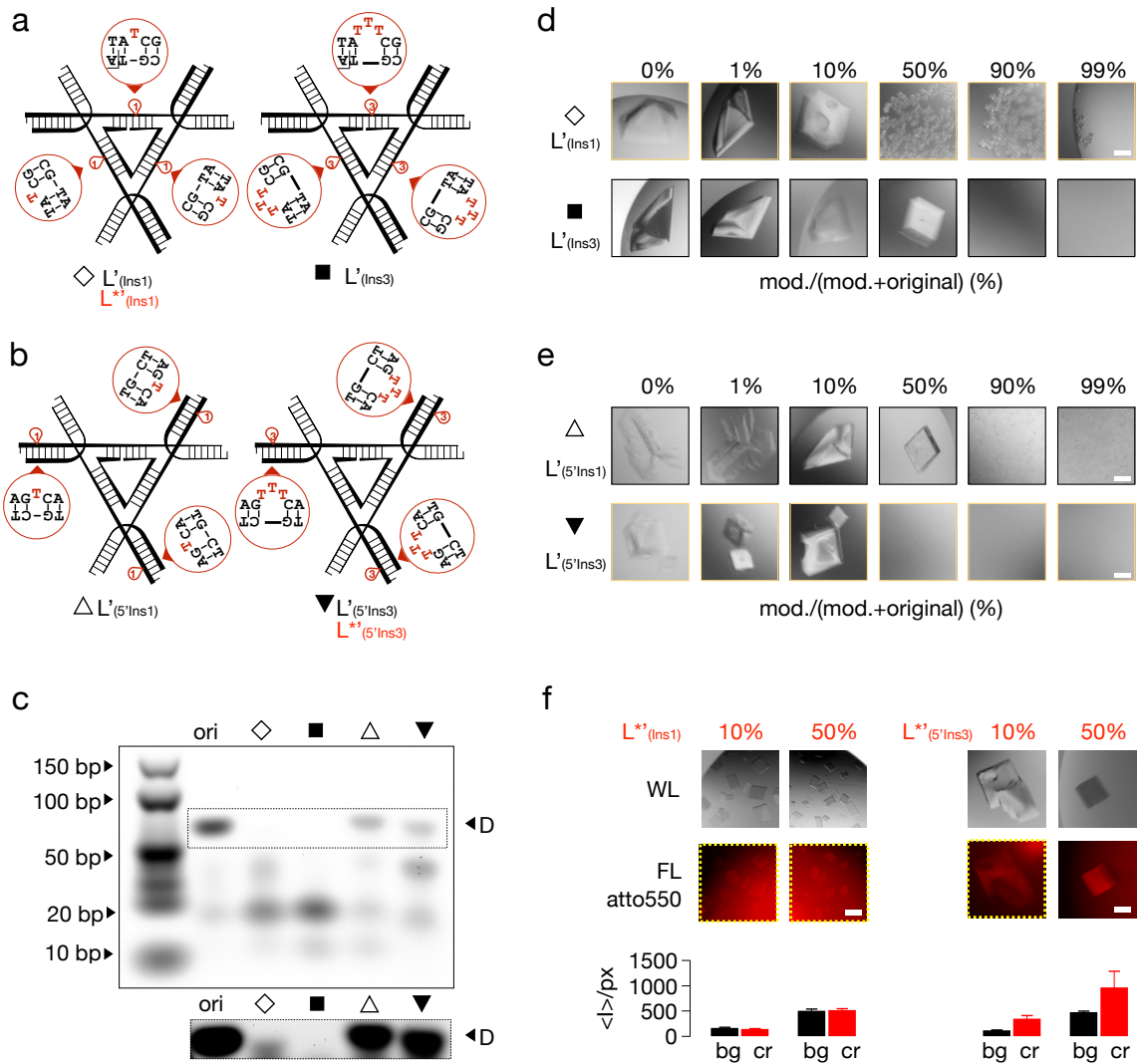


Abbildung 4.12 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Insertionen im L-Strang. (a, b) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Insertionen von jeweils einem bzw. drei Nukleotid(en) in (a) der Kernregion ($L'_{(Ins1)}$, $L'_{(Ins3)}$) und (b) der Armregion ($L'_{(5'Ins1)}$, $L'_{(5'Ins3)}$). (c) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a, b) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Abbildung des Bildausschnitts um die Dreiecksbande (D). (d) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten L'-Strängen (mod.) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen L'-Strängen (original). (e) Daten wie in (d) für modifizierte L'-Stränge (mod.) aus (b). (f, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten L'-Strängen ($L^{*'}_{(Ins1)}$, $L^{*'}_{(5'Ins3)}$). Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. (g, h, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Maßstäbe: 100 μ m.

dodefekten DNA-Dreiecksspezies allerdings nicht alleine (Abb. 4.12 e). L-Stränge mit Einzel-nukleotidinsertion im 5'-Bereich wurden in Mischungen mit ausreichend originalen Strängen toleriert, während L-Stränge mit einer Insertion von drei Nukleotiden im 5'-Bereich die Kristallisation schon bei einem Anteil von 50 % komplett inhibierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pseudodefekten DNA-Dreiecke mit den originalen Dreiecken in Wechselwirkung traten und im Fall der Variante mit drei zusätzlichen Nukleotiden im Armbereich die Kristallisation hemmen konnten.

Die erzeugten Einzelstranginsertionen bewirken eine thermodynamische Destabilisierung der Doppelhelix im Bereich um die Ausstülpung und können ein Ausfransen der Sticky Ends verursachen [94]. Die Strangtopologie in der Armregion des DNA-Dreiecks lässt sich mit Hilfe des Softwarepakets *NUPACK* auf Basis experimentell bestimmter thermodynamischer Parameter zur DNA-Duplexstabilität vorhersagen (Abb. 4.13) [109]. Diese theoretische Analyse ergab, dass pseudodefekte DNA-Dreiecke mit drei zusätzlichen Basen in der Armregion im Gleichgewicht überwiegend mit ausgefransten Duplexenden vorliegen (Abb. 4.13 c). Die modifizierten DNA-Dreiecke weisen aber noch drei intakte Sticky Ends im 3'-Bereich der L-Stränge auf. Diese können mit originalen DNA-Dreiecken in der korrekten Geometrie interagieren und dazu führen, dass die pseudodefekten DNA-Dreiecke in Nukleationskeime eingebaut werden und dort das Wachstum zu kritischen Größen hemmen. Bei starkem Überschuss originaler Dreiecksspezies, wie beispielsweise in Mischungen mit nur 10 % Anteil an modifizierten L-Strängen, bildeten sich trotzdem Kristalle aus. Ansätze mit fluoreszenzmarkierten, modifizierten L*-Strängen bestätigten, dass die L-Stränge mit Dreibaseninsertion auch hier in das Kristallgitter integriert wurden (Abb. 4.12 f). Dies zeigt, dass eine ausreichende Menge originaler DNA-Dreiecke auch den Einbau von geringen Mengen an DNA-Dreiecken mit defekten Sticky-End-Kontakten kompensieren konnte. Wie auch in anderen Kristallansätzen mit fluoreszenzmarkierten L-Strängen bildeten sich hier Kristalle bei einem Anteil von 50 % modifizierter, markierter L-Stränge, in denen die Kristallisation durch nicht markierte, modifizierte L-Stränge bereits inhibiert war (Abb. 4.12 e, f). Dieser Effekt ist auf geringere Inkorporationsraten der markierten Stränge in das Dreiecksmotiv zurückzuführen und veranschaulicht, wie der Einfluss modifizierter Stränge von deren Integration ins Dreiecksmotiv abhängt.

Durch die Insertion von nur einem Nukleotid im 5'-Bereich des L-Strangs werden die Sticky Ends ebenfalls destabilisiert, die Ausbildung des Sticky Ends ist jedoch thermodynamisch wahrscheinlicher (Abb. 4.13 b). Aus Kristallstrukturen von Duplexen mit Ausstülpungen von einem Nukleotid ist bekannt, dass die Flexibilität des Phosphatrückgrats eine ausgeklappte und eingeklappte Konformation des ungepaarten zusätzlichen Nukleotids zulässt [110]. In beiden Konfigurationen sind die Verformungen wie beispielsweise Knicke der B-Form-DNA gering und stabilisierende Stapelwechselwirkungen zwischen den Nukleotidpaaren sind möglich. Die Versuche in heterogenen Kristallisationsansätzen zeigten, dass die pseudodefekte DNA-Spezies zu stark modifiziert war, um eigens zu kristallisieren (Abb. 4.12 e). Die Anwesenheit dieser Spezies wirkte jedoch auch weniger inhibierend auf die Kristallisation als DNA-Dreiecke mit komplett ausgefransten Sticky Ends.

4.2.5 Ausstülpungen durch Einzelstrangdeletionen

Die Deletion einzelner Nukleotide in nur einem Strang eines DNA-Duplexes erzeugt eine Ausstülpung im komplementären Strang und verändert zusätzlich die Länge und Torsion der betroffenen Doppelhelixdomäne.

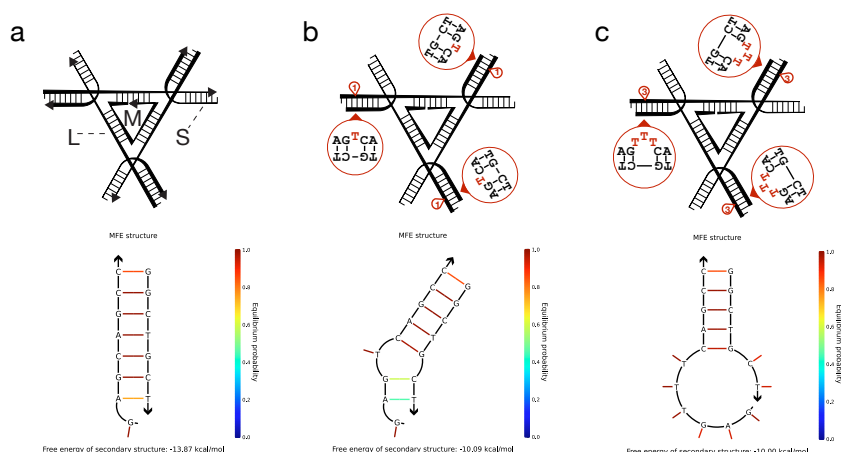


Abbildung 4.13 – Thermodynamische Destabilisierung der Sticky-End-Region durch Insertionen im L-Strang. (a-c) Schematische Darstellung des originalen DNA-Dreiecks (a) und pseudodefekter DNA-Dreiecke mit Insertion von einem (b) und drei (c) Nukleotiden in der Armregion (oben). Die untere Reihe zeigt für die jeweiligen Varianten die wahrscheinlichste Strangtopologie in der Armregion im 5'-Bereich des L-Strangs. Strangtopologien und Gleichgewichtsverteilungen wurden mit Hilfe des Softwarepakets *NUPACK* bei 20 °C, einer Strangkonzentration von jeweils 90 µM und Salzbedingungen von 50 mM Natriumchlorid und 200 mM Magnesiumchlorid berechnet [109]. Die Farbkodierung gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die markierte Basenpaarung bei den gegebenen Bedingungen im Gleichgewicht vorliegt. Pfeilspitzen in (a) markieren das 3'-Ende der Stränge L, M und S.

Einzelstrangdeletionen im M-Strang

M-Stränge mit internen Deletionen wurden in Kristallisationsansätzen toleriert, was zusammen mit den fehlenden Dreiecksbanden in der Mobilitätsanalyse darauf schließen lässt, dass die Stränge, die Ausstülpungen in den komplementären Abschnitten der L-Strängen erzeugen würden, nicht oder kaum in pseudodefekte DNA-Dreiecksspezies integriert wurden (Abb. 4.14 a, b). Für Ansätze mit M-Strängen, die zwei Ausstülpungen in den komplementären Bereichen der L-Stränge erzeugen würden, bildete sich für höhere Anteile an modifizierten Strängen (> 50 %) eine zweite, stabförmige Kristallspezies (Abb. 4.14 c). Aus den Ergebnissen der Gelelektrophorese lässt sich folgern, dass es sich hierbei nicht um Kristalle aus DNA-Dreiecken, sondern aus Nebenprodukten der Faltungsreaktion handelte. Die Koexistenz zweier Kristallspezies legt außerdem nahe, dass die Nebenprodukte nicht mit der Geometrie des Kristallgitters aus DNA-Dreiecken interagieren konnten.

In Versuchen mit fluoreszenzmarkierten, modifizierten M*-Strängen bildete sich anstelle der stabförmigen Kristallspezies fluoreszierendes Präzipitat. Ein geringer Teil der M*-Stränge mit zwei Deletionen wurde in das Kristallgitter der originalen Dreiecke integriert, der Großteil der M*-Stränge blieb jedoch im Tropfenhintergrund (Abb. 4.14 d). Es ist denkbar, dass sich in den Kristallisationsansätzen mit unmarkierten M'-Strängen mehrere Spezies aus den modifizierten M-Strängen bildeten: pseudodefekte DNA-Dreiecke, die bezüglich der Kristallisation originaler DNA-Dreiecke toleriert wurden und Nebenprodukte der Faltungsreaktion, die wie beobachtet zu einer zweiten Spezies kristallisierten.

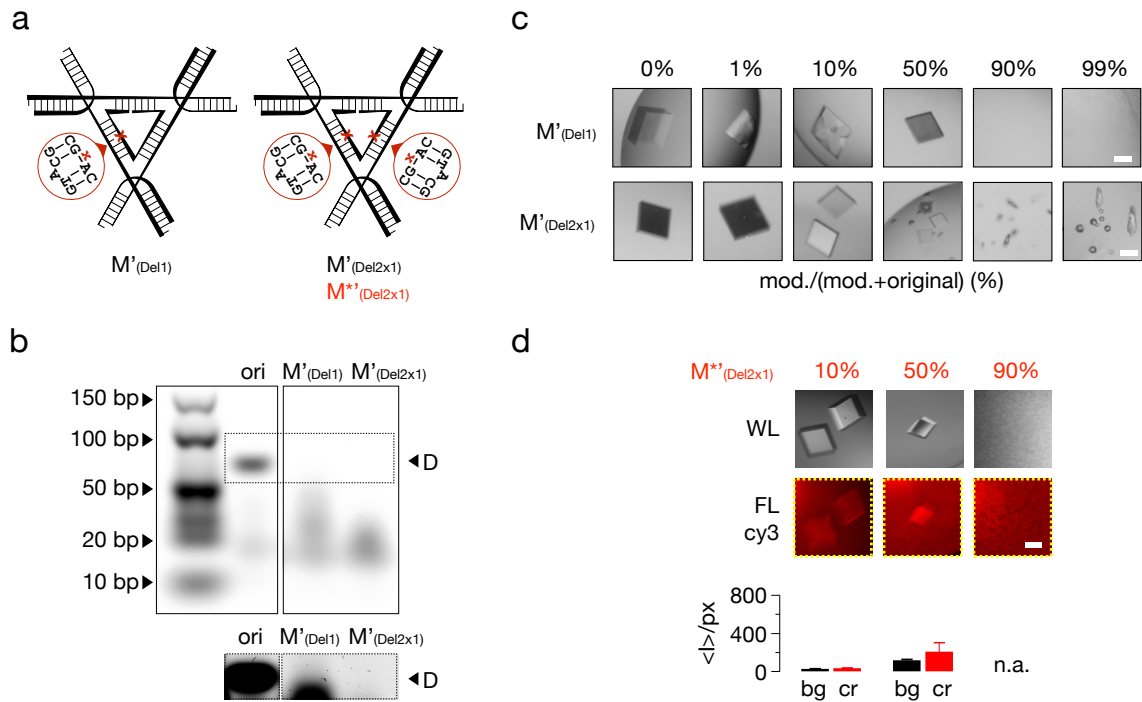


Abbildung 4.14 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Deletionen im M-Strang. (a) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Deletionen von jeweils einem Nukleotid im M-Strang ($M'_{(Del1)}$, $M'_{(Del2x1)}$). (b) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Es sind die entsprechenden Bildausschnitte des selben Gels gezeigt. Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Abbildung der Bildausschnitte um die Dreiecksbande (D). (c) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten M' -Strängen (mod.) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen M-Strängen (original). (d, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten $M^{**}_{(Del2x1)}$ -Strängen. Gelb gestrichelte Rahmen markieren kontrastverstärkte Abbildungen. (d, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Maßstäbe: 100 μm .

Einzelstrangdeletionen im Kernbereich des L-Strangs

L-Stränge mit Deletionen im Kernbereich würden die Seiten des DNA-Dreiecks verkürzen, die Umdrehung des Rückgratstrangs in den Dreiecksseiten verändern, und Ausstülpungen im komplementären M-Strang erzeugen. Laut gelelektrophoretischer Analyse der modifizierten Stränge konnten sich derart stark destabilisierte DNA-Dreiecke mit keinem der modifizierten L-Stränge ausbilden (Abb. 4.15 a, c). In den Kristallisationsansätzen zeigte sich, ähnlich wie für Insertionen in der Kernregion des L-Strangs (vgl. Abschnitt 4.2.4), dass die Anwesenheit von L-Strängen mit einer einzigen Nukleotiddeletion inhibierend auf die Kristallisation wirkte, während L-Stränge mit Deletionen von drei Nukleotiden toleriert wurden (Abb. 4.15 a, d). Auch hier ist anzunehmen, dass die L-Stränge mit nur einer Nukleotid-Deletion besonders in Mischungen mit originalen L-Strängen in eine pseudodefekte Dreiecksspezies integriert wurden, die mit originalen Dreiecken wechselwirken konnte und vermutlich die Bildung von Kristallgittern mit weitreichender Fernordnung verhinderten. L-Stränge mit drei Nukleotiden weniger im Kernbereich hingegen würden eine noch stärkere thermodynamische Destabilisie-

rung des DNA-Dreiecksmotivs erzeugen. Deswegen wurden sie vermutlich nicht in pseudodefekte DNA-Dreiecksspezies integriert, die die Kristallisation hätten beeinträchtigen können.

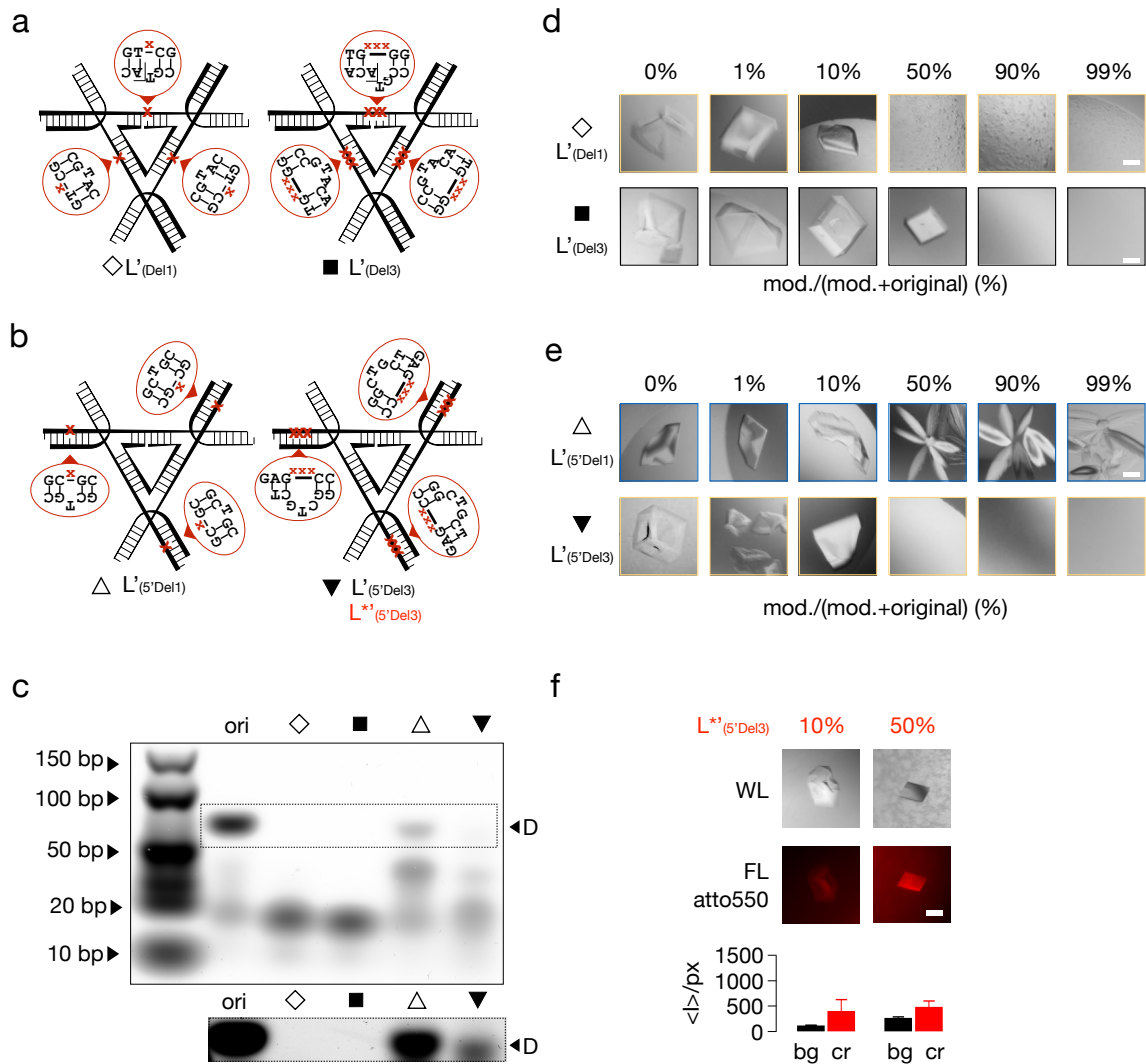


Abbildung 4.15 – Kristallisation in heterogenen Gemischen mit Deletionen im L-Strang. (a, b) Schematische Darstellung der Dreiecksmotive mit Deletionen von jeweils einem bzw. drei Nukleotid(en) in (a) der Kernregion ($L'_{(Del1)}$, $L'_{(Del3)}$) und (b) der Armregion ($L'_{(5'Del1)}$, $L'_{(5'Del3)}$). (c) Abbildung der gelelektrophoretischen Faltungsanalyse der Varianten aus (a, b) im Vergleich zum originalen Dreiecksmotiv (ori). Gestrichelter Rahmen: kontrastverstärkte Abbildung des Bildausschnitts um die Dreiecksbande (D). (d) Typische Bildausschnitte von Kristallisationsansätzen mit zunehmendem Anteil an modifizierten L-Strängen (mod.) aus (a) und abnehmendem Anteil an originalen L-Strängen (original). (e) Daten wie in (d) für modifizierte L-Stränge (mod.) aus (b). (f, oben) Typische Bilder von Kristallen unter linear polarisiertem Weißlicht (WL) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (FL) für Mischungen mit steigendem Anteil an fluoreszenzmarkierten, modifizierten $L'^*_{(5'Del3)}$ -Strängen. (f, unten) Verteilung des Fluoreszenzsignals im Tropfen, angegeben als mittlerer Graustufenwert pro Pixel im Hintergrund des Tropfens (bg) und in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wird (cr). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier identischen Tropfen. Maßstäbe: 100 μm .

Einzelstrangdeletionen im Armbereich des L-Strangs

Eine Deletion von einem Nukleotid im 5'-Bereich der L-Stränge erzeugt eine Ausstülpung im komplementären Abschnitt des S-Strangs und verkürzt zugleich die Armregion. DNA-Dreiecke mit dieser Modifikation bildeten sich mit etwas geringerer Faltungsausbeute als das originale DNA-Dreieck und kristallisierten auch alleine, allerdings mit veränderter Kristalltracht (Abb. 4.15 b, c, e). Die langen, ineinander verwachsenen Stäbe ähnelten den Kristallen, die sich in Gegenwart von Dreiecken mit Deletion eines kompletten Basenpaars in den Armregionen ausbildeten (vgl. Abb. 4.7). Im Gegensatz zu den Varianten mit Basenpaardeletionen bildeten die pseudodefekten DNA-Dreiecke mit einer Ausstülpung im S-Strang (erzeugt durch die Deletion im L-Strang) aber auch bei hohen Anteilen modifizierter Stränge noch stabförmige Kristalle (Abb. 4.15 e).

Durch die Deletion von drei Nukleotiden im 5'-Bereich des L-Strangs entsteht ein neues Watson-Crick-Paarungsschema, das die Ausbildung eines verkürzten Armes mit ausgefranstem Sticky End zur Folge hat (Abb. 4.16 c). Im kontrastverstärkten Bildausschnitt um die Dreiecksbande lässt sich erkennen, dass sich pseudodefekte DNA-Dreiecke mit derart modifizierten L-Strängen mit geringer Ausbeute ausbildeten (Abb. 4.15 c). Die Ergebnisse der Kristallisationsansätze zeigten die selben Effekte wie für andere Dreiecksvarianten mit defekten Sticky Ends: die Anwesenheit der modifizierten L-Stränge inhibierte die Kristallisation bei einem Anteil von 50 %. Fluoreszenzmarkierte L-Stränge wurden schwach in das Kristallgitter integriert und inhibierten die Kristallisation im Gegensatz zu den gleichen Modifikationen ohne Markierung nicht (Abb. 4.15 f).

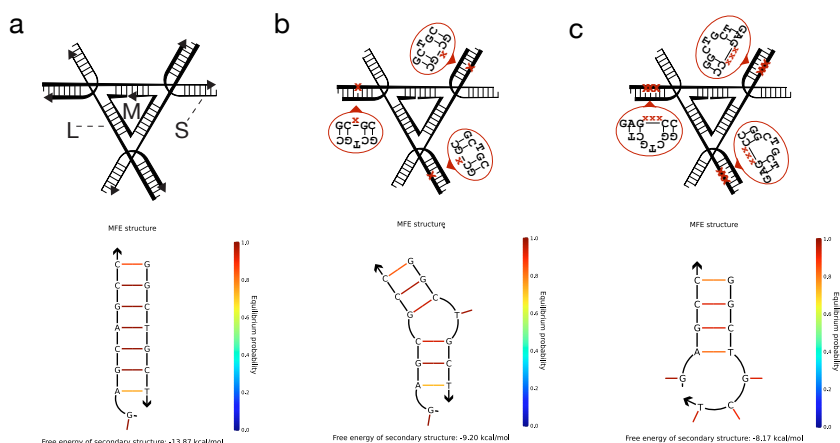


Abbildung 4.16 – Thermodynamische Destabilisierung der Sticky-End-Region durch Deletionen L-Strang. (a-c) Schematische Darstellung des originalen DNA-Dreiecks (a) und pseudodefekter DNA-Dreiecke mit Deletionen von einem (b) und drei (c) Nukleotiden in der Armregion (oben). Die untere Reihe zeigt für die jeweiligen Varianten die wahrscheinlichste Strangtopologie in der Armregion im 5'-Bereich des L-Strangs. Strangtopologien und Gleichgewichtsverteilungen wurden mit Hilfe des Softwarepakets *NUPACK* bei 20 °C, einer Strangkonzentration von jeweils 90 μ M und Salzbedingungen von 50 mM Natriumchlorid und 200mM Magnesiumchlorid berechnet [109]. Die Farbkodierung gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die markierte Basenpaarung bei den gegebenen Bedingungen im Gleichgewicht vorliegt. Pfeilspitzen in (a) markieren das 3'-Ende der Stränge L, M und S.

Vergleich der Kristalle mit stabförmiger Kristalltracht

Ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche Auswirkung von DNA-Dreiecken mit Basenpaardeletionen und mit Einzelstrangdeletion in der Armregion könnte im Einfluss der verbleibenden Ausstülpung auf die helikale Windung der DNA liegen. Durch die Deletion zweier komplementärer Nukleotide in der Armregion fehlt zwischen zwei interagierenden DNA-Dreiecken im Kristallgitter der 34° -Rotationsschritt eines Basenpaares. Die Windung der Armregion durch Einzelstrangdeletion im L-Strang ist wegen der verbleibenden Ausstülpung im S-Strang um etwa $25^\circ \pm 6^\circ$ reduziert, wie strukturelle Untersuchungen von DNA-Duplexen mit Adenin-Ausstülpungen zeigen [107]. Die etwas geringere Verdrehung im Vergleich zu Varianten mit einer Basenpaardeletion könnte die Orientierung der Dreiecke zueinander dahingehend begünstigen, dass die Ausbildung kristalliner Stäbe in den Tropfen auch ohne den kompensierenden Effekt originaler DNA-Dreiecke möglich ist. Röntgenstrukturanalysen der Stäbe im Vergleich zu den Kristallaggregaten, die sich aus Dreiecken mit Basenpaardeletionen in der Armregion bilden, wären notwendige nächste Schritte, um zu klären, ob eine der beiden Formationen tatsächlich eine weitreichende Fernordnung aufweist.

Eine Veränderung der Kristalltracht hin zu stabförmigen Morphologien wurde auch in Versuchsreihen beobachtet, die steigende Mengen des DNA-Interkalators Ethidiumbromid (EtBr) enthielten (Abb. 4.17). Durch die Interkalation des Farbstoffs zwischen zwei Basenpaaren wird die betroffene Duplexregion verlängert und ihre Windung wird reduziert. Folglich ist durch die Bindung des Interkalators die relative Orientierung interagierender DNA-Dreiecke zueinander verändert, weil nach 21-Basenpaaren einer Dreiecksseite mit interkalierendem EtBr-Molekül keine zwei vollständigen Umdrehungen der Rückgratstränge erreicht werden. Kristallisationsansätze in Gegenwart von EtBr zeigten, dass die wachsenden Dreieckskristalle ihre Morphologie änderten, wenn das Farbstoffmolekül in vergleichbaren Konzentrationen wie das Dreiecksmotiv vorlag. Zu hohe Konzentrationen des Interkalators, dem in der Literatur eine Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich zugeschrieben wird [111], inhibierten die Bildung von Kristalle dann komplett (Abb. 4.17). Dies lässt vermuten, dass die DNA-Dreiecke hier zu stark verformt waren um kristallisieren zu können.

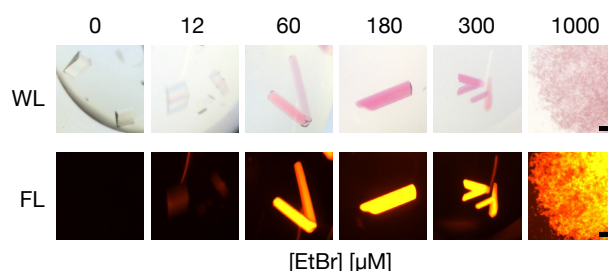


Abbildung 4.17 – Kristallisation des DNA-Dreiecks in Gegenwart von Ethidiumbromid. Typische Bilder der Kristallisationsansätze mit $60 \mu\text{M}$ DNA-Dreieck im finalen Tropfen und steigenden Konzentrationen des DNA-Interkalators Ethidiumbromid (EtBr). WL, Weißlicht; FL, Fluoreszenzbeleuchtung. Die Belichtungszeit in allen Tropfen betrug 0,3 Sekunden. Maßstäbe: $100 \mu\text{m}$.

Insgesamt zeigte sich in den Versuchen, dass die Veränderung der Kristalltracht von Parallelotop-förmigen hin zu stabförmigen Kristallen ein Wachstumseffekt ist, der mit der Veränderung der effektiven Orientierung der Dreiecke zueinander zusammenhängt und durch verschiedene Modifikationen der Ausgangsmischung erzeugt werden kann. Das DNA-Dreieck würde sich auf Grund seines reproduzierbaren Kristallisationsverhaltens gut eignen, um in

weiteren Wachstumsstudien die molekularen und kinetischen Ursachen für diesen Wachstumseffekt zu entschlüsseln.

4.3 Zusammenfassung und Überblick

Die Kristallisation des DNA-Dreiecksmotivs zeigte sich in den Versuchsreihen sehr robust gegenüber verschiedensten Formen der erzeugten Heterogenität. Hierzu zählen heterogene Gemische mit pseudodefekten Dreiecksspezies, die mit dem Kristallgitter interagieren können, aber auch Gemische mit massivem Hintergrund an fehlgefalteten Dreiecken und anderen Spezies, die zum Teil separat kristalline Phasen bildeten. Selbst die drastischsten Modifikationen, die die Interaktionsfähigkeit einiger Gitterkontakte zerstörten, hemmten die Kristallisation erst bei einem Anteil von 50 % an modifizierten L-Strängen. Bei deutlichem Überschuss der originalen Stränge ($\geq 90\%$) wirkte keine der eingebrachten Modifikationen inhibierend auf die Kristallisation.

Abbildung 4.18 stellt einen Überblick über die Ergebnisse aus den Kristallisationsreihen, der Gelelektrophorese und der Fluoreszenzverfolgung der insgesamt 28 getesteten Varianten in Puffer I dar. Modifikationen verschiedenen Typs sind hier nach den Effekten, die sie auf die Kristallisation des Dreiecksmotivs hatten, aufgelistet. Entscheidend für den Einfluss der modifizierten Stränge war, ob sie trotz der thermodynamischen Destabilisierung, die sie im Dreiecksmotiv bewirken würden, in die DNA-Objekte integriert wurden.

4.3.1 Kristallisierende Modifikationen

Kristallisierend mit originaler Kristalltracht

Einige der getesteten Modifikationen erzeugten pseudodefekte Dreiecksvarianten, deren Veränderungen für die Kristallisation nicht relevant waren. Sie betrafen ausschließlich Regionen, die nicht an der Ausbildung von Kristallkontakten beteiligt waren. Dementsprechend wurden die modifizierten Dreiecke zusammen mit originalen Dreiecken in die wachsenden Kristalle integriert. Sie bildeten aber auch alleine, bei vernachlässigbaren Konzentrationen originaler DNA-Dreiecke, typische Dreieckskristalle. Mit Ausnahme der Variante mit vier Basenfehlpaarungen im Kernbereich bildeten sich alle modifizierten DNA-Dreiecke dieser *kristallisierenden* Gruppe mit hoher Faltungsausbeute. Dies ist Voraussetzung dafür, dass auch in Tropfen mit Überschuss an modifizierten Strängen ausreichend DNA-Dreiecke im metastabilen Konzentrationsbereich vorhanden sind. Das Spektrum an Modifikationen, die *kristallisierende* Dreiecksspezies erzeugten, reichte von kaum veränderten Dreiecken mit Basenfehlpaarungen über Dreiecke mit Einzelstrangausstülpungen und flexiblen Bereichen hin zu potentiell geometrisch veränderten Dreiecken mit zusätzlichen Basenpaaren im Kernbereich. Trotzdem waren die so modifizierten DNA-Dreiecke offensichtlich mit dem Kristallgitter der originalen Dreiecke kompatibel. Dies deutet auf eine intrinsische Flexibilität des Kristallgitters hin, das auch leichte geometrische Unterschiede kompensieren kann. Die Ergebnisse zeigen außerdem die Robustheit der DNA-Matrix bezüglich der Unterbringung sterisch anspruchsvoller Gruppen. Die Bildung heterogen zusammengesetzter Kristalle aus kompatiblen Untereinheiten wurde auch in anderen Studien mit DNA-Kristallen, die auf nichtkanonischen Baseninteraktionen beruhen, beobachtet [63].

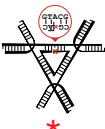

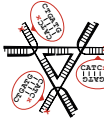

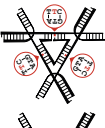
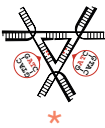

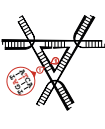

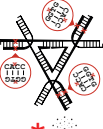

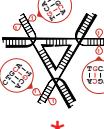
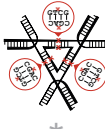
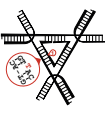
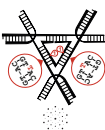

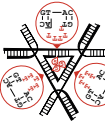

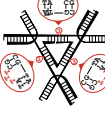

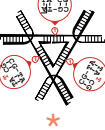
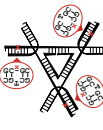
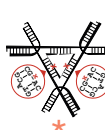
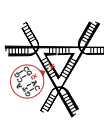
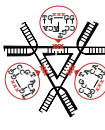

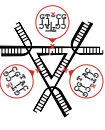
	kristallisierend		toleriert	inhibierend
	Paralleloptope $S \rightarrow D \rightarrow K$	neuer Habitus $S \rightarrow D \rightarrow K$ $S \times D \rightarrow K$	$S \rightarrow D \times K$ $S \times D \rightarrow K$	$S \rightarrow D \times K$ $S \times D \rightarrow K$
Strangverkürzungen				 
Basenfehlpaarungen	 			
Basenpaarinsertionen & -deletionen	 	 	 	
Ausstülpungen durch Insertionen	 	 	 	 
Ausstülpungen durch Deletionen		 	 	 

Abbildung 4.18 – Einfluss bestimmter Modifikationen auf die Kristallisation des DNA-Dreiecks. Dargestellt ist eine tabellarische Klassifizierung der 28 getesteten Varianten basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 4.2. Gelelektrophoretische Analysen zeigten, ob sich aus den jeweiligen modifizierten Strängen (S) pseudodefekte Dreiecke (D) ausbildeten. Sterne geben an, dass für diese Varianten mittels Fluoreszenzverfolgung bestimmt wurde, ob modifizierte Stränge in die Kristalle (K) eingebaut wurden. Rot, hellrot bzw. grau geben starke, schwache bzw. keine Integration der untersuchten Stränge an. Stilisierte Streumuster geben an, für welche Varianten das Streuverhalten der Kristalle aus den heterogenen Gemischen untersucht wurde. Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society..

Kristallisierend mit veränderter Kristalltracht

Modifikationen, die die Kristalltracht in den Tropfen beeinflussten, lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen: solche Strangmodifikationen, die nachweislich zu stärker veränderten pseudodefekten DNA-Dreiecken assemblierten und jene, die auf Grund der starken thermodynamischen Destabilisierung und geometrischen Verspannungen, die sie erzeugen würden, nicht oder nur kaum in DNA-Dreiecke integriert wurden.

Erstere erzeugten nachweislich eher hohe Faltungsausbeuten der pseudodefekten DNA-Dreiecke, sodass davon auszugehen ist, dass auch in Tropfen mit Überschuss an modifizierten Strängen kritische Probenkonzentrationen erreicht wurden. Im Gegensatz zu den *kristallisierenden* Varianten, die typische Dreieckskristalle bildeten, erzeugten die hier gelisteten Modifikationen offensichtlich stärkere Veränderungen der Gesamtstruktur der DNA-Dreiecke. Sie enthielten verkürzte Armregionen mit entsprechend geringerer Gesamtrotation des Rückgratstrangs oder eine verkürzte und verdrehte Dreiecksseite in der Kernregion. Diese Modifikationen kristallisierten zwar alleine, sie konnten jedoch bei starkem Überschuss der pseudodefekten DNA-Dreiecke nur Stäbe, Mikrokristalle oder kristalline Aggregate bilden. Dies deutet darauf hin, dass ihre geometrischen Veränderungen zu stark waren, um weiterhin zu Parallelotop-förmigen Kristallen zu kristallisieren. Bei Überschuss an originalen Dreiecken wurden diese pseudodefekten Varianten aber durchaus in das originale Kristallgitter integriert, das mit zunehmendem Anteil der modifizierten Stränge dann veränderte Kristalltrachten ausbildete. Auch diese Versuchsreihen zeigen die Robustheit des Kristallwachstums und die Flexibilität des Kristallgitters, das den Einbau geometrisch veränderter Varianten bis zu einem signifikanten Anteil kompensieren konnte.

Die zweite Untergruppe der Modifikationen, aus denen Kristalle mit veränderter Tracht hervorgingen, unterschieden sich dadurch von den übrigen *kristallisierenden* Varianten, dass für sie in Tropfen mit 1:1-Mischungen aus originalen und modifizierten Strängen zwei Spezies von Kristallen wuchsen – die originalen und die veränderten. Dies legt nahe, dass die modifizierten Stränge anstelle von DNA-Dreiecken zu anderen Motiven assemblierten, die ebenfalls kristalline Phasen ausbildeten. Hierzu passt auch, dass diese Kristalle nur auftraten wenn ausreichend modifizierte Stränge in den Mischungen vorhanden waren. Gerade die Ausbildung typischer Dreieckskristalle aus der originalen Fraktion in Anwesenheit einer anderen kristallisierenden Spezies veranschaulicht, dass die Interaktion der Dreiecke spezifisch und robust genug ist, um sich in isolierte Spezies zu sortieren.

Streuvermögen der heterogen zusammengesetzten Kristalle

Das Streuvermögen der DNA-Dreieckskristalle ist generell, vermutlich auf Grund der großen Hohlräume im Gitter, auch für Kristalle aus originalen DNA-Dreiecken mit 4–5 Åvergleichsweise gering [17, 54]. Die initiale Abschätzung des Streuvermögens für eine Beispielspezies der *kristallisierenden* Klasse deutet an, dass die Inkorporation der modifizierten Dreiecke dieses Streuvermögen nicht stark negativ beeinflusst. Im Gegensatz hierzu ergaben Kristalle, die DNA-Dreiecke mit verkürzter Armregion enthielten, Streumuster mit Reflexionen geringerer Auflösung. Weitere und komplette Datensätze mehrerer Kristalle wären nächste notwendige Schritte, um diese initialen Tendenzen zu prüfen.

4.3.2 Tolerierte Modifikationen

Modifikationen, die keinen Effekt auf das konzentrationsabhängige Verhalten der originalen Dreiecke im Gemisch hatten, setzten sich ebenfalls aus zwei Untergruppen - faltenden und nicht-faltenden Dreiecken - zusammen.

Die faltende Untergruppe bestand aus Varianten, die sich zwar ausbildeten, aber zu stark modifiziert waren, um eigenständig zu kristallisieren oder kristalline Aggregate zu bilden. Im Vergleich zu den Dreiecken der kristallisierenden Klasse enthielten diese Dreiecksmotive stärker veränderte Bereiche, wie beispielsweise eine größere flexible Region durch stärkere Strangverkürzung, oder eine stärkere geometrische Veränderung der Gesamtstruktur durch Insertion eines Basenpaares in der Armregion statt in der Kernregion. Laut Fluoreszenzverfolgung zweier Kandidaten konnten diese verformten, zu flexiblen oder destabilisierten DNA-Dreiecke trotzdem mit dem Kristallgitter wechselwirken und auch in Kristalle aus überwiegend originalen DNA-Dreiecken eingebaut werden. Die Kristallisation originaler Dreiecke war in den Versuchsreihen trotz der Präsenz dieser pseudodefekten Dreiecksspezies, die die korrekten Interaktionen stören und das Kristallgitter destabilisieren könnten, ebenso robust wie in Abwesenheit der modifizierten Varianten. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Interaktion der DNA-Dreiecke mit dem wachsenden Kristallgitter schwach genug ist, um *heilende* Umorganisationen zuzulassen. Unter diesen Voraussetzungen könnten pseudodefekte DNA-Dreiecke, die mit dem wachsenden Kristallgitter wechselwirken, durch die stabilere Interaktion eines kompetitierenden originalen DNA-Dreiecks verdrängt werden, sodass auch in Anwesenheit signifikanter Anteile an pseudodefekten DNA-Dreiecken, die nicht alleine kristallisieren können, die Kristallisation nicht inhibiert wird.

Die nicht-faltende Untergruppe setzte sich aus Strangmodifikationen zusammen, die eine zu starke Destabilisierung in dem Dreiecksmotiv erzeugen würden, sodass sich hier keine Dreiecke ausbildeten. Die Ergebnisse der Versuchsreihen zeigten, dass die stattdessen vorliegenden fehlgefalteten Dreiecke und Nebenprodukte der Faltungsreaktion die Kristallisation nicht störten. Dies wurde auch in den Versuchen zur Stöchiometrie der Stränge gezeigt (Abschnitt 3.2). Einige stärker modifizierte L-Stränge konnten – sofern sie nicht, wie beispielsweise Stränge mit drei fehlenden Nukleotiden in der Kernregion, zu stark modifiziert waren – zum Teil nur zusammen mit originalen L-Strängen Dreiecke ausbilden. Obwohl die eigentliche pseudodefekte Dreiecksspezies aus originalen und modifizierten L-Strängen dann vermutlich auch eigenständig hätte kristallisieren können, konnten sich diese pseudodefekten Dreiecke bei zu geringem Anteil originaler Stränge ebenso wenig in ausreichender Konzentration ausbilden, wie die originale Dreiecksspezies.

4.3.3 Inhibierende Modifikationen

Alle Strangmodifikationen, die das Kristallwachstum der originalen DNA-Dreiecke inhibierten, wurden durch modifizierte L-Stränge erzeugt. Zusammenfassend gibt es zwei Ursachen, deren Zusammenspiel den inhibierenden Effekt dieser Modifikationen ausmacht:

- Die modifizierten L-Stränge konnten in DNA-Dreiecke integriert werden und erzeugten Varianten, die mit dem Kristallgitter aus originalen DNA-Dreiecken zwar noch wechselwirken konnten, aber zu stark modifiziert waren, um auch alleine zu kristallisieren.
- L-Stränge, die in DNA-Dreiecke integriert werden, bewirken auf Grund ihrer Stöchiometrie eine stärkere Reduktion der originalen Dreiecksspezies, weil ein Teil der originalen

L-Stränge für die Ausbildung von pseudodefekten Dreiecksspezies mit ein oder zwei modifizierten L-Strängen verbraucht wird.

Die inhibierenden Modifikationen erzeugten verformte DNA-Dreiecke oder Dreiecke mit teilweise zerstörten Sticky Ends. Diese Modifikationen waren drastisch genug, um deutliche Auswirkungen auf die Gesamtstruktur oder die Interaktion der modifizierten Dreiecksspezies zu haben. Weniger drastische Modifikationen in den L-Strängen, wie beispielsweise L-Stränge mit Basenfehlpaarungen, führten durchaus zu *kristallisierenden* oder *tolerierten* Varianten. Andererseits waren die Modifikationen auch milde genug, um nicht auf Grund zu hoher thermodynamischer Kosten für die Integration ins Dreiecksmotiv komplett von der Faltung ausgeschlossen zu werden. Beispielsweise wurden L-Stränge mit drei zusätzlichen oder drei fehlenden Nukleotiden in der Kernregion vermutlich nicht in die Dreiecke integriert und konnten daher auch die Kristallisation nicht inhibieren.

In Gemischen mit gleichem Anteil an modifizierten und originalen L-Strängen lagen also zum einen weniger originale DNA-Dreiecke vor, als sich in Abwesenheit der modifizierten L-Stränge hätten bilden können. Zum anderen bildeten sich in den Gemischen vermutlich verschiedene pseudodefekte DNA-Dreiecksspezies mit einem, zwei oder drei modifizierten L-Strängen, von denen besonders die weniger stark modifizierten Dreiecke in wachsende Nukleationskeime integriert werden konnten und diese destabilisierten. Während in Gemischen mit *tolerierten* Dreiecksvarianten bei gleichem Anteil modifizierter und originaler Stränge noch ausreichend originale DNA-Dreiecke vorhanden waren, um pseudodefekte DNA-Dreiecke zu verdrängen, konnten sich in Gegenwart *inhibierender* Modifikationen hierfür vermutlich nicht ausreichend viele originale DNA-Dreiecke ausbilden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der potentiell störende Einfluss in heterogenen Proben gemischen am stärksten für jene Modifikationen ist, die in die zu kristallisierenden Objekte integriert werden und dort die Gesamtstruktur oder die Kristallkontakte stören. Trotzdem konnten auch die hier diskutierten *inhibierenden* Modifikationen die Kristallisation der Zielobjekte nur hemmen, wenn die Konzentration pseudodefekter Spezies größer als die Konzentration originaler DNA-Spezies war.

4.4 Vergleich von Puffer I und II

Um den Einfluss des Puffersystems auf die Kristallisation heterogener Gemische zu beleuchten, wurden die Versuchsreihen mit den 28 beschriebenen Dreiecksvarianten in zwei unterschiedlichen Puffersystemen untersucht (Puffer I und Puffer II). Im Vergleich der beiden Puffersysteme weist Puffer II die deutlich komplexere Zusammensetzung auf (vgl. Abb. 3.1 b). Der höhere Anteil an Kationen und die größere Vielfalt der Ionentypen in der Pufferlösung II konnten sich sowohl auf die Assemblierung und Stabilität der Dreiecke, als auch auf die Nukleationsraten oder das Kristallwachstum in den Tropfen auswirken. Generell führten die Versuchsreihen in Puffer I und II für die meisten getesteten Varianten zu gleichen Ergebnissen, die sich in *kristallisierende*, *tolerierte* und *inhibierende* Modifikationen klassifizieren ließen.

Um den Vergleich der Versuchsreihen untereinander zu erleichtern, wurden die Kristalle anhand ihrer makroskopischen Morphologie bewertet und auf Basis der resultierenden Kristallwertung graphisch dargestellt (Abb. 4.19 b, vgl. Abb. B.1). Ebenso wie in Puffer I wurden auch in Puffer II deutliche Schwankungen für die Referenzproben mit ausschließlich originalen DNA-Strängen beobachtet. Niedrige Kristallwertungen waren hier zumeist auf Verwachsungen von mehreren Kristallen ineinander zurückzuführen. Ein Überblick über typische

Kristallbilder aus den einzelnen Versuchsreihen ist in Kapitel A.2 aufgeführt. Die einzelnen Unterschiede zwischen den Puffersystemen werden im Folgenden beschrieben.

4.4.1 Generelle Unterschiede

Auf Grund der Konzentrationsabhängigkeit des DNA-Dreiecksmotivs, die in Abschnitt 3.1.2 untersucht wurde, würde man erwarten, dass sich in Puffer II auch bei Anteilen von nur 10 % originalen Strängen Kristalle innerhalb von zehn Tagen bilden können. Untersuchungen zu Gemischen mit hohem Anteil an missgefalteten Dreiecken und störenden Zufallsoligonukleotiden zeigten aber auch, dass ein Hintergrund von Nebenprodukten die Kristallisation geringer Probenmengen in Puffer II hemmen kann (vgl. Abschnitte 3.2 und 3.3). Tatsächlich bildeten sich in einigen Versuchsreihen zwar noch Kristalle in heterogenen Gemischen mit 50 %, jedoch nicht mehr mit 10 % verbleibendem Anteil an originalen Strängen aus. Die Klassifizierung *toleriert* wurde aus diesem Grund sowohl auf Versuchsreihen mit Kristallwachstum bis 50 % und bis 90 % Anteil an modifizierten Strängen angewandt (Abb. 4.19).

Mit inhibierenden Strangmodifikationen, die die Sticky-End-Region modifizierter DNA-Dreiecke beeinträchtigten, bildeten sich bei 50 % Anteil an modifizierten L-Strängen in Puffer II noch kleine, in sich verwachsene Kristalle. In Puffer I blieben diese Tropfen klar (vgl. Abb. 4.1 und Abb. 4.19). Da die Morphologie dieser Kristalle allerdings deutlich zeigte, dass das Kristallwachstum in den Tropfen stark beeinträchtigt war, wurden diese Varianten auch in Puffer II als *inhibierend* klassifiziert. Diese Beobachtung schlug sich ebenfalls in Kristallwertungen < 50 nieder und ist vermutlich zum einen auf die Präsenz der pseudodefekten DNA-Dreiecke in den Gemischen und zum anderen auf die stärkere Kristallisationstriebkraft in Puffer II zurückzuführen (Abb. 4.19). Bei einer erneuten Dokumentation dieser inhibierten Versuchsreihen nach ca. 200 Tagen zeigte sich, dass sich auch in Puffer I kristalline Aggregate vergleichbarer Morphologie gebildet hatten (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Spezielle Unterschiede

Spezielle Unterschiede des Kristallisationsverhaltens in Puffer I und II zeigten sich für Basenpaarinsertionen im Kernbereich und für einige Varianten mit Ausstülpungen in den Einzelsträngen. In diesen Fällen hatten die jeweiligen Strangmodifikationen in den Puffern unterschiedliche Auswirkungen auf das Kristallisationsverhalten der DNA-Dreiecke. Dies legt nahe, dass hier nicht generelle Unterschiede der Puffersysteme, sondern spezielle Aspekte der getesteten Dreiecksvarianten, die sich in Puffer I und II unterschieden, ausschlaggebend für die beobachteten Unterschiede waren. Zu diesen Aspekten zählen beispielsweise die Stabilität der Dreiecke, die Populationsverteilung originaler und pseudodefekter DNA-Dreiecke sowie die Gesamtstruktur der Dreiecksmotive, die sich in Puffer I und II unterscheiden können.

Basenpaarinsertionen im Kernbereich

Basenpaarinsertionen im Kernbereich wurden in Puffer II zwar toleriert und es bildeten sich Kristalle mit bis zu 90 % Anteil modifizierter Stränge, die Dreiecksvarianten mit drei verlängerten Seiten in der Kernregion kristallisierten in Puffer II jedoch nicht auch eigenständig, so wie in Puffer I (Abb. 4.20). Dieses Ergebnis deutet an, dass die Basenpaarinsertionen in den Dreiecksvarianten in Puffer II stärkere Auswirkungen auf die Gesamtstruktur der Dreiecksmotive hatten, sodass diese zu stark verformt waren um auch alleine ein Kristallgitter ausbilden zu können. Bereits geringfügig stärkere Verformungen der pseudodefekten Dreiecke in Puffer II

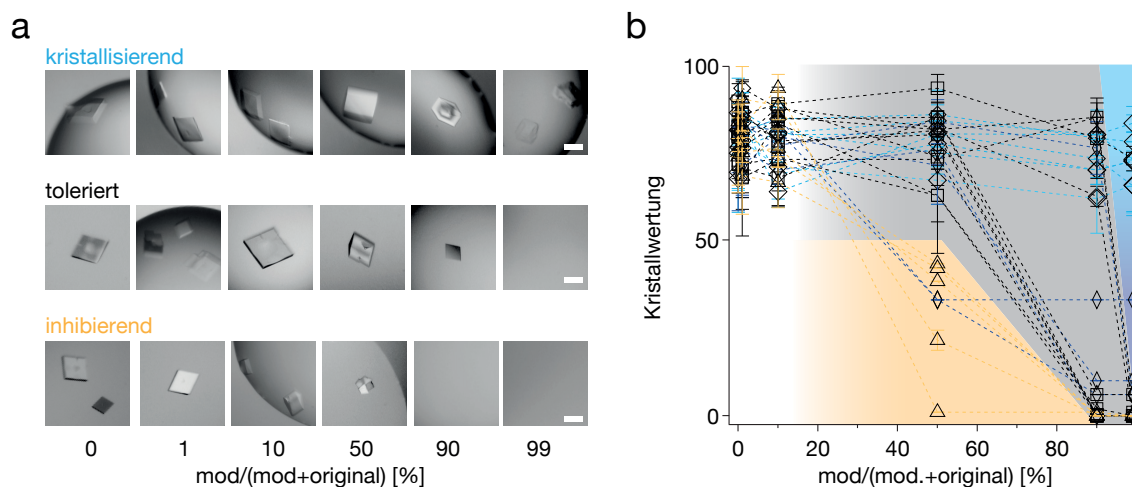


Abbildung 4.19 – Übersicht über die Ergebnisse der Versuchsreihen in Puffer II. (a) Bilder von typischen Kristallen zeigen Beispiele für Versuchsreihen mit *kristallisierender*, *tolerierter* und *inhibierender* Strangmodifikation. Die Stöchiometrie der Stränge, sowie die absolute Strangkonzentration in den Tropfen blieb unverändert ($L+L'/S+S'=180\ \mu\text{M}$, $M+M'=60\ \mu\text{M}$). Maßstab: $100\ \mu\text{m}$. (b) Kristallwertungen aus je vier identischen Tropfen pro Bedingung zeigen den Verlauf der Kristallisation mit zunehmendem Anteil modifizierter Stränge (mod). Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus vier Werten an. Gestrichelte Linien zwischen den Punkten dienen der optischen Führung. Die Farbkodierung der gestrichelten Linien und Einfärbungen im Hintergrund hebt die Klassifizierung in *kristallisierend* (blau), *toleriert* (grau) und *inhibierend* (orange) hervor.

könnten sich in den Nukleationskeimen aufsummieren und die Kristallisation in Abwesenheit originaler DNA-Dreiecke verhindern, wie beispielsweise für Varianten mit Basenpaarinsertionen in der Armregion in beiden Puffersystemen beobachtet wurde. Strukturelle und theoretische Studien zur DNA-Konformation in verschiedenen Lösungsmitteln und Puffersystemen schreiben der Polarität und dem Ionengehalt der Pufferlösung einen deutlichen Einfluss auf die vorliegende Konformation der DNA-Duplexe zu [112–115]. Während aus der Kristallstruktur des DNA-Dreiecksmotivs in Puffer II bekannt ist, dass die Duplexe abschnittsweise eher der Konformation von A-Form-DNA ähneln, wurde die tatsächliche Struktur des Dreiecksmotivs in Puffer I bislang noch nicht bestimmt [18]. Die Messung von Streudaten und Auflösung der Kristallstrukturen mit Auflösungen $< 3\ \text{\AA}$ für Kristalle aus originalen Dreiecken in Puffer I und II, sowie Kristallen aus ausschließlich modifizierten DNA-Dreiecken mit Basenpaarinsertionen wären nächste notwendige Schritte, um die Konformationen der Doppelhelixdomänen in diesen Kristallen näher zu untersuchen.

Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen

In Puffer II zeigten Einzelstrangausstülpungen von je einem Nukleotid im L-Strang geringere negative Effekte auf die Kristallisation in den Versuchsreihen als in Puffer I. So kristallisierten Varianten mit einer Ausstülpung von einer Base in der Armregion des L-Strangs in Puffer II auch alleine bei vernachlässigbar niedrigen Anteilen von nur 1 % an verbleibenden originalen L-Strängen. Im Gegensatz hierzu kristallisierten diese Varianten in Puffer I nicht alleine, vermutlich weil die betroffenen Armregionen der pseudodefekten DNA-Dreiecke hier zu stark verformt bzw. destabilisiert waren (4.2.4). Durch den höheren Kationengehalt in Puffer II sind die Sticky Ends in den betroffenen Armregionen mit Einzelstrangausstülpung stabiler als in

Puffer I (vgl. 4.13). In Puffer II ist daher im Gleichgewicht der Anteil an DNA-Dreiecken mit Einzelstrangausstülpung, die trotzdem intakte Sticky Ends in den betroffenen Regionen aufweisen, höher als in Puffer I. Es wäre außerdem denkbar, dass Einzelstrangausstülpungen in Abhängigkeit von Ionenstärke und -zusammensetzung des Puffers unterschiedlich starke Verformungen der betroffenen Duplexe erzeugen. Die hier beschriebenen Daten sprechen dafür, dass die Verformung der Armregion in Puffer II im Vergleich zu Puffer I geringer ist.

Einzelstrangausstülpungen von einem einzelnen Nukleotid im Kernbereich des L-Strangs wirkten in Puffer I inhibierend auf die Kristallisationsgemische. In Puffer II wurden diese modifizierten L-Stränge in den Gemischen toleriert und es bildeten sich Kristalle bis zu einem Anteil von 90 % an modifizierten L-Strängen. L-Stränge mit drei zusätzlichen Basen im Kernbereich wurden ebenfalls toleriert, hier bildeten sich jedoch auch in Puffer II nur Kristalle bis zu einem Anteil von 50 % an modifizierten L-Strängen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die modifizierten L-Stränge mit einer Einzelnukleotidinsertion in Puffer II in die DNA-Dreiecke integriert wurden und vermutlich in Kombination mit originalen L-Strängen pseudodefekte DNA-Dreiecke erzeugten, die alleine kristallisieren konnten. Bei vernachlässigbar geringen Anteilen an originalen Strängen ($\leq 1\%$) bildeten sich auch in Puffer II nur noch kristalline Splitter. Diese Ergebnisse legen ebenfalls nahe, dass die Einzelstrangausstülpungen in Puffer II geringere Verformungen des Dreiecksmotivs erzeugten. Dies kann zum einen an der Konfiguration der Ausstülpung selbst, zum anderen aber auch an einer global veränderten Gesamtstruktur des DNA-Dreiecks in Puffer II im Vergleich zu Puffer I liegen.

Fazit aus dem Puffervergleich

Die Versuchsreihen zeigten in beiden Puffersystemen, dass die Kristallisation des DNA-Dreiecks auch in heterogenen Gemischen robust abläuft, solange ausreichend originale DNA-Spezies vorhanden sind, die kristallisieren können. Die diskutierten Unterschiede der Versuchsreihen in Puffer I und II stellen heraus, wie strukturelle Aspekte der zu kristallisierenden Objekte zum Teil auch vom umliegenden Puffersystem beeinflusst werden, sodass potentiell störende Modifikationen je nach vorliegendem Puffersystem mehr oder weniger schwer wiegen können.

4.5 Stärkere Sticky-End-Interaktionen

Der Einfluss der Probenheterogenität wurde für 22 der 28 Dreiecksmodifikationen auch für DNA-Dreiecke mit zwei überhängenden Basen an den 5'-Enden der Duplexe getestet (GA-Variante: 5'-GA-Überhang am L-Strang, bzw. 5'-TC-Überhang am S-Strang.). Die Kristallisation dieser GA-Variante wurde in Abschnitt 3.4 beschrieben und zeigte nur in Puffer II reproduzierbares Kristallwachstum innerhalb von zehn Tagen⁷. Kontrollreihen zur Konzentrationsabhängigkeit ergaben außerdem, dass die Kristallisation der GA-Variante in einem Konzentrationsbereich von 30–60 μM DNA-Dreieck im equilibrierten Tropfen reproduzierbar ablief, wobei die Probe bereits für 30 μM zum Teil nur in einem oder zwei von vier identischen Tropfen kristallisierte (Abb. A.5 a, b). Die Versuchsreihen mit heterogenen Gemischen wurden wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben angesetzt, nach etwa zehn Tagen dokumentiert und im Vergleich zum konzentrationsabhängigen Kristallisationsverhalten der GA-Variante

⁷Die Untersuchung der Varianten in Puffer I lieferte keine ausreichend reproduzierbaren Kristallisationsergebnisse, um zuverlässige Schlüsse ziehen zu können.

	G		GA		G		GA
	Puffer I	Puffer II	Puffer II		Puffer I	Puffer II	Puffer II
Strangverkürzungen		kristallisierend	inhibierend (10%)	Insertionen im M-Strang		kristallisierend	kristallisierend
		kristallisierend	inhibierend (10%)			kristallisierend	inhibierend (10%)
		inhibierend (10%) Puffer II (50%)	inhibierend (1%)			kristallisierend (50%), 2. Spezies toleriert (50%)	toleriert (50%)
		inhibierend (10%) Puffer II (50%)	inhibierend (10%)			kristallisierend, 2. Spezies (50%) toleriert (90%)	kristallisierend (50%), 2. Spezies
Basenfehlpaarungen		kristallisierend	kristallisierend	Insertionen im L-Strang		inhibierend (10%) toleriert (90%)	toleriert (50%)
		kristallisierend	kristallisierend			toleriert (50%)	toleriert (50%)
		kristallisierend	kristallisierend			toleriert (50%) kristallisierend	toleriert (50%)
		toleriert (50%)	inhibierend (10%)			inhibierend (10%) toleriert (50%)	inhibierend (50%)
Basenpaarinsertionen		kristallisierend		Delet. im M-Strang		(50%) toleriert (90%)	toleriert (50%)
		kristallisierend toleriert (90%)				kristallisierend (50%) 2. Spezies	kristallisierend (50%), 2. Spezies
		toleriert (50%)		Deletionen im L-Strang		inhibierend (10%)	inhibierend (10%)
Basenpaardeletionen		toleriert (50%)				toleriert (50%)	toleriert (50%)
		toleriert (50%)				kristallisierend	kristallisierend
		kristallisierend				inhibierend (10%)	inhibierend (50%)

Abbildung 4.20 – Vergleich der Ergebnisse aus Versuchsreihen mit heterogenen Gemischen in Puffer I und II. Dargestellt ist eine tabellarische Klassifizierung der 28 getesteten Varianten basierend auf den Ergebnissen der Kristallisationsansätze. Die G-Variante wurde in Puffer I und II untersucht. Von der GA-Variante wurden nur 22 Varianten hergestellt, die ausschließlich in Puffer II untersucht wurden. Schematische Darstellungen zeigen Modifikationen der G-Variante. Die jeweiligen GA-Varianten unterschieden sich einzig durch die Sequenz des S-Strangs. Prozentwerte geben den maximalen Anteil an modifizierten Strängen an, für die Kristallwachstum innerhalb von zehn Tagen beobachtet wurde.

klassifiziert. Originale und modifizierte GA-Varianten wurden durch Verwendung eines anderen S-Strangs erzeugt, L- und M-Stränge waren identisch zur G-Variante. Im Folgenden werden kurz die Ergebnisse für Puffer II aus den Versuchsreihen der G- und der GA-Variante verglichen. Ein Überblick über die Ergebnisse ist in Abbildung 4.20 aufgelistet (siehe auch Abb. A.5).

In heterogenen Gemischen mit zunehmendem Anteil an modifizierten Dreieckssträngen verhielt sich ein Teil der getesteten Modifikationen für die GA-Varianten ähnlich wie die entsprechenden Versuchsreihen mit G-Varianten in Puffer II. Modifikationen, die nachweislich kaum in DNA-Dreiecke integriert wurden, wurden auch in Versuchsreihen mit GA-Varianten toleriert und es bildeten sich entsprechend dem konzentrationsabhängigen Kristallisationsverhalten Kristalle bis zu einem Anteil von 50 % an verbleibenden originalen Dreieckssträngen. Auch pufferspezifische Unterschiede, die zwischen Puffer I und II für die G-Variante beobachtet wurden, schlugen sich überwiegend gleichermaßen im Kristallisationsverhalten der GA-Variante nieder. Beispielsweise wurden Einzelstrangausstülpungen im Kernbereich des L-Strangs ebenfalls toleriert. Auch in Gemischen mit Dreiecken, die defekte Sticky Ends aufwiesen, bildeten sich noch bei 50 % Anteil modifizierter L-Stränge Kristalle, deren Morphologie das gehemmte Kristallwachstum in den Tropfen widerspiegelte (Typische Kristallbilder der Tropfen sind in Kapitel A.2 aufgeführt).

In manchen Versuchsreihen wurde die Kristallisation der GA-Variante durch die Präsenz der modifizierten Stränge deutlich stärker gestört als die Kristallisation der G-Variante bei denselben Bedingungen. Beispielsweise erzeugten einige Modifikationen, wie Dreiecke mit verkürzten M-Strängen oder mit Einzelstrangausstülpungen im M-Strang, *kristallisierende* G-Varianten, während die selben Modifikationen in Versuchsreihen mit GA-Varianten *inhibierend* wirkten. Modifizierte L-Stränge, die jeweils zwei Basenfehlpaarungen im Dreiecksmotiv erzeugen würden, wurden in Versuchsreihen der G-Variante *toleriert*, wirkten aber in den Versuchsreihen mit GA-Varianten *inhibierend* auf die Kristallisation. Verkürzte L-Stränge hemmten zwar auch die Kristallisation der G-Variante bei einem Anteil von 50 %, in Gemischen mit der GA-Variante wurden die heterogenen Gemische allerdings bereits bei einem Anteil von 10 % an modifizierten Strängen, also bei deutlichem Überschuss originaler DNA-Dreiecke im Gemisch, inhibiert.

Diese Daten veranschaulichen zum einen, dass die Kristallisation des Dreiecksmotivs mit stärkeren Sticky-End-Interaktionen in Gegenwart fehlerhaft assemblierter Dreiecke, die nur suboptimal mit dem Kristallgitter interagieren können, ähnlich robust wie die Kristallisation der G-Variante abläuft, sofern günstige Rahmenbedingungen des Puffersystems und der Temperatur gegeben sind. Die zum Teil beobachtete, geringere Reproduzierbarkeit des Kristallwachstums in Tropfen mit heterogenen Gemischen wurde ebenso in den Kontrollreihen zur Konzentrationsabhängigkeit beobachtet und spiegelt vor allem das Kristallisationsverhalten der GA-Dreiecke selbst wider (vgl. Abschnitt 3.5, Abb. 3.7, Abb. A.2 und Abb. A.5).

Zum anderen zeigen insbesondere die diskutierten Unterschiede der Versuchsreihen mit heterogenen Gemischen der G- und GA-Varianten, dass Modifikationen, die pseudodefekte DNA-Dreiecke ausbilden und entsprechend auch mit dem Kristallgitter interagieren können, drastischere Effekte auf die Kristallisation der GA-Varianten haben. Während eine Reihe modifizierter G-Dreiecke auch alleine kristallisieren konnte, wirkten diese Varianten als GA-Dreiecke inhibierend. Dieser Zusammenhang deutet an, dass die schwächere Interaktion zwischen G-Dreiecken besonders bei modifizierten Varianten wichtig ist, um den Kristallisationsprozess aufrecht zu erhalten. Die diskutierten *kristallisierenden* Modifikationen erzeugen zum Teil deutliche Asymmetrien in dem ursprünglich fast dreifach rotationssymmetrischen

Dreiecken. Möglicherweise ist während der Nukleation und des Kristallwachstums dieser *kristallisierenden* Modifikationen deutlich mehr Umorganisation des wachsenden Kristallgitters notwendig, als dies im Vergleich zum originalen Dreieck der Fall wäre. Diese Umorganisationen können mit Dreiecken, die schwächere Interaktionen zu den jeweils sechs nächsten Nachbarn ausbilden, leichter bewerkstelligt werden. Auch das Verdrängen suboptimal interagierender, pseudodefekter Dreiecke durch originale Dreiecksspezies ist in Systemen mit schwächeren Sticky-End-Interaktionen erleichtert.

4.6 Zusammenfassung von Kapitel 4

Die in diesem Kapitel untersuchte, gezielt erzeugte Probenheterogenität umfasste ein breites Spektrum denkbarer Gemische aus gewollten und potentiell störenden Spezies, die sich in Reaktionsmischungen für Selbstassemblierungsreaktionen ausbilden können. Die Kristallisation des DNA-Dreiecksmotivs war in den getesteten heterogenen Gemischen insgesamt wenig anfällig gegenüber der Anwesenheit verschiedener Modifikationen. Im Überschuss korrekter DNA-Dreiecke konnten die modifizierten Stränge die Kristallisation des Modellsystems nicht beeinträchtigen. Am drastischsten wirkten sich Modifikationen aus, die die effektive Konzentration originaler Dreiecksspezies verringerten. Dies legt die Gewichtung in der Herstellung komplexerer DNA-Objekte auf die Produktion ausreichender Mengen korrekt gefalteter Spezies.

Einige Modifikationen des Dreiecksmotivs wurden überraschend problemlos in das Kristallgitter integriert und kristallisierten auch alleine. Diese Ergebnisse zeigen bestimmte Freiheitsgrade im Design der zu kristallisierenden Objekte auf, die unter der Bedingung der erhaltenen Kompatibilität mit dem Kristallgitter realisiert werden können. Die Versuche zu einer Reihe *tolerierter* Strangmodifikationen unterstrichen erneut, dass massive Hintergründe an missgefalteten und pseudodefekten DNA-Dreiecken die Kristallisation kaum beeinträchtigen, sofern ausreichend Material originaler Objekte in den Gemischen vorhanden war. Während des Kristallwachstums wurden suboptimal interagierende Dreiecksspezies zum Großteil durch originale DNA-Dreiecke aus den wachsenden Kristallgittern verdrängt. Die Anreicherung korrekt interagierender Spezies in Gegenwart von Verunreinigungen ist eine typische Begleiterscheinung der Ausbildung geordneter Kristallgitter, die beispielsweise im Kontext der organischen Chemie zur Aufreinigung synthetisierter Produkte mittels sog. Umkristallisation Anwendung findet [116].

Die beobachtete Toleranz der Kristallisation des DNA-Dreiecks gegenüber geometrisch veränderten Dreiecksvarianten lässt vermuten, dass auch für die Kristallisation komplexerer DNA-Objekte eine intrinsische Flexibilität und auch eine gewisse Rotationssymmetrie von Vorteil wäre, weil durch diese Designelemente Abweichungen von der idealen Form kompensiert werden können. Varianten mit zu flexiblen Regionen konnten allerdings nicht alleine kristallisieren. Weitere Versuche mit steiferen DNA-Dreiecksmotiven als Modellsystem wären mögliche nächste Schritte, um den Einfluss der Flexibilität des Kristallgitters weiter zu testen. Die Versuchsreihen veranschaulichten aber auch, dass die Kristallisation bereits bei Varianten mit stärkeren Sticky-End-Interaktionen anfälliger für gehemmtes Kristallwachstum in der Gegenwart modifizierter DNA-Dreiecke war. Dies deutet an, dass schwächere Partikelinteraktionen günstiger sind, um ausheilendes Kristallwachstum durch Umorganisation kondensierender Nukleationskeime zu ermöglichen. Aus dem Vergleich der G- und GA-Variante lässt sich außerdem schließen, dass die Verdrängung pseudodefekter Dreiecksspezies für schwächere Interaktionsstärken robuster funktioniert.

Kapitel 5

Herstellung dichter DNA-Origami-Lösungen

Dieses Kapitel beschreibt die Polyethylenglykol(PEG)-Fällung und die Ultrazentrifugation (UZ) als skalierbare Methoden zur Herstellung dichter DNA-Origami-Probenlösungen.

Die Modellstudien zum DNA-Dreieck legten dar, dass selbst für robust kristallisierende Systeme wie das DNA-Dreieck eine ausreichende Menge korrekter Partikel ausschlaggebend für den Erfolg der Kristallisationsreaktion ist. Für die DNA-Dreiecke, die ein Molekulargewicht von 38 kDa haben, lag die kritische Probenkonzentration in der durchgeführten Studie im zweistelligen mikromolaren Bereich. DNA-Origami-Objekte sind mit einem Molekulargewicht von 4,7–5 MDa deutlich größer als das untersuchte Modellsystem und nehmen in ihrer dichtesten Packung in etwa das 45-fache Volumen der Einheitszelle eines DNA-Dreieckskristalls ein (Abb. 5.1). Ein ähnliches Verhältnis zwischen Partikelvolumen und mittlerem Partikelabstand wäre hier für Konzentrationen von etwa 1–1,5 μM gegeben. Möglicherweise werden aber, beispielsweise auf Grund einer höheren Anisotropie der DNA-Origami-Objekte im Vergleich zum DNA-Dreieck, höhere Konzentrationen benötigt, um kritische Konzentrationen für die Kristallisation zu erreichen. Eine obere Konzentrationsabschätzung für den kritischen Konzentrationsbereich einer übersättigten DNA-Origami-Probe könnte die Lösungsgrenze der Objekte sein, die in dieser Arbeit empirisch bei 5–6 μM lag (siehe Abschnitt 5.1.3, vgl. Abb. 5.1). Selbstassemblierungsreaktionen für DNA-Origami-Objekte laufen allerdings typischerweise bei deutlich geringeren Konzentrationen im Bereich von 20–50 nM ab [2, 117]. Für die Kristallisation ist es daher notwendig, die Bedingungen für niedrige Herstellungskonzentrationen von den Konzentrationsanforderungen der Zielanwendung zu entkoppeln. Die Methoden der PEG-Fällung und der Ultrazentrifugation sind zwei Beispielanwendungen, die dies über die Aufkonzentration von DNA-Origami-Lösungen erreichen.

Beide Methoden sind etablierte biochemische Anwendungen zur Aufbereitung von Biomakromolekülen [118–121] und Viruspartikeln [122, 123]. Sie basieren auf der Anreicherung größerer Partikel am Boden des Reaktionsgefäßes und wurden in einigen Fällen für die Präparation von DNA-Origami-Objekten verwendet [124, 125]. Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten in der Arbeitsgruppe für biomolekulare Nanotechnologie [126], wurden diese Methoden abgewandelt und für die standardmäßige Verwendung mit DNA-Origami-Proben adaptiert, charakterisiert und optimiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben und wurden in Teilen publiziert [127, 128].

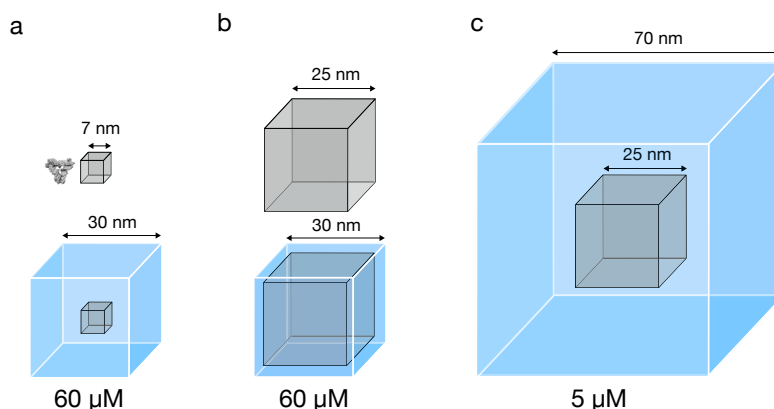


Abbildung 5.1 – Schematische Darstellung von mittleren Partikelabständen bei verschiedenen Konzentrationen. (a,b) Bei einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ liegt der mittlere Partikelabstand in etwa bei 30 nm (hellblau). Das Volumen des DNA-Dreiecks (a) und eines kompakten würfelförmigen DNA-Origamis (b) lässt sich näherungsweise durch Würfel der Kantenlänge 7 nm (a) bzw. 25 nm (b) beschreiben. Die überlagerte Darstellung der Würfel und des Partikelabstands illustriert, wie die unterschiedlichen Partikelgrößen im Verhältnis zum mittleren Partikelabstand stehen. (c) Darstellung des mittleren Partikelabstands für die empirisch ermittelte maximale Probenkonzentration von $5 \mu\text{M}$ (hellblau) im Verhältnis zur Kantenlänge eines kompakten, würfelförmigen DNA-Origami-Objekts.

5.1 Aufreinigung und Aufkonzentration durch PEG-Fällung

Die PEG-Fällung basiert auf dem Effekt der Zusammendrängung von Objekten mit hohem Molekulargewicht in PEG-haltigen Pufferlösungen [129]. Entropisch begünstigte Volumenausschlusseffekte zwischen den PEG-Polymeren und makromolekularen Objekten erzeugen eine effektive Anziehungskraft zwischen den Makromolekülen, die zu Mikroinseln zusammengedrängt werden und durch Zentrifugation pelletiert werden können [130,131]. Bei der PEG-Fällung von DNA- -Faltungsreaktionen erlaubt dieser Effekt die Abtrennung überschüssiger, nicht integrierter Klammerstränge, die auf Grund ihres deutlich niedrigeren Molekulargewichts in Lösung bleiben und nicht wie die DNA-Origami-Objekte pelletieren (Abb. 5.2 a-e). Die PEG-Fällung ermöglicht daher in einem Schritt die Aufreinigung und die Aufkonzentration der Probe und erlaubt außerdem den Austausch des Faltungspuffers gegen einen speziellen Anwendungspuffer (Abb. 5.2).

5.1.1 Optimierung der PEG-Aufreinigung

In der Literatur finden sich Beispiele für die PEG-Fällung von doppelsträngiger DNA [120], Proteinen [121], Viruspartikeln [122] und auch von länglichen DNA-Origami-Objekten mit phagenähnlicher Form [124]. In letzterem Protokoll wurde die PEG-Fällung als Methode zur Volumenreduktion stark verdünnter DNA-Origami-haltiger Elutionsproben nach der Ionenaustauschchromatographie verwendet. Zur Abtrennung überschüssiger, nicht integrierter Klammeroligonukleotide aus der Reaktionsmischung schien hier allerdings die Ionenaustauschchromatographie die bevorzugte Methode zu sein [124]. Basierend auf dieser Vorarbeit wurde die Methode der PEG-Fällung zusammen mit Thomas G. Martin¹ hinsichtlich der Länge des verwendeten PEG-Polymers, der Zusammensetzung des PEG-haltigen Fällungs-

¹2010-2014 Doktorand in der AG Dietz, TU München

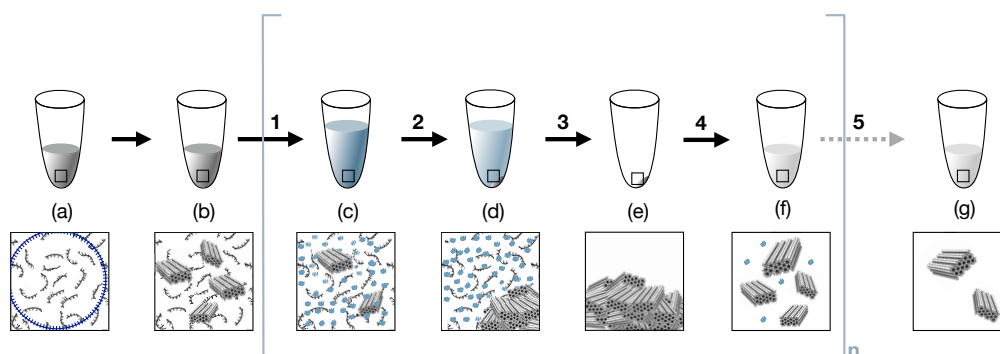


Abbildung 5.2 – Schritt-für-Schritt-Darstellung der PEG-Aufreinigung. Als Beispiel für ein typisches DNA-Origami-Objekt ist ein 42-Helixbündel gezeigt (b), das aus einer stöchiometrischen Mischung von einem langen zirkulären Einzelstrang-Templat (a, blauer Kreis) und mehreren hundert kurzen Oligonukleotiden als Klammeroligonukleotiden (a,b, schwarz gestrichelte Linien) assembliert. **(1)** Der Fällungspuffer wird mit der aufzureinigenden Probe (b) im Verhältnis 1:1 (vol:vol) gründlich vermisch, bis Assemblierungsprodukte und PEG-8000-Moleküle (hellblau) homogen verteilt sind (c). **(2)** Zusammengedrückte DNA-Objekte werden für 25 min bei 16.000 g abzentrifugiert (d). **(3)** Der Überstand wird abgenommen (e). **(4)** Das Pellet (e) wird im Zielpuffer gelöst und die aufgereinigte Probe (f) kann zur weiteren Aufreinigung, zum Pufferaustausch oder zur Konzentrationserhöhung einen neuen Zyklus der PEG-Fällung durchlaufen. **(5)** Um eine vollständig PEG-freie Probe (g) zu erhalten, können restliche PEG-Moleküle mittels Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration aus der Lösung entfernt werden. Je nach Art der Folgeanwendung kann die Probe als Pellet (e), im Zielpuffer gelöst (f) oder vollständig PEG-frei (g) weiter verwendet werden. Das vollständige Lösen des Pellets erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur oder für 15 min bei 35 °C. Diese Abbildung wurde aus [127] übernommen. © (2014) Die Autoren. Erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung-Nicht kommerziell 3.0 Deutschland.

puffers, der Dauer und der Temperatur während der Zentrifugation sowie der Inkubationszeiten vor und nach dem Fällungsschritt weiterentwickelt [127] (siehe auch [126]). Diese Optimierungsversuche ergaben beispielsweise, dass die Aufreinigung der DNA-Origami-Objekte von überschüssigen, nicht integrierten Klammeroligonukleotiden bei gleicher Ausbeute deutlich effektiver war, wenn der Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur anstatt der bisher empfohlenen 4 °C [124] durchgeführt wurde (Abb. S3 in [127] und [126]).

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Fällung und Rückgewinnung der DNA-Origami-Objekte höhere Ausbeuten und weniger Aggregate lieferte, wenn die Mischung aus Fällungspuffer und Faltungsreaktion sowohl Magnesium- als auch Natriumionen anstatt ausschließlich Natriumionen [124] enthielt (Abb. S4 in [127]). Ein Screening der Fällungspufferkomponenten ergab, dass das Verhältnis von PEG zu Kationen ausschlaggebend für die Effektivität des Fällungsschrittes war, wobei geringere PEG-Konzentrationen durch eine höhere Kationenkonzentration und umgekehrt kompensiert werden konnten. Zu hohe Anteile an PEG oder Kationen verminderten die Aufreinigungseffizienz der Fällungsmethode (Abb. S1 und S5 in [127] und [126]).

Versuche mit verschiedenen langen PEG-Molekülen zeigten außerdem, dass die Polymere PEG-6000, PEG-8000 und PEG-10 000 bei gleichem Gewichtsanteil pro Volumen (% w/v) am besten zur Fällung der DNA-Objekte geeignet waren. Kürzere Polymere wie PEG-4000 bewirkten geringere Fällungsausbeuten, während längere Polymere wie PEG-20 000 eine stärkere Kopräzipitation von überschüssigen Klammeroligonukleotiden verursachten (Abb. S2 in [127]). Versuche zur Inkubation des gelösten Pellets nach der PEG-Fällung ergaben, dass die

gelöste Probe equilibrieren sollte, bevor sie in Folgeanwendungen verwendet wird. Die Inkubationszeit wurde in weiterführenden Experimenten von Klaus Wagenbauer² optimiert [128].

Insgesamt ergaben sich aus den Optimierungsversuchen folgende Richtlinien zur Durchführung der PEG-Fällung mit DNA-Origami-Proben:

- Die Mischung aus Probe und Fällungspuffer sollte unabhängig von der Probenkonzentration 250 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid und 7,5 % (w/v) PEG-8000 enthalten und gut vermischt sein.
- Die Mischung aus Probe und Fällungspuffer sollte für die optimale Aufreinigung für 25 Minuten mit einem Zentrifugalfeld von 16 000–20 000 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert werden.
- Volumina > 10 ml sollten für 40 min zentrifugiert werden, um die längere Sedimentationsstrecke in größeren Gefäßen zu berücksichtigen.
- Anforderungen für geringere Zentrifugalfelder sollten durch längere Zentrifugationszeiten kompensiert werden.
- Das Lösen des Pellets für Folgeanwendungen erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur oder für 15 Minuten bei 35–40 °C. Wiederholte PEG-Fällungen können ohne Wartezeit direkt hintereinander ausgeführt werden.

5.1.2 Charakterisierung der PEG-Fällungsmethode

Durch die Optimierung der Methode konnte die PEG-Fällung zu einer robusten, einfach zu handhabenden und skalierbaren Aufreinigungs- und Aufkonzentrationsmethode für DNA-Origami-Lösungen weiterentwickelt werden. Um diese nützliche Aufreinigungsmethode dem Feld der DNA-Nanotechnologie für den täglichen Laborgebrauch zugänglich zu machen, wurde das optimierte Protokoll hinsichtlich seiner Anwendbarkeit, seiner Aufreinigungseffizienz und möglicher PEG-Rückstände in den aufgereinigten Proben untersucht.

Anwendbarkeit für kompakte und flexible Strukturen

Die Optimierung der PEG-Fällung wurde mit zwei kompakten, mehrlagigen DNA-Origami-Objekten³ durchgeführt (vgl. Abb. 5.3 a). Um die Anwendbarkeit der Methode für unterschiedliche Objektformen zu demonstrieren, wurde eine Strukturbibliothek aus 18 DNA-Origami-Objekten⁴ mit unterschiedlichen Seitenverhältnissen und mechanischen Eigenschaften hergestellt und mit der PEG-Fällung aufgereinigt (Abb. 5.3).

Die Proben wurden vor und nach der PEG-Fällung mittels Gelelektrophorese und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht (Abb. 5.3). Durch die PEG-Fällung der verschiedenen DNA-Origami-Objekte konnten überschüssige, nicht integrierte Klammeroligonukleotide in allen Proben abgetrennt werden (Abb. 5.3 b). Die Beschaffenheit der Einzelpartikel sowie die ähnliche Laufweite der Monomerbanden vor und nach der PEG-Fällung

²seit 2013 Doktorand in der AG Dietz, TU München

³42-Helixbündel und asymmetrisches 82-Helixbündel (*pointer*)

⁴Die Designs der einzelnen Objekte wurden von Hendrik Dietz (*pointer*, *A*, *S*, *robot*, *robotb*, *bow*, 18hb_b, 42hb_b) oder von Doktoranden der AG-Dietz entworfen oder überarbeitet (Thomas Martin: RR [23], 42hb(v13), *plate1*, *plate2*; Christian Wachauf: 4hb, 10hb; Fabian Kilchherr: 18hb; Jonas Funke: *hinge*; Matthias Schickinger: *gear*; Philip Ketterer: 100hb(v2)). [2, 3, 9, 31, 39, 132, 133]

zeigten, dass die Struktur der DNA-Origami-Objekte durch die PEG-Fällung nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 5.3 b, c). Aggregate, teilweise gefaltete Objekte und Oligomere, die allesamt geringere Laufweiten als die Monomerbanden aufwiesen, wurden in der PEG-Fällung ebenfalls präzipitiert und lagen in den aufgereinigten Proben in gleichem Ausmaß vor wie in den unaufgereinigten Proben. In einigen Proben konnte ein Teil der Aggregate in den Gelta-schen und der undefinierten Agglomerate in der Gelspur durch das Lösen des PEG-Pellets in Puffern mit geringerer Magnesiumkonzentration als in der Faltungsreaktion aufgelöst werden (vgl. *hinge, robot* in Abb. 5.3 b).

Die Objekte der Strukturbibliothek wiesen unterschiedliche Passivierungen der helikalen Enden auf. Diese dienten dem Zweck, unspezifische Partikelinteraktionen an den Duplexenden der DNA-Origami-Objekte zu verhindern und können sowohl durch überhängende einzelsträngige Schleifen des Templatstrangs als auch durch Polythymin-Überhänge der Klammeroligonukleotide realisiert werden. Nach der PEG-Fällung zeigten polythymin-passivierte Objekte ein identisches Laufverhalten wie vor der Fällung, während Objekte mit Templatstrangschleifen nach der PEG-Fällung etwas schneller durch die Gelmatrix migrierten. Die höhere Mobilität dieser aufgereinigten Objekte lässt sich durch die Abtrennung überschüssiger, nicht integrierter Klammeroligonukleotide erklären, die im Gel transient an die Templatstrangschleifen binden und die Laufgeschwindigkeit der Objekte verringern konnten. Ein Kontrollversuch zeigte, dass die Laufweite der aufgereinigten Proben nach Zugabe von Klammeroligonukleotiden erneut verlangsamt wurde (Abb. S6 in [127]).

Ausbeute und Reinheit nach der PEG-Fällung

Um die Effizienz der PEG-Fällung zu testen, wurden die Ausbeute und Reinheit einer Probe nach der Aufreinigung mittels der PEG-Fällung und mittels einer anderen etablierten Aufreinigungsmethode, der Ultrafiltration, verglichen. Ähnlich wie die PEG-Fällung basiert auch die Ultrafiltration auf der Abtrennung von Objekten mit niedrigem Molekulargewicht, wie den Klammeroligonukleotiden mit durchschnittlich 16 kDa, von Objekten mit hohem Molekulargewicht, wie den DNA-Origami-Objekten mit ca. 5 MDa, mittels Zentrifugation. Im Gegensatz zur PEG-Methode, bei der die Trennung der Objekte auf Verdrängungseffekten in Lösung basiert, wird die Trennung der Spezies mit hohem und deutlich niedrigerem Molekulargewicht bei der Ultrafiltration mit Hilfe einer porösen Membran aus regenerierter Zellulose erreicht, die größere Objekte zurückhält [134].

Die gelelektrophoretische Analyse der ultrafiltrierten Probe ergab, dass nach einem Filtrationszyklus ca. 53 % und nach fünf Filtrationszyklen noch 49 % der Ausgangsprobe rückgewonnen werden konnten. Der starke Probenverlust nach dem ersten Filtrationszyklus ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein großer Teil der Probe an der Membran irreversibel adsorbierte und von dort nicht wieder rückgewonnen werden konnte. Optimierungsversuche der Ultrafiltrationsmethode zeigten wiederum, dass dieser Probenverlust durch die Verwendung von Puffern mit geringerer Magnesiumkonzentration während der Aufreinigung reduziert werden kann [126]. Im Gegensatz zu der hier untersuchten Ultrafiltration konnten nach einem bzw. fünf Zyklen der PEG-Fällung deutlich höhere Anteile der Ausgangsprobe zurückgewonnen werden (93 % bzw. 84 %). Auch hinsichtlich der Probenreinheit zeigte die PEG-Fällung die besseren Ergebnisse: nach einem Filtrationszyklus waren noch doppelt so viele überschüssige Klammeroligonukleotide wie nach einem PEG-Fällungszyklus vorhanden. Nach fünf Zyklen waren in beiden Proben effektiv alle (99,6 %) der überschüssigen Klammeroligonukleotide entfernt. Versuche, in denen zehn sukzessive PEG-Fällungszyklen durchgeführt und analysiert wurden, ergaben eine etwas höhere durchschnittliche Probenausbeute

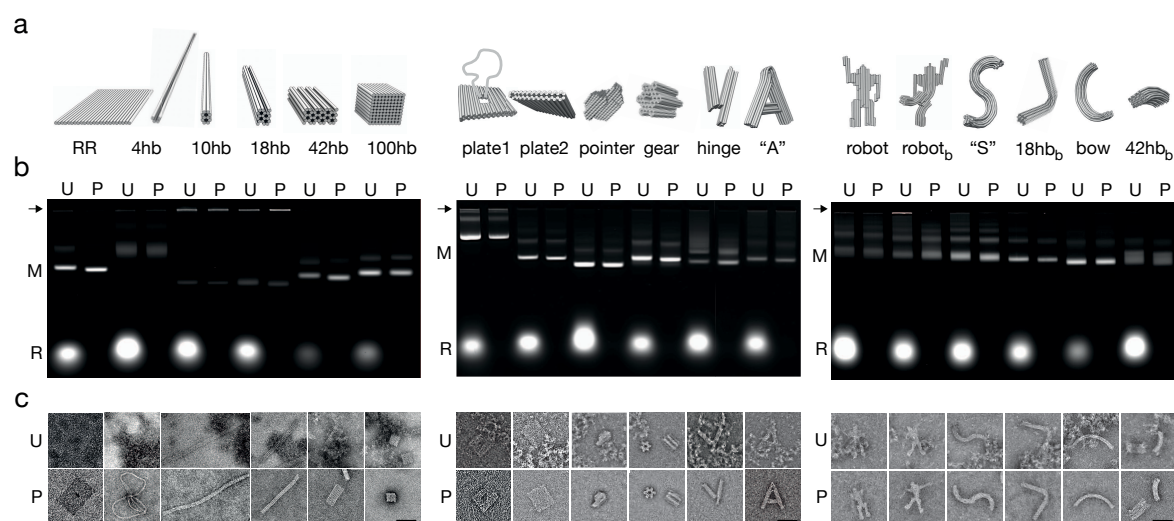


Abbildung 5.3 – PEG-Aufreinigung für eine Strukturbibliothek an DNA-Origami-Objekten. (a) Illustration (RR bis 100hb) und CanDo-berechnete [2, 3] Modelle (plate1 bis 42hb) von einem Satz an DNA-Origami-Objekten. Die Strukturbibliothek umfasst eine Variante des einzellagigen Rothemund-Rechtecks [23], fünf mehrlagige Objekte (4-, 10-, 18-, und 42-Helixbündel in Honigwabenpackung; 100-Helixbündel in rechtwinkliger Packung) [117], ein plattenähnliches Objekt mit Öffnung und doppelsträngigem Loop (*plate1*) [133], ein plattenähnliches Objekt (*plate2*) [133], ein asymmetrisches 82-Helixbündel in rechtwinkliger Packung (*pointer*) [39], ein zahnradähnliches Objekt (*gear*) [132], ein Objekt mit flexibel klappbaren Seitenarmen (*hinge*) [31, 132], ein Buchstabe-A-ähnliches Objekt (*A*) [3], eine gerade und gebogene Version eines roboterähnlichen Objekts (*robot*, *robot_b*) [2, 3], ein Buchstabe-S-ähnliches Objekt (*S*) [3], ein bogenähnliches Objekt (*bow*) [3] und gebogene Versionen des 18- und 42-Helixbündels (18hb_b, 42hb_b) [9, 132]. (b) Abbildungen von Agarosegelen in denen unaufgeregnete Selbstassemblierungsreaktionsmischungen (U) und PEG-aufgeregnete Proben (P) mit Objekten aus (a) analysiert wurden. Markierungen: Pfeile: Geltaschen zur Probenauftragung; M: Monomerbande; R: Rückstände nicht integrierter Klammeroligonukleotide. (c) Beispielbildausschnitte aus elektronenmikroskopischen Abbildungen, die Einzelpartikel der unaufgeregneten (U) und aufgeregneten (P) Proben aus (a) zeigen. Maßstäbe: 50 nm. Diese Abbildung wurde aus [127] übernommen; © (2014) Die Autoren. Erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung-Nicht kommerziell 3.0 Deutschland.

von 97,5 % pro PEG-Fällungsschritt und zeigten, dass überschüssige Klammeroligonukleotide bereits nach drei PEG-Fällungszyklen vollständig entfernt waren [126, 127].

Eine weitere typische Methode zur Aufreinigung von DNA-Nanostrukturen ist die physikalische Extraktion gelelektrophoretisch aufgetrennter Spezies aus ausgeschnittenen Agarosegelstücken (Agarosegelelextraktion, AGE) [135, 136]. Im Gegensatz zur PEG-Fällung und der Ultrafiltration erlaubt diese Methode die selektive Aufreinigung einer gewünschten Spezies mit definierter Laufweite im Gel und ermöglicht sowohl die Abtrennung von Reaktionsprodukten mit höherem als auch mit niedrigerem Molekulargewicht im Vergleich zur Zielspezies. Allerdings bringt diese Methode zwei klare Nachteile mit sich: zum einen wird die Probe durch die Gelelektrophorese stark verdünnt (5.4 a, b) und zum anderen ist die Probenrückgewinnung aus der extrahierten Gelbande sehr niedrig [125, 136]. Eine Analyse der gelaufgereinigten Probe ergab nur eine Ausbeute von etwa 27 % der Ausgangsprobe (5.4 c). Die Kombination aus der Gelextraktion und einer anschließenden PEG-Fällung ist hingegen eine einfache Strategie zur Herstellung konzentrierter Proben, die nur eine gewünschte Zielspezies in reiner Form enthalten. Beispielhaft wurde dies für die gelaufgereinigte Probe des 42-Helixbündels gezeigt, die durch anschließende PEG-Fällung in etwa zehnfach konzentriert werden konnte

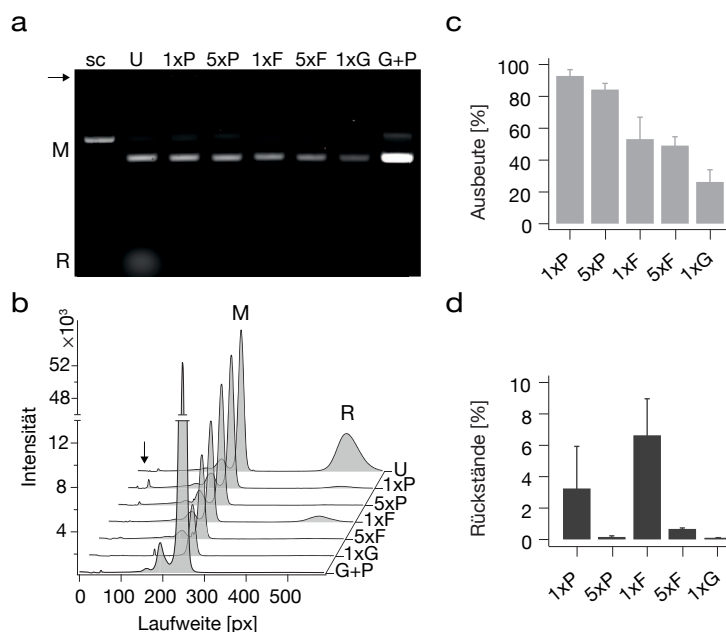


Abbildung 5.4 – Vergleich verschiedener Aufreinigungsmethoden anhand einer Probe des 42-Helixbündels. (a) Abbildung eines Agarosegels, das die unaufgereinigte Probe (U) und aufgereinigte Proben nach einem bzw. fünf Zyklen PEG-Fällung (1xP, 5xP) oder Ultrafiltration (1xF, 5xF), nach Gelextraktion (1xG) und nach Gelextraktion und anschließender PEG-Fällung (G+P) enthält. Versuchsdurchführung: Mit jeder Methode wurden jeweils 50 μ l einer 50 nM 42-Helixbündel-Lösung aufgereinigt. Auf Grund der Verdünnung durch die Gelextraktion wurden die Proben vor der vergleichenden Analyse auf ein Volumen von 150 μ l verdünnt. Mit Ausnahme der Probe (G+P) wurden die Experimente in Triplikaten durchgeführt. G+P enthält zehnfach aufkonzentriertes Material aus drei Gelextraktionen zu je 50 μ l. Weitere Gelmarkierungen: sc: Referenzprobe des einzelsträngigen Templatstrangs; Pfeil: Geltaschen zur Probenauftragung; M: Monomerbande; R: überschüssige Rückstände an nicht integrierten Klammeroligonukleotiden. (b) Querschnittsdarstellung der Gelspurprofile aus (a). (c) Ausbeute der gefalteten Objekte in den aufgereinigten Proben im Vergleich zur unaufgereinigten Probe (U). Die Quantifikation der Gelbanden erfolgte aus Triplikatversuchen durch Integration und Vergleich der Flächen unter den Maxima der Monomerbande (M) aus Gelprofilen wie in (b). (d) Rückstände an nicht integrierten Klammeroligonukleotiden im Vergleich zur unaufgereinigten Probe (U). Die Quantifikation erfolgte wie in (c) mit den Banden der Klammeroligonukleotide (R) aus Gelprofilen wie in (b). Fehlerbalken in (c) und (d) markieren die Standardabweichung aus den Triplikaten. Diese Abbildung wurde aus [127] adaptiert; © (2014) Die Autoren. Erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung-Nicht kommerziell 3.0 Deutschland.

((5.4 a, b). Die Dimerbande, die in der Probenspur der gelaufgereinigten und konzentrierten Probe (G+P) zu erkennen war, lässt sich durch reversible Interaktionen zwischen den 42-Helixbündeln erklären, die sich bei höheren Probenkonzentrationen während der Gelelektrophorese vermehrt ausbilden (5.4 a, b).

PEG-Rückstände

Da die PEG-Fällung auf der Zugabe von PEG-Polymeren als Fällungsreagenz basiert, ist davon auszugehen, dass die aufgereinigten Proben auch einen gewissen Anteil verbleibender PEG-Polymere enthalten. Um diesen Anteil nach der Fällung für eine 50 nM-Probe des 42-Helixbündels exemplarisch zu quantifizieren, wurde ein Puffer verwendet, in dem etwa

jedes zehnte PEG-Polymer mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert war. Die PEG-gefällte Probe wurde anschließend im Ausgangsvolumen in PEG-freiem Puffer gelöst und mittels Gelelektrophorese quantifiziert. Die Daten ergaben, dass 99,7 % der FITC-markierten PEG-Polymere (fPEG) im Überstand verblieben. Unter der Annahme, dass dieses Verhältnis näherungsweise auch den Gesamtverbleib aller PEG-Polymere beschreibt, lag in dieser Beispielprobe eine Restkonzentration von etwa $50 \mu\text{M}$ bzw. 0,4 % (w/v) PEG vor. Dies entspricht noch etwa tausend PEG-Polymeren pro DNA-Origami-Objekt (Abb. 5.5 c).

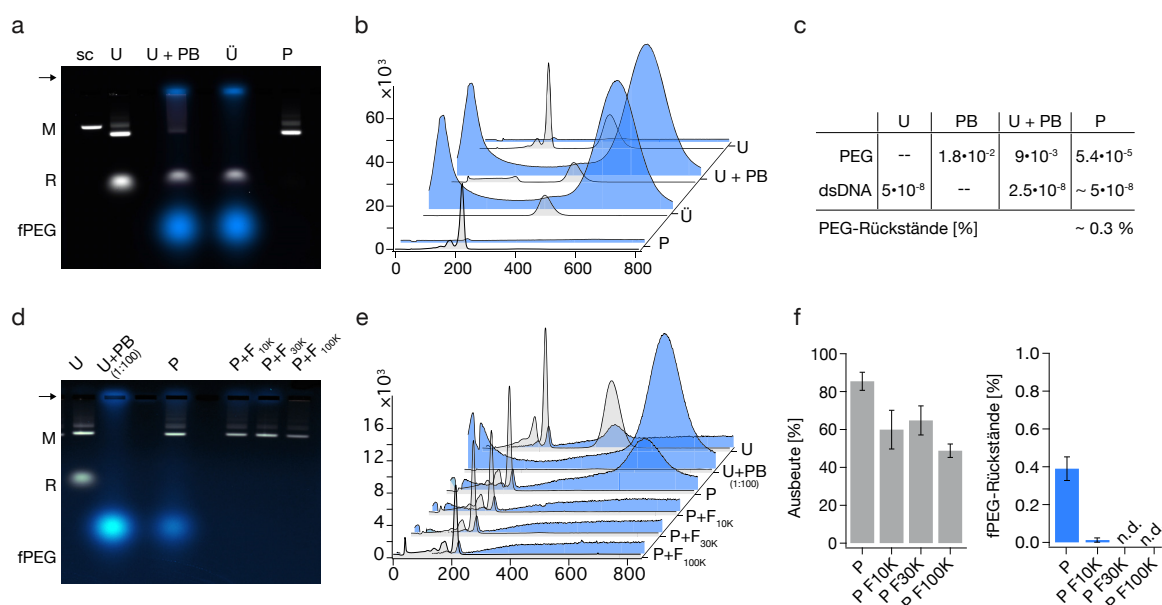


Abbildung 5.5 – Visualisierung restlicher PEG-Rückstände und der vollständigen PEG-Entfernung mittels mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem PEG (fPEG). (a-c) Abschätzung restlicher PEG-Rückstände mit Hilfe eines Fällungspuffers, in dem 10 % der PEG-Polymere mit FITC markiert sind. (a) Überlagerte Darstellung des separat detektierten Ethidiumbromidsignals (weiß) und des FITC-Signals (blau) des selben Agarosegels. Proben zur Analyse wurden aus der unaufgereinigten Probe vor (U) und nach (U+PB) Zugabe des Fällungspuffers (PB) entnommen und mit dem Überstand (Ü) und dem gelösten Pellet nach der Fällung (P) verglichen. Weitere Markierungen: Pfeil: Geltaschen; M: Monomerbande; R: Rückstände an nicht integrierten Klammeroligonukleotiden; fPEG: FITC-markiertes PEG. (b) Querschnittsdarstellung der Gelspurprofile aus (a) für den Ethidiumbromidkanal (grau) und den FITC-Kanal (blau). (c) Abgeschätzte Konzentrationen von gefalteten DNA-Objekten (dsDNA) und von PEG für alle Schritte der PEG-Fällung. (d-f) Nachweis der Entfernung restlicher PEG-Rückstände mit Hilfe eines Fällungspuffers, in dem 20 % der PEG-Polymere mit FITC markiert sind. (d) Überlagerte Darstellung des separat detektierten Ethidiumbromidsignals (weiß) und des FITC-Signals (blau) des selben Agarosegels. Proben zur Analyse wurden aus der unaufgereinigten Probe vor (U) und nach (U+PB) Zugabe des Fällungspuffers (PB) und aus der Probe mit gelöstem Pellet (P) entnommen und mit Proben verglichen, die nach der PEG-Fällung mit 10K-, 30K- und 100K-Filtern ultrafiltriert wurden (P+F_{10K}, P+F_{30K}, P+F_{100K}). Übrige Markierungen wie in (a). (e) Querschnittsdarstellung der Gelspurprofile aus (d) wie in (b). (f) Quantifizierung der Probenausbeute (grau) und der fPEG-Rückstände (blau) durch Integration der Flächen unter den Maxima der Monomerbande (M) und der fPEG-Bande (fPEG) in Gelen wie in (e). Fehlerbalken markieren die Standardabweichung aus Triplikatversuchen. n.d.: nicht detektierbar. Diese Abbildung wurde aus [127] adaptiert. © (2014) Die Autoren. Erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung-Nicht kommerziell 3.0 Deutschland.

Vollständig PEG-freie Proben können hergestellt werden, indem die PEG-gefällten Proben mit weiteren Ultrafiltrations- oder Ultrazentrifugationsschritten kombiniert werden. Die Ultrazentrifugation wird im folgenden Unterkapitel näher beschrieben und dort auch im Hin-

blick auf die Entfernung rückständiger PEG-Polymere vorgestellt (siehe Abschnitt 5.2). Um die Entfernung restlicher PEG-Polymere mittels Ultrafiltration zu testen, wurde ein Fällungspuffer hergestellt, in dem jedes fünfte PEG-Polymer im Puffer mit FITC markiert war. Dieser Fällungspuffer erlaubte eine sensitive Verfolgung der fPEG-Rückstände, stellte aber einen Puffer mit stärkeren Unterschieden zum originalen Fällungspuffer ohne FITC-markierte PEG-Polymere dar. Eine Beispielprobe des 42-Helixbündels konnte trotzdem mit diesem fPEG-Fällungspuffer ausgefällt werden, wenn auch mit etwas geringeren Ausbeuten von 85 % (Abb. 5.5 d-f). Die Probe wurde in fPEG-freiem Puffer gelöst und enthielt vergleichbare Mengen an rückständigem fPEG wie zuvor in den Experimenten mit niedrigerem fPEG-Anteil im Fällungspuffer bestimmt wurde (vgl. Abb. 5.5 c und f). Die Probe wurde anschließend unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten verschiedener Porengrößen gewaschen und im Hinblick auf die Probenausbeute und auf fPEG-Rückstände untersucht.

Die gelelektrophoretische Quantifizierung des in das Gel migrierten fPEGs zeigte, dass die fPEG-Rückstände aus dem gelösten Pellet nach drei Waschzyklen mit allen getesteten Ultrafiltrationseinsätzen vollständig entfernt werden konnten (Abb. 5.4 d-f). Dies kann als Abschätzung für alle PEG-Moleküle betrachtet werden, da nicht markierte PEG-Polymere das gleiche Molekulargewicht aufweisen. Filtermembranen mit kleineren Porengrößen zur Abtrennung von Molekülen kleiner 10 kDa bzw. 30 kDa zeigten eine höhere Rate der Probenrückgewinnung als Filtermembranen, mit denen auch größere Moleküle bis max. 100 kDa abgetrennt werden können (Abb. 5.5 f). Dies ist vermutlich durch stärkere Adhäsion der DNA-Origami-Objekte in den größeren Membranporen zu erklären, wie auch schon bei der Aufreinigung der Faltungsreaktionen mit Filtern beobachtet wurde (Abb. 5.4). Die kleineren Poren ermöglichen zwar eine bessere Probenrückgewinnung und eine effektive Abtrennung der PEG-8000 Polymere, wären aber auf Grund ihrer Porengröße nicht für die Abtrennung überschüssiger Klammeroligonukleotide mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 16 kDa geeignet. Die Kombination der PEG-Fällung mit anschließender Ultrafiltration in 10K- oder 30K-Membranen ist daher die ideale Strategie zur schnellen und einfachen Herstellung konzentrierter, PEG-freier Proben mit geringem Probenverlust.

Zusammenfassung der Charakterisierung

Insgesamt zeigt die Charakterisierung der PEG-Fällung, dass die Methode für verschiedenste Formen der DNA-Origami-Objekte, einschließlich Objekten mit gebogenen und flexiblen Strukturelementen, angewendet werden kann. Die PEG-Fällung lieferte bei einfacher Handhabung gleichermaßen hohe Probenrückgewinnung wie auch hohe Aufreinigungsraten im Vergleich zu den unaufgereinigten Proben. Auch Reaktionsmischungen mit geringeren Faltungsausbeuten oder Aggregaten konnten mit der PEG-Fällung aufgereinigt werden, allerdings waren Objekte mit hohem Molekulargewicht vor und nach der PEG-Fällung in gleichem Ausmaß vorhanden. Eine Möglichkeit zur Entfernung von Aggregaten und fehlgefalteten Objekten bietet die Gelextraktion, deren verdünnte Aufreinigungsprodukte mit Hilfe der PEG-Fällung wieder konzentriert werden können. PEG-Rückstände in den aufgereinigten Proben können vollständig entfernt werden, sodass die Methode auch zur Präparation von Proben für PEG-sensitive Anwendungen genutzt werden kann.

5.1.3 Herstellung hochkonzentrierter Proben

Die Herstellung hochkonzentrierter DNA-Origami-Lösungen für Kristallisationsansätze erfordert die Handhabung von vergleichsweise großen Mengen einer bestimmten Probe. Für einen

Kristallisationsansatz mit hundert Bedingungen, die je 1 μl einer hochkonzentrierten DNA-Origami-Lösung mit 5 μM enthalten, wird beispielsweise selbst bei 100 % Probenausbeute das Material eines Faltungsansatzes von 10 ml verbraucht – dies entspricht dem hundertfachen eines typischen Faltungsansatzes und bereits 10–15 % des kompletten Materials einer typischen Oligonukleotidsynthese⁵.

Mit Hilfe der PEG-Fällung können Volumina im Bereich von 5 bis 50 ml ohne großen Mehraufwand ebenso unkompliziert und effizient aufgereinigt werden, wie in Abschnitt 5.1.2 für Volumina von 50 μl gezeigt wurde. Die PEG-Fällung erfolgt hierfür in 15- oder 50 ml-Zentrifugenröhrchen für etwa 40 Minuten, um die längere Sedimentationsstrecke der Probe zu berücksichtigen. Im Gegensatz zu früheren Protokollen [124] kann die optimierte PEG-Fällung die Volumeneingrenzung, einen eventuell notwendigen Pufferaustausch und die Aufreinigung der Probe von nicht integrierten Klammeroligonukleotiden zugleich erreichen (Abb. 5.6). Dies wurde exemplarisch für drei Beispielstrukturen demonstriert, die im 20 ml-Maßstab hergestellt wurden.

- Eine Variante des Rothemund-Rechtecks [23] diene als Beispiel für eine flexible, einzellige Struktur.
- Ein 42-Helixbündel, das mit einem *Cyanin5*-Fluorophor pro Monomer markiert wurde, diene als Beispiel für eine kompakte, mehrlagige DNA-Origami-Struktur.
- Ein 24-Helixbündel mit 30 gleichen, einzelsträngigen Regionen pro Objekt, an die ein *Cyanin3*-markiertes Oligonukleotid binden konnte, diene der Visualisierung der Probenkonzentration. Nach Zugabe des *Cyanin3*-Oligonukleotids enthielt jede Struktur im Durchschnitt zehn Farbstoffmoleküle. Vermutlich auf Grund der einzelsträngigen Regionen neigte diese Struktur bei hohen Konzentrationen zur Aggregation.

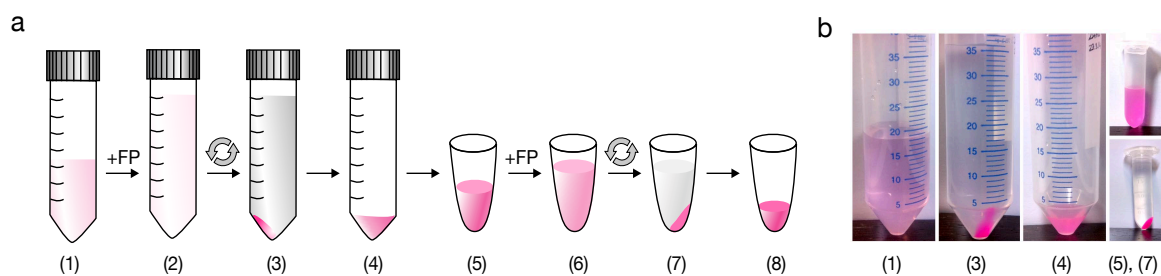


Abbildung 5.6 – PEG-Fällung von Faltungsansätzen im 5-25 ml-Maßstab. (a) Schematische Darstellung der PEG-Fällung in 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Das Volumen eines 20 ml-Faltungsansatzes (1) kann nach Zugabe des Fällungspuffers (FP) und Pelletieren der Probe (2,3) reduziert werden (4) und in konzentrierter Form in kleineren Reaktionsgefäßen weiter aufkonzentriert werden (5-8). Der Grad der Einfärbung der Lösung markiert die Probedichte der Lösung. **(b)** Abbildungen einiger Reaktionsschritte der PEG-Fällung des 24-Helixbündels wie in (a).

Die Reaktionsmischungen der 20 ml-Ansätze enthielten eine Templatstrangkonzentration von 50 nM und damit maximal 1 nmol Probe. Diese wurde im Falle des Rothemund-

⁵Die Abschätzung bezieht sich auf durchschnittliche Mengen für Oligonukleotide mit einer Länge von 35–50 Basen, die von der Firma Eurofins Genomics GmbH für einen Synthesemaßstab von 0,01 μmol CPG(controlled pore glass)-Material geliefert werden.

Rechtecks und des 24-Helixbündels nach der ersten PEG-Fällung zunächst 20-fach konzentriert und in ein kleineres Reaktionsgefäß überführt (Abb. 5.6). Auf Grund der mehrfachen Farbstoffmarkierung des 24-Helixbündels wurde die Konzentrationserhöhung der Probe bereits durch die intensive Einfärbung des Pellets und der 20-fach konzentrierten Lösung ersichtlich (Abb. 5.6 b).

Um die maximal mögliche Konzentrationserhöhung zu veranschaulichen, die durch die PEG-Fällung erreicht werden kann, wurden die Pellets aller drei Proben nach einer zweiten PEG-Fällung getrocknet. Für jedes der drei Objekte fielen hieraus mehrere Milligramm festes, DNA-Origami-haltiges Material an (Abb. 5.7 a-c). Der Gehalt an doppelsträngiger DNA wurde im wieder gelösten Zustand photometrisch quantifiziert. Aus den Daten ließ sich abschätzen, dass der DNA-Origami-Anteil des festen Materials etwa 50 % des gewogenen Trockengewichts ausmachte (Tabelle 5.1). Die übrige Masse wurde restlichen Anteilen von PEG-8000-Polymeren, Salzen und Wasser zugeschrieben⁶. Da beim Hin- und Rücktransfer der Probe zwischen Reaktionsgefäß und Uhrenglas ein Teil der Probe verloren ging, weil das getrocknete Material am Uhrenglas, am Spatel und an den Wänden der Reaktionsgefäße anhaftete, ist die Quantifizierung nur als grobe Abschätzung der Massenanteile zu betrachten. Die Probenausbeute des 24-Helixbündels zeigte jedoch, dass die Herstellung konzentrierter DNA-Origami-Lösungen mit Hilfe der PEG-Fällung mit hohen Probenausbeuten von 93 % möglich ist. Die deutlich geringeren Ausbeuten bei der Aufkonzentration des Rothemund-Rechtecks und des 42-Helixbündels waren in beiden Fällen nicht auf die Ausbeuten der PEG-Fällungsschritte, sondern auf andere, vermeidbare Präparationsschritte zurückzuführen (siehe Beschriftung zu Tabelle 5.1).

Mögliche Auswirkungen des Trocknungsprozesses auf die Struktur der DNA-Origami-Objekte wurden in den wieder gelösten Proben mittels TEM⁷ und Gelelektrophorese untersucht (Abb. 5.7 c-d, Abb. 5.8). Die TEM-Aufnahmen der getrockneten und wieder gelösten Proben zeigten strukturell intakte Partikel, die sich weder in den Übersichtsaufnahmen noch in Bildmittelungen aus Einzelpartikel-aufnahmen von Proben unterschieden, die mit PEG gefällt und direkt wieder gelöst wurden (Abb. 5.7 c-d). Die gelelektrophoretische Analyse der Proben bestätigte ebenfalls die strukturelle Intaktheit der Proben, die nach dem Trocknen und wieder Lösen ebenso definierte Banden mit gleicher Laufweite wie vor dem Trocknungsprozess aufwiesen (Abb. 5.8). Für das 24-Helixbündel wurden in den PEG-gefällten Proben vermehrt Aggregate beobachtet, welche vermutlich durch salzabhängige Interaktion der zahlreichen einzelsträngigen Regionen dieses Objekts verursacht wurden (vgl. Abb. C.2.1). Die Bildung dieser Aggregate wurde durch den Trocknungsprozess im Vergleich zu einmal PEG-gefällten Proben allerdings nicht weiter verstärkt (Abb. 5.8 c).

Um eine maximale Lösungsgrenze für die DNA-Origami-Lösungen abzuschätzen, wurden die getrockneten Pellets im minimal möglichen Volumen gelöst, das notwendig war, um nach mehreren Tagen Inkubation eine homogene Lösung der Objekte zu erhalten. Für alle drei Proben konnten so gesättigte oder Lösungen nahe der Lösungsgrenze mit einer Probenkonzentration von 5–6 μM hergestellt werden. Die intensive Färbung der 120-fach konzentrierten Probe des 24-Helixbündels veranschaulichte dies besonders im Vergleich zur nicht detektierbaren Einfärbung der Ausgangsprobe mit einer Konzentration von 50 nM (Abb. 5.7 d). Die Trübung der konzentrierten Lösung deutete an, dass bei dieser Probenkonzentration bereits größere Agglomerate von 24-Helixbündeln vorlagen. Im Hinblick auf den mittleren Partikelab-

⁶4 mg PEG-8000 entsprechen einer Stoffmenge von 0,5 μmol

⁷Die TEM-Aufnahmen und Bildanalysen des Rothemund-Rechtecks wurden von Florian Praetorius – seit 2012 Doktorand der AG Dietz – durchgeführt.

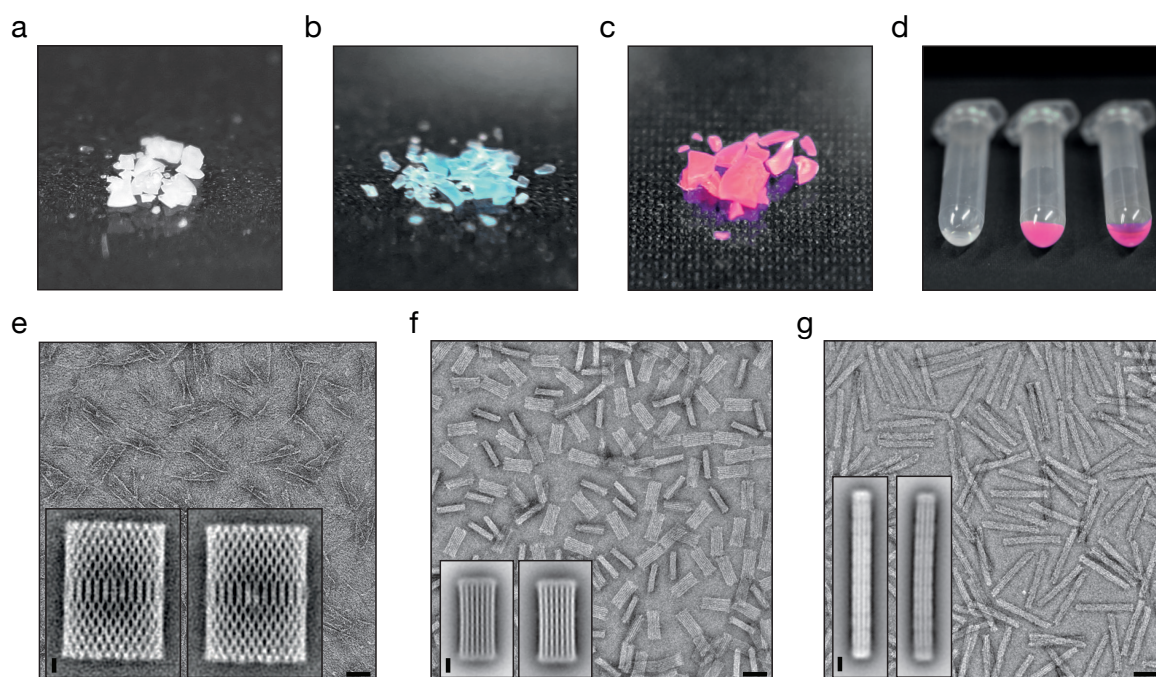


Abbildung 5.7 – Herstellung von getrocknetem Material und dichten Lösungen aus intakten DNA-Objekten. (a-c) Mehrere Milligramm festes Material aus (a) einer Variante des Rothemund-Rechtecks [23] ohne Farbstoffmarkierung, (b) einem 42-Helixbündel mit einem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO 655) pro Objekt und (c) einem 24-Helixbündel mit etwa zehn Cyanin-3-Farbstoffen pro Objekt. (d) Links: Unaufgereinigte Reaktionsmischung der Selbstassemblierungsreaktion des 24-Helixbündels, die eine Konzentration von etwa 50 nM DNA-Objekten und etwa 150 nM überschüssigen Klammeroligonukleotiden enthält; Mitte: dichte Probenlösung, die eine Konzentration von ca. 5,6 μM der 24-Helixbündel enthält und durch Lösen des Materials aus (c) hergestellt wurde; rechts: Vergleichsprobe mit einer Konzentration von 70 μM des Cyanin-3-markierten Oligonukleotids. (e-g) Abbildungen von TEM-Aufnahmen der getrockneten und wieder gelösten Proben des *Rothemund-Rechtecks* (a), des 42-Helixbündels (b) und des 24-Helixbündels (c); Bildeinsätze zeigen gemittelte Aufnahmen von jeweils mehreren hundert Einzelpartikeln ((e), $N \approx 300$; (f, g), $N \approx 800$) für die nicht getrockneten Proben (links) im Vergleich zu getrockneten und wieder gelösten Proben (rechts). Maßstäbe: 50 nm (Übersichtsdarstellungen); 10 nm (Bildeinsätze). © (2014) Die Autoren. Erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung-Nicht kommerziell 3.0 Deutschland.

	Gesamtmasse [mg]	davon dsDNA [mg]	Probenausbeute [%]
RR	6,8	3,2	71*
42hb	5,5	3,3	73**
24hb	8,4	4,2	93

Tabelle 5.1 – Trockengewicht, DNA-Gehalt und Probenausbeute des PEG-gefällten Materials aus 20 ml Faltungsansatz. Aus den Proben mit je 1 nmol Ausgangsstoffmenge wurden vor und nach den PEG-Fällungen insgesamt ca. 0,1 nmol für Vergleichsproben extrahiert. Die verbleibende Stoffmenge von 0,9 nmol entspräche bei 100 % Probenausbeute einer dsDNA-Masse von $\sim 4,5$ mg. Abkürzungen: dsDNA: doppelsträngige DNA; RR: *Rothemund-Rechteck*; 42hb: 42-Helixbündel; 24hb: 24-Helixbündel. Die vergleichsweise niedrige Ausbeute der Proben ist auf Probenverlust *bei der Mikrofiltration (0,45 μm) zur Entfernung makroskopischer Verunreinigungen oder **beim Transfer der direkt im 50 ml-Reaktionsgefäß getrockneten Probe auf das Uhrglas zurückzuführen.

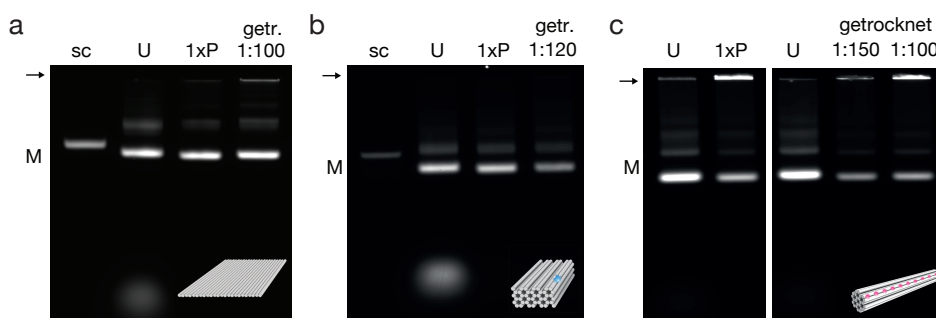


Abbildung 5.8 – Gelelektrophoretische Analyse der Probenqualität getrockneter und wieder gelöster DNA-Objekte. Unaufgereinigte Proben (U), PEG-gefällte Proben (1xP) und Verdünnungen der wieder gelösten Proben aus Abb. 5.7 a-c für das **(a) Rothemund-Rechteck**, **(b) 42-Helixbündel** und **(c) 24-Helixbündel**. Bildeinsätze stellen schematische Illustrationen der einzelnen Strukturen dar (vgl. Abb. 5.7 e-f). Pfeile markieren die Geltaschen; M markiert die Monomerbanden; sc markiert eine Referenzprobe des einzelsträngigen Templats p7249 (a) bzw. p7560 (b).

stand, der in den konzentrierten DNA-Origami-Lösungen in etwa 70 nm betrug, erscheint dies wahrscheinlich, da die Kantenlänge der DNA-Origami-Objekte selbst in einer vergleichbaren Größenordnung liegt (vgl. Abb. 5.1 c).

5.1.4 Ausblick: Lösungsmittelstabilität von DNA-Origami-Objekten

Die Möglichkeit, DNA-Origami-Lösungen mit Hilfe der PEG-Fällung in festes, nahezu wasserfreies Material zu überführen, kann auch dafür genutzt werden, das Lösungsmittelsystem der Proben komplett auszutauschen. Wasserfreie Lösungsmittel, in denen die Struktur der DNA-Origami-Objekte erhalten bliebe, könnten neue Möglichkeiten eröffnen, die DNA-Origami-Technologie für Synthese- oder Kopplungsreaktionen zu nutzen, die in wässriger Lösung nicht möglich wären. Hierzu zählt beispielsweise die Phosphoramiditreaktion, auf der die chemische Festphasensynthese der Oligonukleotide basiert [137].

Um die Lösungsmittelstabilität eines 42-Helixbündels exemplarisch zu testen, wurde eine Faltungsreaktion durch PEG-Fällung aufgereinigt, auf eine Reihe Reaktionsgefäße aufgeteilt und nach erneuter PEG-Fällung getrocknet. Die Proben wurden in verschiedenen Lösungsmitteln für mehrere Stunden inkubiert und nach anschließendem Abnehmen des Überstandes wieder in wässriger Lösung hydriert. Die getesteten Lösungsmittel umfassten wenig reaktive aprotisch-unpolare Lösungsmittel wie n-Hexan und Dichlormethan, aprotisch-polare Lösungsmittel wie Acetonitril und protische Lösungsmittel wie Methanol.

Eine gelelektrophoretische Analyse der wieder in Puffer gelösten Proben zeigte, dass die Struktur der DNA-Origami-Objekte in den meisten Lösungsmitteln erhalten blieb. In aprotischen Lösungsmitteln gingen die Objekte nicht in Lösung, sodass sie nach dem Abnehmen des Lösungsmittelüberstandes in den Reaktionsgefäßen verblieben und wieder in wässrigem Puffer gelöst werden konnten. Im protischen Lösungsmittel Methanol löste sich die DNA-Origami-Probe und verblieb im Überstand, was durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Ob die Struktur des 42-Helixbündels in Methanol denaturierte oder stabil blieb, konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

Dimethylsulfoxid (DMSO) zeigte als einziges aprotisches Lösungsmittel einen denaturierenden Effekt auf die DNA-Origami-Objekte. Die DNA-denaturierende Wirkung des DMSOs ist in der Literatur beschrieben und wird verschiedenen Wirkungsmechanismen, wie beispiels-

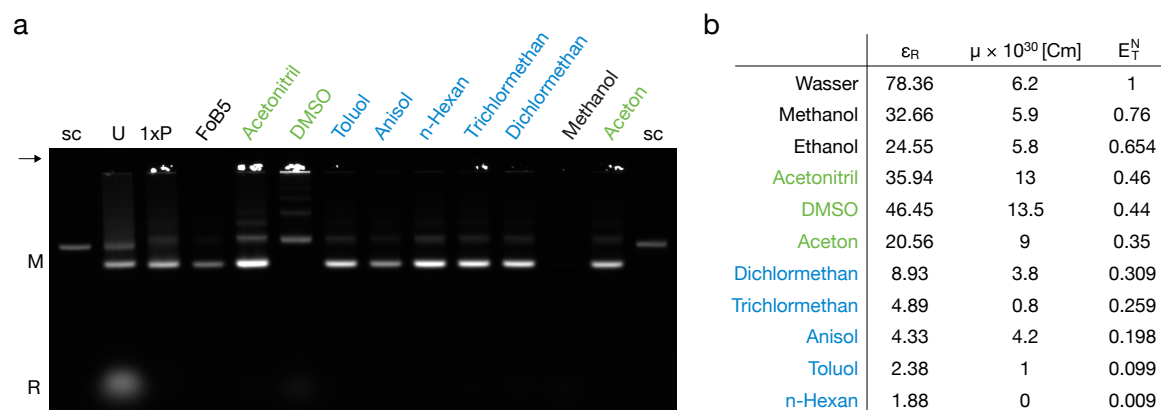


Abbildung 5.9 – Probenqualität der DNA-Objekte nach Inkubation in organischen Lösungsmitteln. (a) Abbildung der gelelektrophoretischen Analyse einer unaufgereinigten (U), einer PEG-gefällten (1xP) und einer PEG-gefällten und getrockneten Probe (FoB5) des 42-Helixbündels im Vergleich zu Proben, die für mehrere Stunden in den organischen Lösungsmitteln inkubiert wurden. Übrige Gelmarkierungen: sc: p7560; Pfeil: Gel-taschen; M: Monomerbande; R: Rückstände überschüssiger Klammeroligonukleotide. (b) Tabelle, in der die getesteten Lösungsmittel nach dem empirischen Lösungmittelparameter E_T^N sortiert sind, der sich aus der lösungsmittelabhängigen Solvatochromie des Farbstoffes N-Phenolat-Betain ableitet [141, 142]. Als weitere Lösungsmittelparameter sind die relative Dielektrizitätskonstante (ϵ_R) und das Dipolmoment (μ , in Coulombmetern [Cm]) angegeben. Die Werte wurden aus [141] übernommen. Farbmarkierungen der Lösungsmiteileigenschaften: schwarz, protisch; grün: aprotisch-polar; blau: aprotisch-unpolar.

weise der Destabilisierung der hydrophilen Doppelhelix oder auch direkten Interaktionen mit den hydrophoben Nukleobasen, zugeschrieben [138–140]. Im vorliegenden Experiment wurde beobachtet, dass die DNA-Objekte in DMSO zwar nicht in Lösung gingen, mit DMSO aber stark genug wechselwirkten, um denaturiert zu werden.

Aus dem Forschungsfeld der DNA-vermittelten Synthese (*DNA templated synthesis*) ist bekannt, dass gebildete Doppelhelices in einer Reihe von wasserfreien, organischen Lösungsmitteln erhalten bleiben [143]. Die hier beschriebenen ersten Testversuche zur Lösungsmittelstabilität zeigten, dass auch die kompakten DNA-Origami-Strukturen in wasserfreien Lösungsmitteln stabil sind, sodass das Potential der DNA-Nanotechnologie möglicherweise auch in anderen Lösungsmittelsystemen genutzt werden kann. Die Versuche zeigten für eine Auswahl an typischen aprotischen Lösungsmitteln der organischen Chemie, dass DNA-Origami-Objekte zwar nicht in Lösung gehen, aber strukturell intakt bleiben. Die Ergebnisse bestätigen damit andere Experimente in der Literatur, die die Stabilität von oberflächenadsorbierten DNA-Origami-Strukturen in extremen Lösungsmittel- und Temperaturbedingungen beschreiben [144, 145]. In diesen Systemen wären festphasenbasierte Reaktionen denkbar, in denen die DNA-Origami-Objekte zunächst in wässriger Lösung auf Oberflächen adsorbieren und dann in wasserfreie Lösungsmittel überführt werden.

5.2 Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation stellt eine weitere, skalierbare Methode zur Aufkonzentration von Makromolekülen dar, die im Gegensatz zur PEG-Fällung allerdings nicht auf der Zugabe ausfällender Reagenzien basiert. Die Konzentration der Probenlösungen findet hier in deutlich höheren Zentrifugalfeldern statt, bei denen makromolekulare Objekte sedimentieren und

sich am Boden des Reaktionsgefäßes anreichern. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Objekte hängt hierbei von der Stärke des Zentrifugalfeldes, der Dichte des Mediums sowie von der Masse und Form der Partikel ab [146]. Üblicherweise wird die Ultrazentrifugation in Dichtegradientenmedien aus Sukrose oder Glycerin durchgeführt, um langsame Sedimentationsgeschwindigkeiten und hohe Auftrennungseffizienzen zu erreichen [125].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ultrazentrifugation als Aufkonzentrationsmethode untersucht, mit der aufgereinigte DNA-Origami-Objekte direkt im Anwendungspuffer sedimentiert werden. Diese Vorgehensweise bringt den entscheidenden Vorteil mit sich, dass die konzentrierten Lösungen nicht, wie beispielsweise nach der PEG-Fällung oder der Aufreinigung in Dichtegradientenmedien, mit Rückständen der Präparationspuffer verunreinigt sind.

5.2.1 Charakterisierung

Am Beispiel der 42-Helixbündel-Struktur wurde die Methode hinsichtlich der notwendigen Dauer und Geschwindigkeit der Zentrifugation untersucht (Abb. 5.10 a) [128]. Die Untersuchungen zeigten, dass mit dem verwendeten Rotor⁸ eine Rotationsgeschwindigkeit von 45 000 Rotationen pro Minute⁹ (rpm) und eine Zentrifugationsdauer von 30 min ausreichen, um die Probe in den untersten 300 μl des Reaktionsgefäßes anzusammeln (Abb. 5.10 c, e).

Zwar bildete sich hierbei ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes aus, ein großer Teil der Partikel blieb aber in den untersten 100-300 μl der Probe in Lösung. Die photometrische Auswertung zweier Vergleichsproben zeigte, dass sich die pelletierten 42-Helixbündel innerhalb von Minuten wieder lösten und durch Diffusion im Probenvolumen verteilten, sobald die Zentrifugalkraft nicht mehr wirkte (Abb. 5.10 b). Ein ähnliches Verhalten wurde auch für Proben beobachtet, die für 90 min bei 60 000 rpm¹⁰ zentrifugiert wurden (Abb. 5.10 d, f). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die DNA-Origami-Objekte lediglich durch das anliegende Zentrifugalfeld zum Boden des Reaktionsgefäßes hin beschleunigt werden und sich dort anreichern, solange sich der Rotor dreht. Für die Herstellung konzentrierter Lösungen ist es daher notwendig, den Überstand direkt nach dem Anhalten des Rotors abzunehmen. Die Daten zeigten außerdem, dass die besten Probenausbeuten erreicht werden, wenn die pelletierte Probe in den untersten 100–300 μl des Überstandes gelöst wird, da die unterste Fraktion und das Pellet zusammen 99 % der Probe enthielten. (Abb. 5.10 b-f).

Die gelelektrophoretische Analyse der Proben ergab, dass sowohl die gelösten Pellets als auch die untersten Fraktionen überwiegend intakte Monomere enthielten (Abb. 5.10 c, d). Für die Proben der gelösten Pellets wurde eine leichte Aggregatbildung beobachtet, die allerdings bei höherer Zentrifugationskraft oder -dauer nicht verstärkt wurde (Abb. 5.10). Dies deutet an, dass die Aggregation eher durch Partikelinteraktionen bei hohen Konzentrationen in den gebildeten Pellets als durch die anliegende Zentrifugalkraft verursacht wurde.

Weitere Charakterisierungsexperimente zur Ultrazentrifugation wurden von Floris Engelhardt¹¹ durchgeführt und ergaben, dass auch Rotationsgeschwindigkeiten von 30 000 rpm ausreichen können um die Probe eines 42-Helixbündels zu sedimentieren, während ein Großteil der Probe nach 30 min Zentrifugation bei 20 000 rpm noch in den oberen Volumenfraktionen detektiert wurde [128].

⁸Festwinkelrotor TLA110 der Firma BeckmanCoulter GmbH

⁹dies entspricht im verwendeten Rotor etwa 85 000 g

¹⁰dies entspricht im verwendeten Rotor etwa 150 000 g

¹¹seit 2015 Doktorandin in der AG Dietz

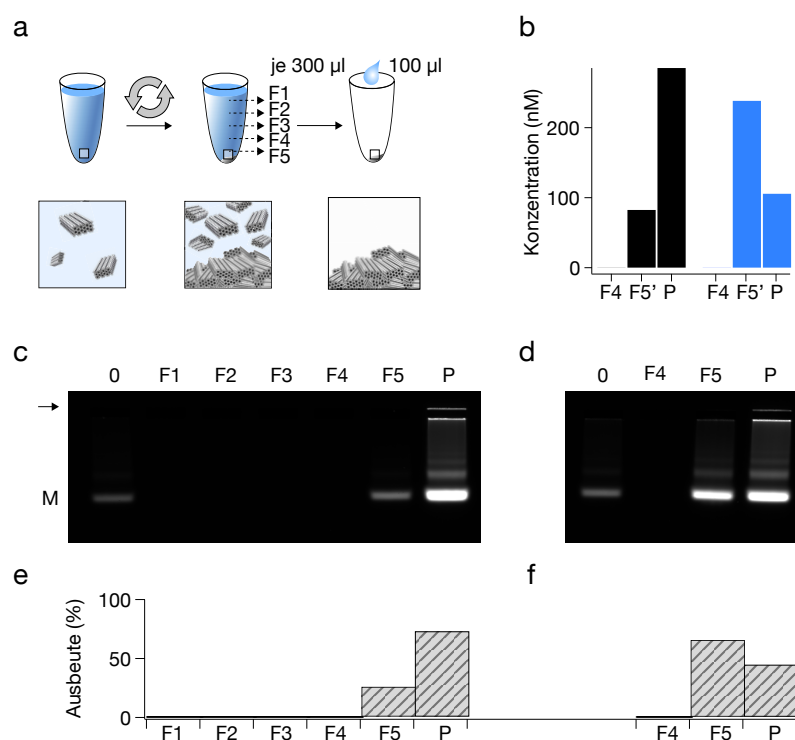


Abbildung 5.10 – Erhöhung der Probenkonzentration mittels Ultrazentrifugation. (a) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Jeweils 1,5 ml einer PEG-gefällten Probe des 42-Helixbündels (42hbv13 PolyT in FoB5) wurden zentrifugiert und anschließend in Volumenfraktionen aufgeteilt, die nach und nach vom oberen Rand des Probenüberstands abgenommen wurden. (b) Photometrische Konzentrationsbestimmung identischer Proben nach Zentrifugation für 30 min bei 45 000 rpm. Die Fraktionen wurden direkt (schwarz) und 30 min (blau) nach Anhalten des Rotors abgenommen. Andere Fraktionsvolumina als in (a): F4: 300 µl; F5': 100 µl; P: 100 µl (c, d) Abbildungen der gelelektrophoretischen Analysen der Fraktionen nach Zentrifugation für (c) 30 min bei 45 000 rpm und (d) 90 min bei 60 000 rpm. Die Volumenfraktionen wurden in (c) direkt und in (d) etwa 15 min nach Anhalten des Rotors abgenommen. Gelmarkierungen: Pfeil: Geltaschen zur Probenaufrufung; M, Monomerbande; 0: Ausgangsprobe; F1–F5: Fraktionen mit je 300 µl wie in (a); P: gelöstes Pellet (in 100 µl FoB5). (e, f) Photometrische Quantifizierung der Probenmenge in (c) und (d) im Vergleich zur Ausgangsprobe (0).

5.2.2 Herstellung PEG-freier und hochkonzentrierter Proben

Die Versuche aus Abschnitt 5.1.3 veranschaulichten die Herstellung hochkonzentrierter DNA-Origami-Lösungen mit Hilfe der PEG-Fällung. Insbesondere die Bestimmung des Trockengewichts PEG-gefällter und getrockneter Proben zeigte aber auch auf, dass mit den deutlich höheren Probenkonzentrationen auch der Anteil kopräzipitierter PEG-Polymere zunahm, die einen signifikanten Anteil des Trockenmaterials ausmachten (vgl. Abb. 5.7 und Tab. 5.1).

Eine Kombination der PEG-Fällung mit anschließender Ultrazentrifugation ist eine mögliche Strategie, die einfache Handhabung der PEG-Fällung zur Aufreinigung und Volumeneinengung zu nutzen und durch einen anschließenden Ultrazentrifugationsschritt ebenso konzentrierte, jedoch PEG-freie Proben herzustellen. Um diese Präparationsstrategie exemplarisch zu veranschaulichen, wurde eine PEG-gefällte Probe eines 48-Helixbündels¹² mit fPEG

¹²Das Objekt wurde von Klaus Wagenbauer – seit 2013 Doktorand der AG Dietz – entworfen und hergestellt.

und einem nicht bindenden Oligonukleotid versetzt und durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Nach der Ultrazentrifugation waren 88 % der Probe im Pellet, und etwa 1.3 % der Probe in der untersten Volumenfraktion des Reaktionsgefäßes, während die fPEG-Polymere und das Oligonukleotid weiterhin gleichmäßig über alle Volumenfraktionen verteilt waren (Abb. 5.11 a-d). Die Probe hatte eine Ausgangskonzentration von etwa 170 nM, die durch die Ultrazentrifugation um den Faktor 40 auf 5.2 μ M erhöht werden konnte. Gelelektrophoretische Analysen der Probe vor und nach der Ultrazentrifugation zeigten vergleichbare Bandenprofile mit überwiegend Monomeren und Dimeren des 48-Helixbündels.

Das 48-Helixbündel wies formkomplementäre Obeffächenelemente auf, die über Basenpaarstapelwechselwirkungen bei höheren Magnesiumkonzentrationen Homopolymere bilden können (siehe Abb. 3a in [42]). TEM-Analysen der polymerisierten Probe, die von Klaus Wagenbauer¹³ durchgeführt wurden, zeigten, dass die formkomplementären Oberflächenelemente des 48-Helixbündels nach Ultrazentrifugation intakt waren, da sie lange Polymere mit etwa hundert Monomeren bilden konnten (Abb. 5.11 e, f).

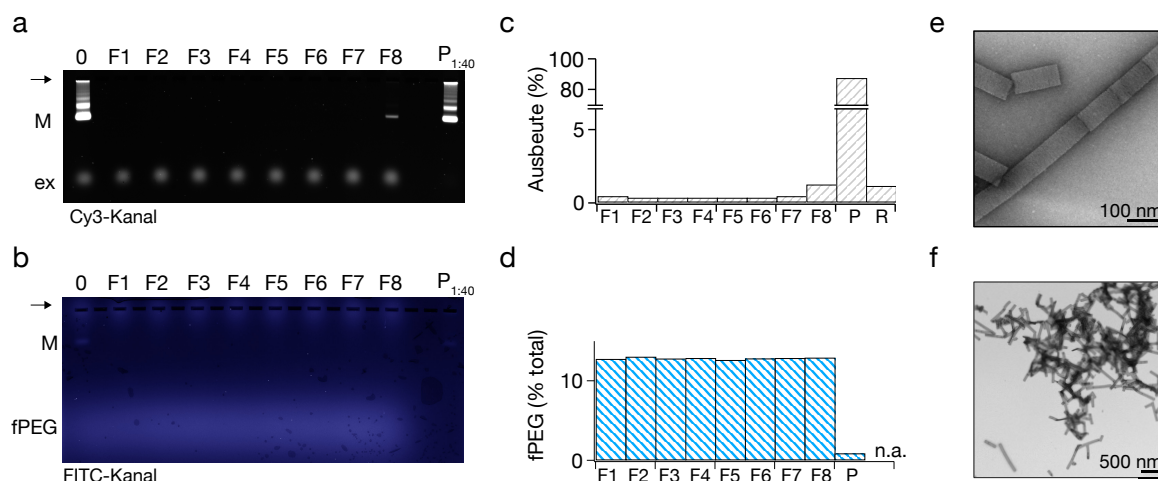


Abbildung 5.11 – Herstellung hochkonzentrierter, PEG-freier Proben mittels PEG-Fällung und Ultrazentrifugation. (a, b) Gelelektrophoretische Analyse der Volumenfraktionen nach der Ultrazentrifugation von 4 ml PEG-gefällter Probe des 48-Helixbündels (siehe Abb. 3a in [42]). Die Probe wurde mit 1.8 mM FITC-markiertem PEG (fPEG) und einem Cy3-markierten, nicht bindenden Oligonukleotid versetzt, um den Verbleib restlicher PEG-Polymere und überschüssiger Oligonukleotide zu visualisieren. Das Gel wurde separat im Cy3-Kanal (a) und im FITC-Kanal (b) gescannt. Probenmarkierungen: 0: Ausgangsprobe; F1–F8: Volumenfraktionen zu je 500 μ l; P, gelöstes Pellet; P_{1:40}: 40-fache Verdünnung von P; Pfeile: Gelaschen; M: Monomerbande; ex: nicht bindendes Oligonukleotid; fPEG: FITC-markierte PEG-Polymere. (c) Quantifizierung der Probenausbeute in den Volumenfraktionen aus (a) anhand der Absorption der Probe bei $\lambda=260$ nm. R: Probenrückstand im Zentrifugationsröhrchen (d) Quantifizierung des fPEG-Gehalts in den Volumenfraktionen anhand des Fluoreszenzsignals bei Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen von 492 nm bzw. 516 nm. n.a.: nicht ausgewertet. (e, f) Abbildungen von TEM-Aufnahmen der ultrazentrifugierten Probe (P), die zur Polymerisierung bei 25 mM Magnesiumchlorid inkubiert wurde.

¹³seit 2013 Doktorand der AG Dietz

5.3 Zusammenfassung von Kapitel 5

Dieses Kapitel beschrieb die PEG-Fällung von DNA-Objekten sowie deren Sedimentation durch Ultrazentrifugation, die sich besonders in Kombination beider Methoden zur Herstellung dichter und reiner Probenlösungen eignen, wie sie für die Kristallisation benötigt werden.

Beide Methoden zeigten in den beschriebenen Experimenten hohe Probenausbeuten und eine gute Skalierbarkeit, die jeweils einzig durch die Rotorkapazitäten der verfügbaren Geräte limitiert sind. Die PEG-Fällung ist auf Grund der milderen Probenbehandlung und der einfacheren Handhabung gut für die Aufbereitung verdünnter Selbstassemblierungsreaktionen geeignet. Die Ultrazentrifugation bietet sich als letzter Konzentrationsschritt für bereits konzentrierte und aufgereinigte Proben an, um hochkonzentrierte und PEG-freie Proben herzustellen.

Beide Methoden beeinträchtigen die strukturelle Intaktheit der behandelten DNA-Origami-Objekte nicht, sie eignen sich jedoch nicht für die Entfernung von Aggregaten oder anderen höher-molekularen Spezies. Allerdings ermöglichen beide Methoden eine bessere Nutzung selektiver Aufreinigungsmethoden, da sie die Verdünnungseffekte, die typischerweise mit der selektiven Aufreinigung einhergehen, kompensieren können.

Die Protokolle, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, basieren auf anderen Projekten, die im gleichen Zeitraum wie die vorliegende Arbeit verfolgt wurden, und erst die Herstellung größerer Mengen an DNA-Origami-Objekten ermöglichten [147]. Die Resultate beider Projekte ermöglichen aktuell die Herstellung und Aufbereitung mehrerer Milligramm an DNA-Origami-Objekten ohne größere Probenverluste. Die vorgestellten Aufreinigungs- und Aufkonzentrationsmethoden sind aber grundsätzlich ebenso für die Aufbereitung mehrerer Gramm an DNA-Origami-Objekten geeignet.

Kapitel 6

Erste Kristallisationsansätze mit DNA-Origami-Objekten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe kompakter, mehrschichtiger DNA-Origami-Strukturen in zahlreichen Kristallisationsansätzen getestet (Abb. 6.1), allerdings bildeten sich in keiner der getesteten Bedingungen kristalline Strukturen aus den DNA-Objekten aus. Typische Beobachtungen aus diesen Experimenten waren die Bildung von Präzipitaten bei höheren Probenkonzentrationen oder von Sphärolithen in Bedingungen, die das Polyamin Spermin enthielten. In den folgenden Abschnitten werden zunächst Experimente beschrieben, die mit einer hochkonzentrierten Lösung des 42-Helixbündels (siehe Abb. 5.7) angesetzt wurden. Die Zusammensetzung der Sphärolithe wurde für Ansätze mit einer 100-Helixbündel-Struktur¹ näher untersucht.

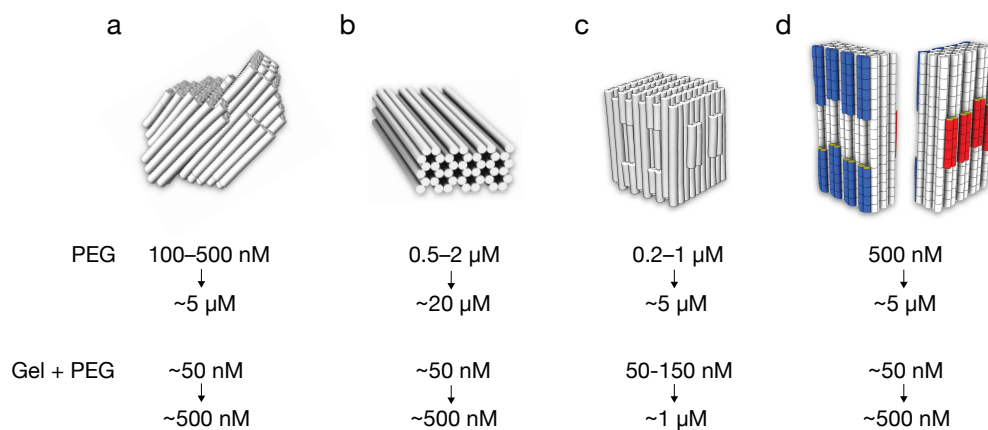


Abbildung 6.1 – Überblick über in Kristallisationsansätzen getestete DNA-Origami-Objekte. (a-d, oben) CanDo-berechnete [2, 3] 3D-Modelle (a,c) und Illustrationen (b,d) des (a) 82-Helixbündels [39], (b) 42-Helixbündels [117], (c) 100-Helixbündels und (d) 48-Helixbündels [42] (Darstellung übernommen mit Erlaubnis von Klaus Wagenbauer). Die Helixpackung der Objekte in (a) und (c) ist rechtwinklig, die in (b) und (d) honigwabenartig. Die Objekte (c) und (d) weisen formkomplementäre Oberflächenelemente zur dynamischen Interaktion mit anderen Monomeren auf [42]. (a-d, unten) Die Proben wurden entweder mittels PEG-Fällung aufgereinigt und aufkonzentriert (PEG) oder nach einem Gelaufreinigungsschritt mittels PEG-Fällung konzentriert (Gel+PEG). Die angegebenen Werte beschreiben den Bereich an eingesetzten Probenkonzentrationen (oben) und die maximal erreichten Probenkonzentrationen in den equilibrierten Tropfen (unten).

¹Dieses Objekt wurde von Philip Ketterer, seit 2013 Doktorand der AG Dietz, entworfen

6.1 Hohe Probenkonzentration

DNA-Origami-Proben wurden ähnlich wie die DNA-Dreiecke in Kristallisationsansätzen mit der *Sitting-Drop*-Methode untersucht, allerdings wurden die Platten entweder bei 25 °C oder bei einer im Vergleich zu Experimenten mit DNA-Dreiecken milderen Temperaturrampe im Intervall von 45–20 °C inkubiert. Die *Sitting-Drop*-Methode bietet die Möglichkeit, das finale Volumen der Probentropfen über die Zusammensetzung der Reservoirlösungen, die die Probenkammern absättigen, zu steuern [148]. Hierbei ist zwischen zwei grundsätzlichen Vorgehensweisen zu unterscheiden:

- In klassischen Kristallisationsscreenings enthält die Reservoirlösung dieselbe Zusammensetzung wie der jeweilige Kristallisationspuffer, der zu gleichen Teilen mit der Probenlösung vermischt wird. Durch diesen Schritt wird die Konzentration des zu kristallisierenden Objekts in den angesetzten Tropfen zunächst verdünnt. Durch Equilibrierung der Tropfenvolumen gegen die Reservoirlösung wird die Probenkonzentration dann langsam zur ursprünglich eingesetzten Probenkonzentration konzentriert [149].
- Wird – so wie in den Ansätzen für das DNA-Dreieck (vgl. Abschnitt 3.1.1 und [18]) – eine Reservoirlösung mit deutlich höherer Teilchenanzahl gewählt, als in Probe und Kristallisationspuffer zusammen vorliegen, kann die relative Humidität in den abgesättigten Probenkammern kontrolliert reduziert werden. In den Probentropfen werden dann der Kristallisationspuffer und die Probe zusammen soweit konzentriert, bis der relative Anteil an Wassermolekülen dem des Reservoirs entspricht [148, 150, 151]. Enthält die Reservoirlösung volatile Bestandteile, wie beispielsweise Ammoniumionen, findet neben der Equilibrierung des relativen Gehalts an Wassermolekülen auch eine Verteilung der Ammoniumionen in der Probenkammer statt.

Ein Vergleich dieser beiden Vorgehensweisen wurde für eine hochkonzentrierte Probe des 42-Helixbündels getestet, deren Herstellung in Abschnitt 5.1.3 beschrieben wurde. Identische Probentropfen wurden hier jeweils mit einer Reservoirlösung aus dem Kristallisationspuffer oder gegen eine 1,7 M Lösung aus Ammoniumsulfat angesetzt (Abb. 6.2). Das Volumen der Tropfen, die gegen Ammoniumsulfat equilibrierten, wurde deutlich stärker reduziert, als identische Probentropfen, die mit Kristallisationspuffer als Reservoirlösung angesetzt wurden. Tropfen mit geringen Salzkonzentrationen wurden zudem durch das Ammoniumsulfat-Reservoir stärker aufkonzentriert als Probentropfen mit höherem Salzanteil, wohingegen alle Tropfen in den Ansätzen mit Kristallisationspuffer als Reservoirlösung das gleiche Endvolumen hatten (Abb. 6.2). Dies hat den Vorteil, dass die effektive Probenkonzentration bei steigendem Salzanteil besser abgeschätzt und verglichen werden kann.

Obwohl die Tropfen, die gegen Ammoniumsulfat equilibrierten, kleinere Tropfenvolumina und damit deutlich höhere Proben- und Salzkonzentrationen aufwiesen, bildete sich hier deutlich weniger Präzipitat als in den identischen Probentropfen, die gegen den Kristallisationspuffer equilibrierten und kaum aufkonzentriert wurden (Abb. 6.2, untere Reihe). Auf Grund der Reservoirlösung aus Ammoniumsulfat enthielten die Tropfen in diesen Probenkammern aber zusätzlich einen gewissen Anteil an Ammoniumionen. Diese Beobachtung deutet an, dass die Gegenwart der Ammoniumionen der Probenaggregation entgegenwirkte. Der Anteil der volatilen Ammoniumionen in der Probenlösung kann in diesen Ansätzen allerdings nicht kontrolliert werden. Möglicherweise kann der Effekt der Ammoniumionen aber ebenfalls in kontrollierten Gemischen aus anderen, nicht volatilen monovalenten Kationen und divalenten Kationen erreicht werden.

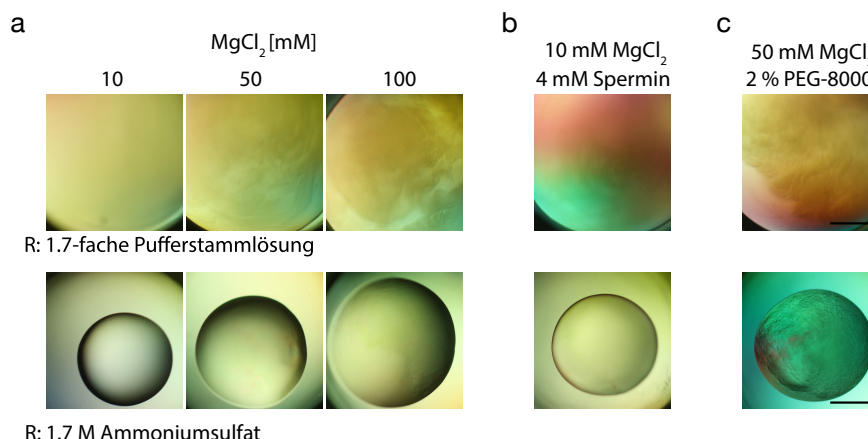


Abbildung 6.2 – Sitting-Drop-Kristallisationsansätze mit einer Probe des 42-Helixbündels. Abbildungen zeigen typische Bildausschnitte von Tropfen mit (a) zunehmender Magnesiumchloridkonzentration, (b) Spermin und (c) PEG-8000. Obere Reihe: Reservoir aus 1,7-facher Pufferstammlösung; untere Reihe: Reservoir aus 1,7 M Ammoniumsulfatlösung. Maßstäbe: 500 µm. Die Probe hatte eine Konzentration von 6 µM und war in FoB20 gelöst. 1 µl Probe wurde mit 1,5 µl 1,7×Kristallisationspuffer vermischt. Die Angaben der Bildbeschriftung beziehen sich auf die Zusammensetzung des 1×Kristallisationspuffers in den frisch angesetzten Tropfen. Zusätzlich zu den angegebenen Komponenten in (a–c) enthielten alle Bedingungen 25 mM Tris-HCl (pH 8,5). Durch den Probenpuffer (FoB20) enthielten alle Tropfen außerdem 2 mM Tris-Base, 0,4 mM EDTA, 2 mM NaCl und 8 mM MgCl₂. Die Tropfen wurden für etwa zehn Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

In den Proben tropfen, die neben Magnesium- und Chloridionen das mehrfach positiv geladene Polyamin Spermin enthielten, zeigte sich in den Versuchsansätzen ebenfalls weniger Präzipitat in jenen Tropfen, die gegen Ammoniumsulfat equilibrierten (Abb. 6.2 c). Tropfen, die neben Magnesiumionen außerdem PEG-8000 enthielten, wiesen jedoch auch in Gegenwart der Ammoniumionen deutliche Präzipitate auf (Abb. 6.2 c). Diese Beobachtungen bestätigen, dass PEG-Polymere und Sperminmoleküle die attraktiven Wechselwirkungen zwischen DNA-Objekten auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen, wie auch in der Literatur beschrieben wurde [152].

Insgesamt zeigten diese Versuche, dass mit Hilfe der PEG-Fällung Probenkonzentrationen erreicht wurden, die hoch genug waren, um kritische Konzentrationen in den Kristallisationsansätzen zu erreichen und in einigen getesteten Fällen auch zu überschreiten. Die beobachtete Präzipitatbildung wurde durch höhere Konzentrationen an Magnesiumionen verstärkt und kann möglicherweise in weiteren Versuchen durch Kombination aus mono- und divalenten Kationen reduziert werden. Mit diesen hochkonzentrierten Probenlösungen ist eine Vielzahl an Kombinationen zwischen Kristallisationspuffern und Reservoirlösungen denkbar, in denen noch deutlich höhere und selbstverständlich auch niedrigere Probenkonzentrationen getestet werden können.

Reservoirlösungen mit hohem Salz- oder Puffergehalt können außerdem dazu genutzt werden, die Probenkonzentration in den equilibrierten Tropfen, trotz vergleichsweise geringer Ausgangskonzentrationen, zu maximieren. In den Versuchen mit DNA-Dreiecken zeigte sich die Verwendung von konzentrierten Stammlösungen als Reservoir als praktische Methode, auch höhere Aufkonzentrationen der Tropfen mit definierten effektiven Probenkonzentrationen und Pufferkomponenten in kontrollierter Art und Weise zu erreichen (vgl. Abschnitt 3.1.1). Diese Strategie kann in weiteren Kristallisationsansätzen verfolgt werden, um

gleichzeitig kontrollierte und vergleichbare Kristallisationsbedingungen, aber auch hohe Aufkonzentrationsfaktoren der Probe zu erreichen. Allerdings ist hinsichtlich dieser Strategie zu bedenken, dass zusammen mit der Probe auch der Magnesiumgehalt aufkonzentriert wird. Da die meisten Origami-Strukturen eine minimale Konzentration von 5 mM Magnesiumchlorid benötigen und die Präzipitatbildung in den Tropfen bereits ab 50 mM Magnesiumchlorid einsetzen kann, sind Aufkonzentrationen um mehr als das zehnfache der eingesetzten Probe möglicherweise nicht zu realisieren. Auch hier könnte allerdings die weitere Untersuchung von Pufferbedingungen mit Gemischen aus mono- und divalenten Kationen das Spektrum möglicher Versuchsbedingungen noch deutlich erweitern.

Zusätzliche Möglichkeiten die Kristallisationsbedingungen zu variieren bieten sich durch Additive wie PEG, Spermin und andere Komponenten, die für die Kristallisation von Nukleinsäuren aus der Literatur bekannt sind [153, 154]. Diese Reagenzien ermöglichen zwar eine vielschichtige Variation der Partikelinteraktionen, erhöhen aber auch die Anzahl an Bedingungen, die alle einzig in experimentellen Ansätzen auf mögliche Treffer getestet werden können [71, 153].

6.2 Ansätze mit DNA-kondensierenden Additiven

Unter den getesteten Bedingungen fielen Tropfen, die das Polyamin Spermin enthielten, besonders auf, weil sich hier Sphärolithe bildeten. Sphärolithe sind kristalline Aggregate ohne weitreichende Fernordnung, die aus Fibrillen mit flüssigkristallinen Partikelanordnungen bestehen [152, 155, 156]. Diese Bedingungen stellen einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Versuche dar, in denen möglicherweise eine höhere Ordnung der kondensierten Partikel erreicht werden kann. Die bisher gesammelten Erkenntnisse werden deswegen im Folgenden näher beschrieben.

DNA-Kondensation in verdünnten Lösungen

Die polyamininduzierte Bildung von flüssigkristallinen Phasen und Sphärolithen aus DNA ist in der Literatur beschrieben [152, 157, 158]. Komplexverbindungen wie Cobalthexamin und Polyamine wie Spermin und Spermidin sind deshalb ein typischer Bestandteil in kommerziell erhältlichen Pufferscreens für die Kristallisation von DNA-Molekülen [154]. Im Rahmen eines Forschungsprojektes für die Erstellung einer Bachelorabschlussarbeit wurden von dem Studenten Dominik Renn², unter der Anleitung der Verfasserin dieser Arbeit, Versuche durchgeführt, in denen die kondensierende Wirkung von Spermin und Cobalthexamin auf verschiedene DNA-Origami-Objekte untersucht wurde. Die Experimente ergaben, dass beide Additive DNA-Origami-Objekte unterschiedlicher Form auch in verdünnten Lösungen kondensierten und dabei ihre Struktur nicht zerstörten. Kristallisationsansätze mit Cobalthexamin wurden zwar ebenfalls getestet, hier bildeten sich jedoch überwiegend Salzkristalle, die keine DNA enthielten (Daten nicht gezeigt).

Kristallisationsansätze mit Spermin

In Kristallisationsansätzen mit Spermin bildeten sich Sphärolithe für alle getesteten Objekte – unabhängig von ihrer Form, der Passivierung der Helixenden oder der Möglichkeit zur spezifischen Partikelinteraktion über formkomplementäre Oberflächenelemente (vgl. Abb. 6.1

²Zeitraum des Forschungsprojekts in der AG Dietz: Anfang April bis Anfang Juli 2013

und Abb. 6.3). Es wurde außerdem beobachtet, dass sich Sphärolithe sowohl in Tropfen mit vergleichsweise verdünnten als auch mit konzentrierten Probenlösungen bildeten (Abb. 6.3).

Der Konzentrationsbereich von DNA-Origami-Objekten in den equilibrierten Tropfen, die Sphärolithe enthielten, reichte insgesamt von etwa 100 nM bis etwa 3 μ M. In Tropfen mit höherer Probenkonzentration (> 500 nM) bildeten sich Sphärolithe tendenziell erst nach längerer Inkubationszeit von einigen Monaten aus. Über einen Zeitraum von 18 Monaten nahm die Größe der Sphärolithe weiter zu (Abb. 6.3).

Für das 100-Helixbündel wurden sperminhaltige Kristallisationstropfen mit verschiedenen Varianten angesetzt, die sich in der Stärke der spezifischen Interaktion zwischen den formkomplementären Oberflächenelementen unterschieden (vgl. Abb. A.6 und Abb. C.2–C.4). Es bildeten sich jedoch in allen Bedingungen Sphärolithe, unabhängig davon, ob die formkomplementären Oberflächenelemente über Blunt Ends oder Sticky Ends interagieren konnten, oder mit Polythymine-Überhängen passiviert waren (Abb. 6.3, siehe auch Anhang). In den Proben-tropfen zeigte sich ein Trend zu größeren Sphärolithen bei höheren Probenkonzentrationen. In den Pufferkontrollen ohne DNA bildeten sich keine oder deutlich kleinere Sphärolithe (Abb. 6.3).

Eine Fluoreszenzmarkierung mit einem *Cyanin-5* (Cy5)-Farbstoff pro DNA-Objekt erlaubte die Verfolgung der Probenverteilung in den equilibrierten Tropfen im Cy3-Kanal³. Die Fluoreszenzintensität in den Tropfen spiegelte die unterschiedliche Probenkonzentration in den Ansätzen wider und zeigte, dass die Sphärolithe DNA enthielten (Abb. 6.3). Aus dem Fluoreszenzsignal selbst lässt sich allerdings nicht schließen, ob die Struktur der Origami-Objekte in den Tropfen erhalten blieb, oder ob die Sphärolithe entfaltetes DNA-Material enthielten.

Der relative Anteil des DNA-Materials in den Sphärolithen war in Probentropfen mit geringer Probenkonzentration im Vergleich zum Tropfenhintergrund zwar höher, die absolute Fluoreszenzintensität der Sphärolithe war jedoch für Sphärolithe, die sich in Tropfen mit höherer Probenkonzentration bildeten, stärker (Abb. 6.3). Sphärolithe mit der stärksten Fluoreszenzintensität zeigten im Vergleich zu anderen Sphärolithen auch ein anderes Polarisationsmuster, was auf eine dichtere Packung der Partikel in diesen Formationen hindeutet. Ein Zusammenhang zwischen der Partikeldichte und dem Polarisationsmuster wurde auch in anderen Studien zu Sphärolithen aus Proteinaggregaten festgestellt [156].

Analyse der Sphärolithe

Um die Zusammensetzung der Sphärolithe näher zu untersuchen, wurden einige Kandidaten aus den Tropfen extrahiert und in Puffer gewaschen. Das Polarisationsmuster und die Fluoreszenz der Sphärolithe konnten außerhalb der Kristallplatten noch deutlicher abgebildet werden (Abb. 6.4 a,b). TEM-Aufnahmen der Sphärolithe, die in FoB5 verdünnt und ca. 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt wurden, enthielten nur extrem wenige einzelne Partikel und Agglomerate aus teilweise entfalteten 100-Helixbündeln (Abb. 6.4 c). Diese Beobachtung zeigten zunächst, dass die Sphärolithe tatsächlich aus 100-Helixbündeln bestanden, auch wenn die TEM-Abbildungen nahe legen, dass die Struktur der DNA-Objekte zum Teil entfaltet war. Die extrem geringe Probenmenge auf den Probenträgern deutet an, dass sich die Sphärolithe nicht komplett gelöst hatten, sondern sich nur vereinzelt Aggregate von der Oberfläche

³Die Detektion des spezifischen Cy5-Emissionssignals war mit der verwendeten Farbkamera nicht möglich. Die Fluorophore zeigten allerdings auch in den anderen Fluoreszenzkanälen ein schwaches Emissionssignal (vgl. Abb. 3.11).

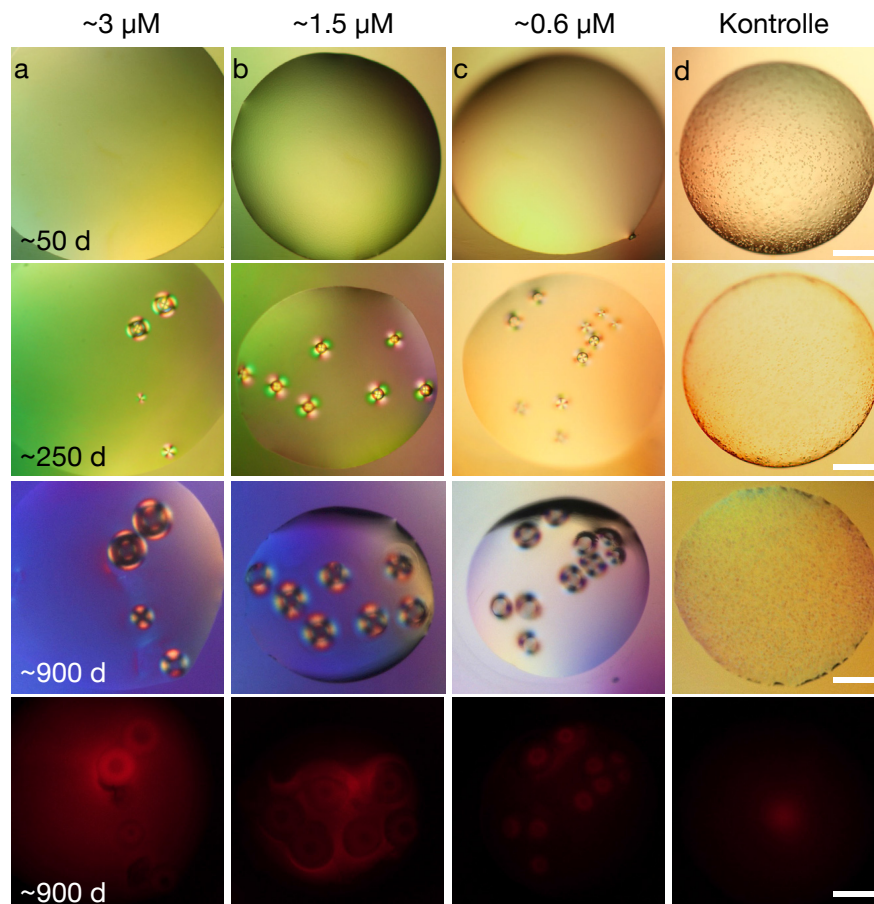


Abbildung 6.3 – Kristallisationsansätze des 100-Helixbündels mit Spermin als Additiv. Abbildungen zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen der Kristallisationstropfen unter linear polarisiertem Licht nach 50, 250 und 900 Tagen Inkubation, sowie Fluoreszenzaufnahmen nach 900 Tagen Inkubation (unterste Reihe) **(a-c)** Die gezeigten Tropfen enthalten verschiedene Interaktionsvarianten und Konzentrationen des 100-Helixbündels, die über formkomplementäre Oberflächenelemente mit Sticky ends mit einer (a) oder zwei (b) überhängenden Basen oder mit Blunt Ends (c) interagieren konnten. Die Proben wurden durch PEG-Fällung aufgereinigt und konzentriert. Für die Ansätze wurde 1 μ l Probe mit 4 μ l Puffer vermischt. **(d)** Die Pufferkontrolle wurde mit Wasser anstatt mit Probe vermischt. Die Pufferkomponenten hatten in den angesetzten Tropfen eine Ausgangskonzentration von 25 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM Magnesiumchlorid und 3 mM Spermin. Reservoirolösung: 1,7 M Ammoniumsulfat. Die Proben wurden mit einem Gradienten von 0,3 °C pro Stunde von 45 °C auf 20 °C abgekühlt und weiter bei Raumtemperatur inkubiert. Die unterste Reihe zeigt Fluoreszenzaufnahmen der Tropfen im Cy3-Kanal bei einer Belichtungszeit von 300 ms und einem Kamera-Verstärkungsfaktor von 5 (Leica DFC7000 T). Maßstäbe: 200 μ m.

ablösen und an die Kohlenstoffoberfläche des Probenträgers adsorbieren. Möglicherweise bestehen die Sphärolithe daher zu einem großen Teil aus irreversiblen Aggregaten und teilweise entfalteten Objekten. Die Degradation der DNA, die die teilweise Denaturierung der Objekte und auch die irreversible Aggregation erklären könnte, kann aber ebenso durch die lange Inkubationszeit und den Magnesiumionengehalt der Proben bedingt sein und muss nicht in direktem Zusammenhang mit der Sphärolithbildung an sich stehen.

Die gelelektrophoretische Analyse der Proben zeigte, dass die Sphärolithe mit Ethidiumbromid anfärbbar waren. Diese Beobachtung bestätigt aus einer weiteren Perspektive, dass die Sphärolithe DNA enthielten. Die Sphärolithe lösten sich allerdings auch während der Bedingungen der Gelelektrophorese nicht auf (Abb. 6.4 d). Ein Teil des Probenmaterials verblieb in den Geltaschen, was die Beobachtungen der Ablösung von Aggregaten aus der TEM-Analyse bestätigt. Ein anderer Teil des Probenmaterials löste sich – vermutlich auf Grund der angelegten Spannung – direkt von den Sphärolithen und wanderte durch die Gelmatrix. Dies zeigt, dass die Sphärolithe tatsächlich auch teilweise gefaltete Monomere enthielten, die noch kompakt genug gefaltet waren, um die Gelmatrix schneller zu durchwandern als eine Referenzprobe aus einzelsträngigen Templatsträngen. Die strukturelle Beschaffenheit des DNA-Materials in den Sphärolithen konnte allerdings durch diese Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden.

Weitere Möglichkeiten, die Anordnung und Struktur der Partikel in den Sphärolithen zu untersuchen, wären rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen [159], Röntgenmikrotomographie [160] oder Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) [161]. Ähnliche Analysen mit Sphärolithproben, die weniger lang inkubiert wurden, könnten außerdem einen besseren Einblick ermöglichen, inwiefern die sperminvermittelte Kondensation der DNA-Objekte ihren strukturellen Aufbau beeinträchtigt.

6.3 Zusammenfassung von Kapitel 6

Die ersten Kristallisationsansätze mit DNA-Origami-Proben zeigten, dass die Anforderung der Herstellung ausreichend konzentrierter Proben mit Hilfe der PEG-Fällung erreicht werden kann, da sich für Probenkonzentrationen nahe der empirischen Löslichkeitsgrenze ($5\text{--}6\ \mu\text{M}$) zumindest starke Präzipitatbildung beobachten ließ. Dies deutet zunächst auf zu starke attraktive Kräfte zwischen den Partikeln hin, stellt aber auch einen Ansatzpunkt dar, von dem aus die attraktiven Kräfte zwischen den Partikeln durch andere Puffer- oder Konzentrationsbedingungen oder durch andere DNA-Objekte mit optimierten Eigenschaften reduziert werden können, bis die thermodynamischen Voraussetzungen für ein Nukleationsereignis gegeben sind.

Die restlichen PEG-Moleküle in den PEG-gefällten Proben könnten hierbei einen negativen Effekt auf die Partikelinteraktion haben. Deutliche Effekte in PEG-haltigen Proben konnten jedoch selbst für maximal konzentrierte Proben nur durch weitere Zugabe von PEG-8000 als Additiv erzeugt werden. Um PEG als potentiellen Störfaktor ausschließen zu können, ist die Herstellung PEG-freier Proben mittels Ultrazentrifugation und anderer rückstands-freier Präparationsmethoden eine vielversprechende und notwendige Präparationsstrategie für weitere Experimente.

Die Entkopplung der Reservoirolösung und des verwendeten Kristallisationspuffers ist eine einfache Möglichkeit, die effektive Probenkonzentration in den Kristallisationsansätzen zu steuern und deutlich zu erhöhen. Diese Strategie erweitert das Spektrum möglicher Ausgangskonzentrationen und möglicherweise auch das Spektrum an Phasenräumen, die die zu

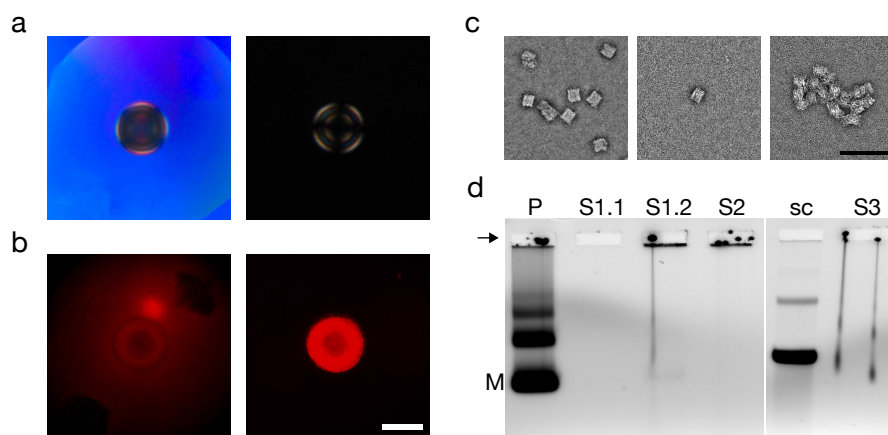


Abbildung 6.4 – Extraktion und Analyse von Sphärolithen aus Kristallisationsansätzen mit 100-Helixbündeln und Spermin. **(a)** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Sphärolithen unter linear polarisiertem Licht in der Kristallisationsplatte (links) und nach Überführung auf einen Objektträger (rechts). **(b)** Fluoreszenzaufnahmen des Sphärolithen aus (a) im Probentropfen (links, 300 ms Belichtungszeit) und auf einem Objektträger (rechts, 5 s Belichtungszeit). Die Sphärolithe wurden aus den Tropfen extrahiert, in Puffer (250 mM Tris, 100 mM Magnesiumchlorid, 50 % Glycerin) gewaschen und in einen zweiten Puffertropfen transferiert. Maßstab: 100 μm . **(c)** TEM-Abbildungen des 100-Helixbündels vor den Kristallisationsansätzen (links) und der Lösung, in der der Sphärolith aus (a) zum Lösen inkubiert wurde (Mitte, rechts). Maßstab: 100 nm. **(d)** Abbildung der gelelektrophoretischen Analyse von Sphärolithen, die aus Tropfen mit 3 μM (S1.1, S1.2), 1,5 μM (S2) und 0,6 μM (S3) Probe extrahiert wurden. S1.1, S2 bzw. S3 enthalten Sphärolithe aus Abb. 6.3 a, b, bzw. c. S1.2 entspricht dem Sphärolith aus (a, b). P: PEG-gefällte Probe; sc: einzelsträngiger Templatstrang; M: Monomerbande; Pfeil: Geltaschen.

kristallisierende Probe während der Tropfenequilibration durchschreitet, da mit der Probe auch der Ionengehalt der Kristallisationstropfen aufkonzentriert wird. Da aber eine Mindestmenge an Kationen notwendig ist, um die Struktur der Origami-Objekte zu erhalten, ist eine hohe Ausgangsprobenkonzentration notwendig, um hohe effektive Probenkonzentrationen auch ohne hohe Salzkonzentrationen erreichen zu können.

Die Kombination aus mono- und divalenten Kationen schien außerdem die Bildung von Präzipitat in hochkonzentrierten Proben zu reduzieren. Die Verwendung von Ammoniumsulfat brachte allerdings den Nachteil mit sich, dass pH-Wert und Ionengehalt in den finalen Tropfen nicht kontrollierbar waren. Ansätze mit Pufferstammlösungen als Reservoir, die ausschließlich nicht-volatile Ionen enthalten, sind nächste notwendige Schritte, um den Effekt von Gemischen aus mono- und divalenten Salzen auf stark aufkonzentrierte Probentropfen systematisch zu testen. Die bisherigen Daten legen nahe, dass eine bereits vorkonzentrierte Ausgangslösung in Pufferbedingungen aus mono- und divalenten Kationen durch Dampfdiffusion gegen eine fünf- oder zehnfach konzentrierte Pufferstammlösung in metastabile Konzentrationsbereiche gebracht werden kann, in der die unerwünschte Präzipitation im Vergleich zu Bedingungen, die ausschließlich Magnesiumionen als Kationen enthalten, deutlich unterdrückt ist.

In Bedingungen, die das Polyamin Spermin enthielten, konnten sphärische flüssigkristalline Aggregate erzeugt werden, die laut initialen Fluoreszenz-, TEM, und Elektrophorese-Untersuchungen DNA-Objekte in ungeordneten Aggregaten enthielten. Damit zeigen diese Bedingungen einen ersten Ansatzpunkt auf, bei dem DNA-Origami-Objekte erfolgreich zu geordneten Phasen kondensiert wurden. Insgesamt deuten die Untersuchungen zu den spermin-induzierten Sphärolithen allerdings an, dass die Form und die spezifischen Interaktionen zwischen den DNA-Origami-Objekten für die Kondensation durch das Polyamin keine Rolle spielten. Die spermin-vermittelte Kondensation der Objekte kann daher ebenfalls ein Nachteil für Kristallisationsansätze sein, da die spezifische Ordnung der Partikel möglicherweise von den starken elektrostatischen Anziehungskräften, die das Polyamin vermittelt, überlagert werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Sphärolithe wurden zunächst über einen Zeitraum von 2 Jahren beobachtet. Die beobachtete Aggregation und teilweise Entfaltung der DNA-Objekte in den Sphärolithen kann auf diesen langen Inkubationszeitraum zurückgeführt werden, oder von der Kondensation selbst verursacht sein. Weitere Untersuchungen von kleineren, jedoch weniger gealterten Sphärolithen wären nächste Schritte um dieser Fragestellung weiter nachzugehen.

Kapitel 7

Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit zwei Aspekten, die für die Kristallisation komplexer, mehrsträngiger DNA-Objekte von zentraler Bedeutung sind.

- In den Kapiteln 3 und 4 wurde der Einfluss der Probenheterogenität und der Stärke der Gitterbindungen auf das Kristallwachstum des DNA-Dreiecks als Modellsystem charakterisiert. Die Kristallisationsstudien an diesem vergleichsweise einfachen DNA-Objekt erlaubten es, einige generelle Stellschrauben der durch Watson-Crick-Interaktionen vermittelten Kristallisation zu identifizieren, die auch für die Kristallisation komplexerer DNA-Objekte relevant sein können.
- Kapitel 5 und 6 stellten Methoden vor, mit denen die Herstellung dichter Origami-Lösungen für Kristallisationsansätze möglich ist, und beschrieben erste Experimente zur Kristallisation von gut charakterisierten, kompakten DNA-Objekten. Zwar bildeten sich in diesen Versuchen noch keine Kristalle, aber die Ergebnisse erlauben Rückschlüsse für weitere Kristallisationsansätze und neue Objektdesigns.

Die Einsichten aus beiden Studien werden in diesem Kapitel zusammenhängend betrachtet, in den Kontext bekannter Literatur gestellt und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten diskutiert.

7.1 Einsichten aus den Modellsystemstudien

7.1.1 Vergleichbarkeit der Systeme

Das DNA-Dreieck ist eines von zwei in der Literatur beschriebenen Systemen, die in geplanten Gittergeometrien und ausschließlich auf Basis von Watson-Crick-Interaktionen kristallisieren [18, 47]. Das Dreiecksmotiv bildet sich in verdünnter Lösung aus, in der es unabhängig vom kristallinen Kontext als Monomer vorliegt und über Watson-Crick-Interaktionen mit anderen Dreiecken wechselwirken kann (Abb. 3.2 b) [55]. In dieser Hinsicht ist das DNA-Dreieck von allen bisher bekannten kristallisierenden DNA-Motiven am ehesten mit komplexeren DNA-Objekten wie DNA-Origami-Strukturen vergleichbar, deren Selbstassemblierungsprozess in verdünnten Lösungen mit Konzentrationen im nanomolaren Bereich stattfindet. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen beiden Systemen werden im Folgenden am Beispiel des 42-Helixbündels erläutert.

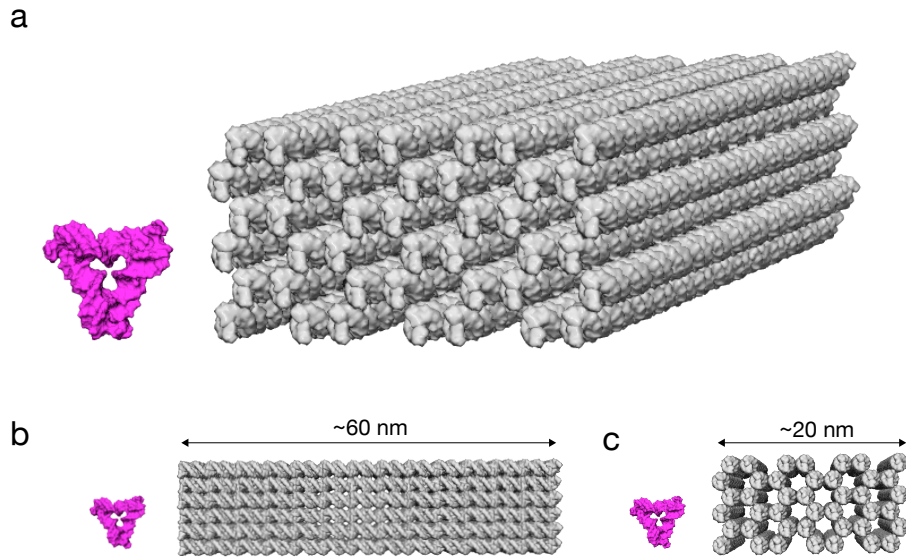


Abbildung 7.1 – Größenvergleich des DNA-Dreiecksmotivs und eines 42-Helixbündels. Maßstabsgetreue Darstellung des CanDo-berechneten 3D-Modells des 42-Helixbündels in Honigwabenpackung [2, 3] in (a) perspektivischer Ansicht, (b) Seitenansicht und (c) Frontansicht, jeweils im Vergleich zum 3D-Modell des DNA-Dreiecks (rot) (3gbi.pdb [18]).

Partikelgröße

Das siebensträngige DNA-Dreieck ist mit einem Molekulargewicht von 38 kDa deutlich kleiner als DNA-Origami-Objekte, die aus etwa 200 kurzen Einzelsträngen und einem langen Templatstrang bestehen und ein Molekulargewicht von etwa 5 MDa aufweisen (Abb. 7.1). Der Raumanspruch eines DNA-Origami-Objekts ist bei dichtester Packung etwa 45 mal so groß wie die Einheitszelle eines Dreieckskristalls, die ein einzelnes Dreieck enthält [18] (vgl. Abb. 5.1). Je nach Form und Kompaktheit der Origami-Struktur kann der Volumenanspruch deutlich größer sein.

Trotz des deutlichen Größenunterschieds zwischen beiden DNA-Objekten finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass ähnliche Parameter für die Kristallisation beider DNA-Motive wichtig sein könnten [16, 66, 72]. Dies deutet sich bereits in der Tatsache an, dass das Dreiecksmotiv ebenfalls für Varianten mit doppelt so langen Seiten kristallisiert [18]. Auch die rhomboedrische Packung der Partikel im Kristallgitter ist nicht auf eine bestimmte Größe beschränkt, sondern ist ebenso typisch für deutlich kleinere Partikel in Salzkristallen wie Kalziumkarbonat oder in metallischen Kristallgittern von Magnesium oder Quecksilber [162] und wurde auch für kristalline Anordnungen von deutlich größeren Gold- und Silikatnanopartikeln realisiert [44, 163]. Qualitative Analogien der Kristallisationsprozesse wurden auch noch für die Kristallisation großer Virenpartikel und kleiner anorganischer Moleküle beschrieben [66].

Allein die Größe der DNA-Origami-Objekte lässt keinen Rückschluss auf ihr Kristallisationsvermögen zu. Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse wurden für Protein- oder Ribonukleotidkomplexe mit ähnlichem Molekulargewicht wie dem der DNA-Origami-Objekte gezüchtet. Hierzu zählen beispielsweise das Proteasom mit 700 kDa [19], der *Vault*-Komplex mit 13 MDa [164, 165] und das Ribosom mit 2,5 MDa [20]. Auch für die erfolgreiche Kris-

tallisation von Viruspartikeln mit 1,5–66 MDa existieren mehrere Beispiele [21, 70, 166, 167]. Der größte in der Literatur beschriebene Viriontyp, der kristallisiert wurde, war ein humanes Adenovirus mit einem Molekulargewicht von 150 MDa [168, 169].

Oberfläche und Partikelinteraktion

Da sowohl das Dreiecksmotiv als auch Origami-Objekte aus DNA bestehen, sind sich deren Oberflächen in ihrer grundsätzlichen chemischen Natur und Polarität sehr ähnlich – beide Partikeltypen benötigen Kationen für die Selbstassemblierung und die Interaktion mit anderen Monomeren findet salzabhängig statt [42, 59].

Auf Grund ihrer Größe sind für die Origami-Objekte auch die negativ geladenen Oberflächen zwischen den zu kristallisierenden Objekten wesentlich größer als im DNA-Dreieck. Die bisher getesteten, kompakten DNA-Origami-Objekte, wie das 42-Helixbündel oder das 100-Helixbündel, wiesen im Vergleich zu anderen denkbaren DNA-Origami-Designs vergleichsweise große Kontaktflächen zwischen den Monomeren auf. Elektrostatische Abstoßungen, aber auch effektive Anziehungskräfte zwischen den Partikeln, die durch mehrwertige Kationen vermittelt werden, sind für diese DNA-Objekte daher vermutlich stärker ausgeprägt, als sie für das DNA-Dreieck beobachtet wurden. Dies zeigte sich beispielsweise in ersten Kristallisationsansätzen mit einer Probe des 42-Helixbündels. In Tropfen, die eine Probenkonzentration von 4 μM enthielten, aggregierte das 42-Helixbündel in Gegenwart von 50 mM Magnesiumchlorid, während Tropfen mit 60 μM DNA-Dreieck auch bei einer Magnesiumchloridkonzentration von 200 mM klar blieben, wenn sie nicht kristallisierten (vgl. Abb. 6.2 vs. Abb. 3.10).

Die Art spezifischer Partikelinteraktionen über Sticky Ends oder Blunt Ends ist wiederum für alle DNA-Objekte gleich und liefert vergleichbare Energiebeiträge pro Helixkontakt. Dieser Zusammenhang wurde beispielsweise durch Einzelmolekülmessungen der Basenpaarstapelenergien in DNA-Origami-Objekten demonstriert, die mit Werten aus Ensemblestudien zu einzelnen Duplexen vergleichbar waren [28, 95, 170].

Fazit. Die Unterschiede zwischen dem DNA-Dreieck als Modellsystem und deutlich komplexeren DNA-Origami-Objekten sind vermutlich zu groß, um spezielle Aspekte der Kristallisationsprozesse, wie die Salzkonzentration, die Zusammensetzung der Kationentypen oder Temperaturbedingungen, von einem auf das andere System zu übertragen. Der Einfluss genereller Aspekte, wie beispielsweise der relativen Stärke der Watson-Crick-Basenpaarinteraktionen oder auch der Gegenwart von potentiellen Störfaktoren auf die Kristallisation, kann mögliche Erklärungsansätze liefern, warum die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten bislang noch nicht erfolgreich war und welche Strategien für weitere Experimente verfolgt werden können.

7.1.2 Erkenntnisse zur Probenpräparation

Probenheterogenität

Selbstassemblierungsreaktionen für DNA-Origami-Objekte enthalten bis zu 200 verschiedene kurze einzelsträngige Klammeroligonukleotide, die in stöchiometrischem Überschuss über einen langen Templatstrang vorliegen. Typische Produkte aus diesen Reaktionsmischungen sind neben korrekt gefalteten DNA-Objekten und überschüssigen Klammeroligonukleotiden auch teilweise gefaltete Objekte sowie Oligomere und Aggregate. Selbst aufgereinigte DNA-

Origami-Objekte könnten daher eine verbleibende Probenheterogenität aufweisen, die die Kristallisation der Objekte möglicherweise stören könnte.

In den Modellsystemstudien zur Kristallisation des DNA-Dreiecks wurde jedoch eine ausgeprägte Robustheit des Kristallisationsprozesses gegenüber Probenheterogenitäten verschiedenster Art beobachtet. Weder die Gegenwart von fehlgefalteten Dreiecken, noch von Nebenprodukten der Assemblierungsreaktion beeinträchtigten den Kristallisationsprozess, solange ausreichend korrekte Dreiecke für die Kristallisation vorhanden waren. Spezies, die nicht mit mehreren Kontakten des Kristallgitters wechselwirken konnten, wurden offensichtlich effektiv aus dem wachsenden Kristall verdrängt (vgl. Abschnitt 4.3). Dieser Effekt ist aus der Literatur bekannt und wurde für andere kristallisierende Systeme aus der organischen Chemie und der Proteinbiochemie als Umkristallisation beschrieben [116,171]. Die Technik der Umkristallisation basiert auf dem Prinzip der Kristallisation einer Zielspezies aus heterogenen Gemischen und wird als Methode zur Erhöhung der Reinheit einer Zielspezies angewendet [172–175]. Andere Studien zeigten darüber hinaus, dass die Kristallisation von Makromolekülen aus massiv heterogenen Lösungen wie einem Zellaufschluss zur Isolation und Aufreinigung von Proteinen genutzt werden kann [176,177].

Der Fokus liegt auf hohen Probenausbeuten. Für die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten legen die geschilderten Resultate nahe, dass die Probenheterogenität, die üblicherweise in der Selbstassemblierungsreaktionsmischung und in aufgereinigten Proben vorliegt, kein Ausschlusskriterium für das Kristallisationsvermögen der Objekte ist. Die Resultate bestätigen außerdem, dass in der Herstellung der DNA-Origami-Objekte vor allen Dingen eine hohe Ausbeute der Zielspezies erstrebenswert ist, um eine kristallisierbare Probe zu erzeugen. Die Optimierung des Strukturdesigns und der Faltungsbedingungen kann hierbei eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Assemblierungsreaktion spielen [2,117,126,132,178,179]. Dies ist beispielsweise für die Faltungsreaktion des optimierten 42-Helixbündels¹ der Fall, die bei optimalen Faltungsbedingungen mehr als 90 % Ausbeute liefert (vgl. Gelspuren mit unaufgereinigten Proben in Abb. 5.4, 5.10). Solche Reaktionsmischungen können mittels PEG-Fällung und Ultrazentrifugation für Kristallisationsansätze mit hochkonzentrierten Probenlösungen verwendet werden, wie in Kapitel 5 beschrieben wurde.

Neue Methoden zur selektiven Aufreinigung. Für strukturell komplexe DNA-Origami-Objekte lässt sich die Bildung von höhermolekularen Aggregaten trotz Optimierung der Designs und der Faltungsprotokolle nicht immer vermeiden (siehe z.B. [132,180]). Für die Kristallisation kann die Aggregatbildung dann zum Problem werden, wenn der Anteil an Aggregaten den Anteil korrekt gefalteter Monomere stark übersteigt. Für komplexe DNA-Origami-Objekte mit hohen Aggregatanteilen werden neue, selektivere Aufreinigungsmethoden, die die Isolation einer Zielspezies erlauben und gleichzeitig hohe Probenausbeuten und auch hohe Probendurchsätze ermöglichen, von besonderem Interesse sein, um ausreichend Material für die Kristallisation erzeugen zu können. Eine vielversprechende Methode in dieser Hinsicht stellt die HPLC-basierte Größenausschlusschromatographie dar, deren Anwendbarkeit erst kürzlich von Floris Engelhardt² und anderen Mitarbeitern der AG Dietz charakterisiert wurde und weiterhin optimiert wird [128]. Die Methoden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit cha-

¹Von dieser Struktur existieren insgesamt 21 Designvarianten, an denen verschiedene Designstrategien getestet und optimiert wurden. Designversion 13 faltet mit den besten Ausbeuten.

²seit 2015 Doktorandin in der AG Dietz

rakterisiert wurden, können die Verdünnung, die mit der Größenausschlusschromatographie einhergeht, kompensieren (vgl. Kapitel 5).

Funktionelle Aufreinigung. In der Literatur finden sich Untersuchungen zu verbleibenden einzelsträngigen Regionen in Origami-Strukturen, die zeigen, dass auch in korrekt gefalteten Monomeren einzelne Klammeroligonukleotide fehlen können, obwohl die Objekte in elektronenmikroskopischen Abbildungen und elektrophoretischen Analysen völlig intakt erscheinen [181]. Die Resultate aus den Modellsystemstudien deuten an, dass sich derartige Formen der Probenheterogenität nicht negativ auf das Kristallisationsvermögen der Objekte auswirken, solange korrekte Gitterkontakte im Kristall ausgebildet werden können. Im Kristallisationsverhalten der DNA-Dreiecke spiegelte sich dies in der Tatsache wider, dass auch DNA-Dreiecke mit geringfügigen Modifikationen alleine kristallisierten, sofern diese weder die Gitterkontakte im Kristall, noch die Gesamtstruktur der DNA-Dreiecke beeinträchtigten. Am schwersten wogen jene Modifikationen, die in die DNA-Dreiecke eingebaut wurden und dort die Ausbildung von Gitterkontakten unter den Dreiecken beeinträchtigten (vgl. Abb. 4.18).

Für die DNA-Origami-Proben lässt sich hieraus schließen, dass beim Design und der Herstellung der Objekte besonders die Intaktheit spezifisch interagierender Regionen gewährleistet werden sollte. Dies kann zum einen durch Designstrategien für definierte formkomplementäre Oberflächenelemente, aber auch durch Verwendung von Klammeroligonukleotiden mit reduzierter chemischer Heterogenität umgesetzt werden, die z.B. mittels HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) aufgereinigt wurden [5,98,128]. Ein weiterer denkbarer Ansatz für die Aussortierung nicht korrekt interagierender Objekte wären neue Aufreinigungsstrategien, die auf der Isolation korrekt interagierender Spezies beruhen [5]. Auch hier ist für die Kristallisation neben der Effektivität der Aufreinigung die Möglichkeit zur Präparation ausreichender Mengen ein wichtiges Kriterium. Die funktionelle Aufreinigung korrekt interagierender Objekte mit Hilfe der Gelextraktion ist beispielsweise zwar möglich, allerdings für die Herstellung ausreichender Mengen, die in Kristallisationsansätzen getestet werden können, nicht praktikabel [5]. Biochemische Aufreinigungsmethoden wie die Affinitätschromatographie, die für Proteine und funktionelle Nukleinsäuren verwendet wird, stellen einen möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung funktioneller Aufreinigungsmethoden für DNA-Origami-Objekte dar [182–184].

Streuvermögen der Kristalle

Das meiste Wissen über das Kristallisationsvermögen von Biomakromolekülen stammt aus dem Feld der Röntgenstrukturanalyse, für die die Bildung von Kristallen ein notwendiger, allerdings nicht hinreichender Schritt zur Strukturauflösung ist [149]. Versuchsparametern, die das Streuvermögen von Kristallen beeinträchtigten, wurde in diesem Zusammenhang oft ein negativer Einfluss auf die Kristallisation an sich zugeschrieben [185–188]. Hier ist allerdings grundsätzlich zwischen dem Kristallisationsvermögen einer Probe und dem Streuvermögen der Kristalle, die sich aus dieser Probe bilden, zu unterscheiden [176].

Kristallisationsvermögen ist nicht gleich Streuvermögen. Besonders für komplexere Systeme, wie beispielsweise das Proteasom, das Ribosom oder den *Vault*-Komplex, finden sich in der Literatur frühe Veröffentlichungen, die zwar die Kristallisation, nicht jedoch die hochauflösende Struktur der Proteinkomplexe beschreiben [20, 189, 190]. Erst die Optimierung der Kristallreinheit, vor allem aber die Optimierung der Probenqualität führten in diesen Bei-

spielen letztendlich zu Kristallen mit hohem Streuvermögen [19, 72, 168, 191, 192]. Auch die Studien zur Kristallisation von Lysozym und Antikörpern aus heterogenen Gemischen machen deutlich, dass die Wachstumskinetiken in heterogenen Probengemischen verändert sein können und sich die so erhaltenen Kristalle nicht für die Strukturanalyse eignen [187, 188]. Die initialen Tests zum Streuvermögen der heterogen zusammengesetzten Dreieckskristalle, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, deuten nur für Mischungen mit geometrisch veränderten Dreiecken an, dass das Streuvermögen von Kristallen durch den Einbau der veränderten Dreiecke negativ beeinflusst werden könnte (vgl. Abb. 4.8).

Die Optimierung der Probenqualität bleibt weiterhin wichtig. Für das Ziel, hochauflösende Informationen über die Struktur der DNA-Origami-Objekte zu erhalten, bleibt es daher von zentraler Bedeutung, die Herstellung und das Strukturdesign der zu kristallisierenden Objekte weiterhin kontinuierlich zu verbessern. Die Beispiele aus der Literatur zeigen jedoch, dass die Kristallisation der Proben auch mit suboptimalen Probenbeschaffenheiten möglich war und dass ausgehend von Protokollen, die erfolgreich zur Kristallisation der Zielspezies führten, weitere Optimierungen der Probenbeschaffenheit und der Kristallisationskinetiken schlussendlich dann das Streuvermögen verbessern konnten [149, 186].

Die Stabilität der DNA-Objekte ist möglicherweise von Vorteil. Erfahrungswerte der Röntgenstrukturanalyse zeigen, dass selbst makroskopisch makellose Kristalle in einigen Fällen nicht strukturiert genug sind, um mittels Röntgenstreuung analysiert zu werden [149]. Die hohe Designkontrolle über die Form und Funktionalität von Origami-Objekten, sowie ihre Stabilität gegenüber Hitze, Pufferbedingungen und Additiven lassen vermuten, dass im Vergleich zu Proteinkristallen deutlich mehr Möglichkeiten existieren, suboptimale Partikelarrangements eines Kristallgitters zu optimieren, oder die Kristallqualität über veränderte Wachstumskinetiken zu beeinflussen [149]. Im Ansatz zeigte sich dies auch schon in den Experimenten in Abschnitt 3.5.3, in denen sich die DNA-Dreieckskristalle schmelzen und wieder kristallisieren ließen.

Menge und Konzentration der Proben

Die Versuchsreihen zu verschiedenen heterogenen Probengemischen spiegelten auch das konzentrationsabhängige Kristallisationsverhalten des DNA-Dreiecks wider. Hier zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Robustheit gegenüber Probenheterogenitäten und der Konzentration an korrekt interagierenden Dreiecken. Mit allen untersuchten Modifikationen bildeten sich in den heterogenen Gemischen Kristalle in Gegenwart von 10 % Anteil an modifizierten Strängen. In diesen Gemischen lag in den equilibrierten Tropfen mit einer Konzentration von $54 \mu\text{M}$ originalen Dreiecken ausreichend Material für die Kristallisation vor. Auch in Gemischen, die Material für $30 \mu\text{M}$ DNA-Dreiecke enthielten, konnte die Kristallisation nur von Modifikationen inhibiert werden, die die effektive Konzentration originaler Dreiecke verringerten, sodass in diesen Mischungen weniger als $30 \mu\text{M}$ originale Dreiecke vorlagen.

Absolute Probenkonzentration. Die Probenkonzentration, bei der das DNA-Dreieck kristallisierte, ist im Vergleich zu Kristallisationsansätzen mit ähnlich großen DNA-Motiven oder Proteinen relativ gering (Tabelle 7.1). Die Konzentrationsanforderungen für Origami-Proben können auf Grund des deutlich größeren Volumens der Objekte vermutlich nicht direkt von

den Modellsystemstudien übernommen werden (siehe Abb. 5.1). In Kapitel 5 wurde die Maximalkonzentration kompakter DNA-Origami-Lösungen wie dem 42-Helixbündel empirisch durch die Lösungsgrenze bei etwa $5\text{--}6\ \mu\text{M}$ bestimmt (Abb. 5.7). Erste Kristallisationsansätze mit derart konzentrierten Proben zeigten, dass die Präzipitationszone mit diesen Proben bereits erreicht wurde. Für Makromoleküle mit ähnlichem Molekulargewicht finden sich in der Literatur vergleichbare Probenkonzentrationen, mit denen Kristalle gezüchtet werden konnten (Tabelle 7.1). Diese Aspekte legen nahe, dass der getestete Konzentrationsbereich in der richtigen Größenordnung liegen könnte. Falls nötig, könnten durch Verwendung von Reservoirösungen mit hohem Salz- und Puffergehalt noch höhere Probenkonzentrationen erzeugt werden (vgl. Abb. 6.2).

Ein weiterer Fokus liegt auf hohen Probenmengen. Auf Grund des Bedarfs für hochkonzentrierte Probenlösungen liegt, neben der Optimierung der Faltungsausbeuten (siehe Abschnitt 7.1.2), ein weiterer Schwerpunkt in der Probenpräparation auf der Herstellung größerer Probenmengen, aus denen die hochkonzentrierten Origami-Lösungen erzeugt werden können. In Proben mit hoher Gesamtkonzentration liegen dann auch automatisch mehr korrekt interagierende Objekte vor. Die selektive Aufreinigung von Origami-Proben und die damit oft einhergehenden hohen Probenverluste wären mit größeren Ausgangsmengen ebenfalls eine geringere Hürde für die Probenvorbereitung. Durch die Optimierung der biotechnologischen Produktion des einzelsträngigen Templatstrangs ist die Herstellung vergleichsweise größerer Mengen an DNA-Origami-Objekten in Volumenmaßstäben von $10\text{--}50\ \text{ml}$ überhaupt erst möglich. Die chemisch synthetisierten Klammeroligonukleotide bleiben damit der limitierende Faktor für die Herstellung deutlich größerer Mengen an DNA-Origami-Proben [128]. Eine Studie mit ähnlichem Umfang wie die in dieser Arbeit vorgestellte Modellsystemstudie des DNA-Dreiecks würde beispielsweise für DNA-Origami-Proben, je nach eingesetzter Konzentration, die Herstellung und Handhabung von $0,8\text{--}2\ \text{L}$ Litern Faltungsansatz erfordern³. Die Handhabung dieser Probenvolumina wäre mit den Methoden der PEG-Fällung und anschließender Ultrazentrifugation möglich, würde aber dem $7\text{--}40$ -fachen Material einer typischen DNA-Syntheseausbeute entsprechen⁴.

7.1.3 Einsichten für Designs weiterer DNA-Origami-Strukturen

Die bisherigen Kristallisationsexperimente wurden mit kompakten, quaderförmigen DNA-Origami-Objekten durchgeführt, die eine vergleichsweise hohe Steifigkeit und große Kontaktflächen aufwiesen. Die Resultate der Experimente machen deutlich, dass die hohe Konzentration der Origami-Proben alleine nicht ausreichte, um eine Kristallisation der Partikel herbeizuführen. Es ist möglich, dass die Probenqualität oder die getesteten Pufferzusammensetzungen in den Versuchen nicht den notwendigen Kristallisationsbedingungen entsprachen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das Design der getesteten Objekte für die Kristallisation nicht geeignet war. Aus den Modellsystemstudien des DNA-Dreiecks ergaben sich

³Für die Modellsystemstudie wurden insgesamt ca. $0,4\ \mu\text{mol}$ DNA-Dreieck verbraucht. Die Volumenangaben beziehen sich auf eine Probenkonzentration $50\ \text{nM}$ DNA-Origami-Objekt und auf die Annahme, dass für DNA-Origami auf Grund geringerer Konzentrationsanforderungen nur $10\text{--}25\ \%$ dieser Stoffmenge ($0,04\text{--}0,1\ \mu\text{mol}$) verbraucht würde.

⁴Die Abschätzung bezieht sich auf durchschnittliche Syntheseausbeuten für Oligonukleotide mit einer Länge von $35\text{--}50$ Basen, die von der Firma Eurofins Genomics GmbH für einen Synthesemaßstab von $0,01\ \mu\text{mol}$ CPG(*controlled pore glass*)-Material geliefert werden.

Tabelle 7.1 – Probenkonzentrationen für die Kristallisation einiger Beispiele aus der Literatur. M_W : Molekulargewicht, Konz.: Probenkonzentration in den equilibrierten Tropfen; Abkürzungen: DNAzym: katalytisch aktive DNA; tRNA_{Phe}: Transfer-RNA mit Spezifität für das Phenylalanin-Codon; eGFP: grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*); BSA: Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*); STMV: Tabak-Mosaik-Satelliten-Virus (*satellite tobacco mosaic virus*); prok.: prokaryotisch; euk.: eukaryotisch; BPMV: *bean pod mottle virus*; CPMV: *cowpea mosaic virus*; BBV: *black beetle virus*.

	M_W [Da]	Konz. [mg/ml]	Konz. [μ M]	Referenz
10-mer (ssDNA)	$3 \cdot 10^3$	3	1000	[193]
13-mer (ssDNA)	$4 \cdot 10^3$	2,4	400	[61]
10bp-Duplex	$6,5 \cdot 10^3$	6,5	1000	[194]
Lysozym	$14,3 \cdot 10^3$	5–50	350–3500	[187]
DNAzym-RNA-Komplex	$26 \cdot 10^3$	10	400	[195]
tRNA _{Phe}	$25 \cdot 10^3$	6	240	[86]
DNA-Dreieck	$38 \cdot 10^3$	0,23–23	20–60	Kap. 3.1.2, [18]
eGFP	$27 \cdot 10^3$	13	400	[196]
BSA	$66 \cdot 10^3$	40–120	600–1800	[91]
Proteasom	$0,75 \cdot 10^6$	80	100	[19]
STMV	$1,5 \cdot 10^6$	0,5–15	0,33–10	[70]
prok. Ribosom	$2,5 \cdot 10^6$	15	6	[20]
euk. Ribosom	$3,3 \cdot 10^6$	5	1,5	[197]
BPMV	$4 \cdot 10^6$	15	6	[21]
CPMV	$4 \cdot 10^6$	20–35	5–8	[21, 166]
BBV	$4 \cdot 10^6$	8	1	[21]
Vault-Komplex	$13 \cdot 10^6$	5–40	0,4–3,2	[164, 190]
Bakteriophage PRD1	$66 \cdot 10^6$	7–10	0,1–0,15	[167]
humanes Adenovirus	$150 \cdot 10^6$	5–10	0,03–0,06	[168]

einige Ansätze für das Design neuer Objekte, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

Flexibilität der Objekte

In Kristallisationsansätzen mit geometrisch veränderten DNA-Dreiecken zeigte das Modellsystem eine hohe Toleranz gegenüber Dreiecken mit längeren und kürzeren Seiten. Die modifizierten Dreiecke wurden trotz ihrer veränderten Form zu hohen Anteilen in die wachsenden Kristallgitter integriert. Einige geometrisch veränderte Dreiecke kristallisierten sogar auch alleine, wohingegen andere Dreiecke zu stark verformt waren, um alleine Kristalle zu bilden (Abb. 4.6, 4.7). Aus diesen Beobachtungen lassen sich zwei Schlüsse ziehen: zum einen legen die Resultate nahe, dass eine intrinsische Flexibilität der zu kristallisierenden Objekte hilfreich sein kann, um Verspannungen, die durch den Einbau geometrisch veränderter Objekte entstehen, zu kompensieren. Im Dreiecksmotiv wird dies durch die Flexibilität der drei ineinander verschränkten Holliday-Kreuzungen erreicht [48]. Zum anderen zeigte sich in den Experimenten auch, dass geometrisch inkompatible Dreiecke trotz der intrinsischen Flexibilität nicht alleine kristallisierten, obwohl sie sich mit hoher Ausbeute bildeten und intakte Sticky Ends aufwiesen.

Flexible Strukturelemente für neue Designs. Eine mögliche Ursache, warum die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten bislang nicht erfolgreich war, könnte in der Form der bisher getesteten Objekte liegen. Die kompakten, quaderförmigen Designs wirken zwar zunächst ideal stapelbar, bereits leichte Abweichungen von der geplanten Form könnten sich allerdings über ein dreidimensionales Gitter aufsummieren und die Bildung von Kristallen verhindern. Beispielsweise sind Strukturen mit rechtwinkliger Packung global leicht in sich verdreht, was die Stapelung der Objekte in dreidimensionalen Gittern erschweren könnte (Abb. 6.1) [39]. Auch Objekte im Honigwabendesign, für die häufig näherungsweise angenommen wird, dass sie frei von globalen Verdrehungen sind, können minimale Verdrehungen aufweisen, die sich in größeren Gittern aufsummieren könnten. Ähnlich wie im DNA-Dreieck würden flexible Elemente in den Origami-Objekten helfen, Abweichungen von der idealen geometrischen Form zu kompensieren. Andere Experimente mit DNA-Dreiecken, die einzelsträngige Kernregionen enthielten, deuten aber auch an, dass zu flexible Regionen die Kristallisation ebenfalls beeinträchtigen könnten (vgl. Abb. 4.3). Die Architektur des in sich verschränkten Dreiecksmotivs kann hier einen möglichen Ansatzpunkt für komplexere Designs liefern. Ein Beispiel für ein komplexeres Dreiecksmotiv ist das *DX-Triangle*, das aus zwei Doppelhelixdomänen pro Seitenfläche besteht. Bislang finden sich in der Literatur allerdings nur Hinweise auf zweidimensionale Netzwerke mit einer Reichweite von mehreren 100 nm [198].

Kompensation durch geometrische Spiegelbilder? Ein weiterer Aspekt, der sich aus der Modellsystemstudie ergab, betrifft die Tatsache, dass Gemische aus originalen und geometrisch veränderten Dreiecken heterogen zusammengesetzte Kristalle ausbilden können. Diese Resultate deuten an, dass eine mögliche Strategie, die Kristallisation eines geometrisch suboptimalen Objekts zu erreichen, darin bestehen könnte, es mit einem zweiten Objekt kookristallisieren, das Verspannungen kompensiert, die durch das Zielobjekt verursacht werden. Ein vergleichbarer Ansatz wird beispielsweise in der razemischen Kristallographie verfolgt, in der die Zugabe von synthetischen, enantiomeren Proteinen oder DNA-Molekülen genutzt wird, um günstigere Raumgruppenanordnungen zu erreichen [199, 200]. Die Herstellung von

linkshändigen Duplexen aus ausschließlich synthetischen DNA-Strängen und auch das Design pseudoenantiomerer Paare aus rechtshändigen DNA-Origami-Strukturen, die sich zueinander wie Spiegelbilder verhalten, ist grundsätzlich möglich. Diese Ansätze könnten dazu beitragen, eine kristalline Raumgruppenanordnung für DNA-Origami-Objekte möglich zu machen. Allerdings würden diese Strategien eine große Spannbreite neuer zu testender Parameter in die Experimente einbringen.

Rotationssymmetrie der Objekte

In der Originalpublikation zur Kristallisation des DNA-Dreiecks erwähnten Zheng *et al.*, dass das Streuvermögen der Dreieckskristalle deutlich abnahm, wenn anstelle der dreifach rotationssymmetrischen Dreiecke Varianten mit unterschiedlichen Sticky Ends kristallisiert wurden [18]. Umsortierungsvorgänge, die während der Kristallisation vermutlich notwendig sind, sind für Dreiecke mit unterschiedlichen Sticky Ends deutlich aufwändiger, da rotationsymmetrische Dreiecke ihre Position weniger oft verändern müssen, bis sie optimal passen. Möglicherweise ist die Rotationssymmetrie also ein weiterer Aspekt des Dreiecksmotivs, der sein robustes Kristallwachstum erklärt. Die Erleichterung von Umsortierungsvorgängen steht wiederum in direktem Zusammenhang zur Interaktionsstärke zwischen den Partikeln, die im nächsten Abschnitt näher diskutiert wird. Die Rotationssymmetrie des Dreiecks wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Im Vergleich zu anderen kristallisierten Biomakromolekülen im Megadaltonbereich fällt jedoch auf, dass einige Objekte, wie beispielsweise Viruscapside, oder die *Vault*-Komplexe, eine ausgeprägte Rotationssymmetrie aufwiesen (Tabelle 7.1).

Interaktionsstärke

Die Veränderung der Interaktionsstärken zwischen den DNA-Dreiecken hatte einen starken Einfluss auf das Kristallisationsvermögen des Modellsystems. In den Experimenten zeigte sich deutlich, dass zu schwache und auch zu starke Basenpaarstapelenergiebeiträge der benachbarten Basen zum Sticky End die Kristallisation des Dreiecks hemmen konnten, obwohl die Dreiecke in hohen Konzentrationen vorlagen und dieselbe dreidimensionale Form wie das originale Dreieck hatten. Günstige und ungünstige Energiebeiträge durch die Nachbarbasenpaare unterschieden sich hier nur in wenigen Einheiten thermischer Energie pro Helixkontakt (vgl. Abb. 3.8).

Schwache spezifische Interaktionen. Für die Kristallisation von DNA-Origami ist es daher vermutlich ratsam, deutlich geringere Interaktionsstärken zu implementieren, als die üblichen mehrsträngigen Sticky-End-Kontakte, die für die 1D- oder 2D-Polymerisierung von Origami-Objekten verwendet werden [201]. Formkomplementäre Oberflächenelemente, die ausschließlich über Basenpaarstapelwechselwirkungen interagieren, sind vielversprechende Designelemente für die Erzeugung dynamischer Interaktionen, die ausreichend Spielraum für vermutlich notwendige Umorganisationsvorgänge während des Kristallwachstums lassen könnten [16, 42].

In der Literatur finden sich Experimente, in denen die freien Grenzflächenenergien zwischen dem Kristall und der Gesamtlösung für einige Proteine und Viruspartikel bestimmt wurden. Die ermittelten Werte lagen sowohl für kleine Proteine wie Lysozym als auch für deutlich größere Tabakmosaik-Satelliten-Viren in einem vergleichbaren Bereich von 3,3–9,2 kJ/mol⁵ [16, 67, 69, 70, 202] (vgl. Tabelle 7.1). Diese Studien lassen vermuten, dass günstige

⁵Dies entspricht einer Oberflächenenergie von 1,3–3,7 kT pro Molekül.

Interaktionsstärken für die Kristallisation der DNA-Origami-Objekte in der gleichen Größenordnung liegen könnten wie die günstigen Interaktionsstärken, die für das deutlich kleinere DNA-Dreieck ermittelt wurden. Die tatsächliche Differenz der freien Energie für den Einbau eines Objekts in das Kristallgitter hängt allerdings wiederum von der Probenkonzentration, den Pufferbedingungen und entropischen Kosten für die Ausbildung des Gitters ab [16].

Noch schwächere unspezifische Interaktionen. Eine weitere Ursache für zu starke Partikelinteraktionen sind unspezifische Wechselwirkungen, die beispielsweise in Gegenwart von divalenten Kationen über große Kontaktflächen vermittelt werden können. Insbesondere jene Seitenflächen, die aus Helixenden bestehen, können durch Basenpaarstapelwechselwirkungen und unspezifische Basenpaarung zu ungünstigen Interaktionen beitragen. Für die bisher getesteten DNA-Origami-Objekte ist es wahrscheinlich, dass die Interaktionsstärken zwischen den Partikeln zu stark waren, um die Umorganisation zu kristallinen Anordnungen zu ermöglichen. Wie in den Versuchen mit den DNA-Dreiecken wäre dann die Kristallisation inhibiert, selbst wenn die geometrische Form und Konzentration korrekt interagierender Objekte bereits ausgereicht hätte, um ein Kristallgitter zu erzeugen. Ein Hinweis auf starke Partikelinteraktionen ist beispielsweise die Trübung und Viskosität, die für DNA-Origami-Lösungen mit Konzentrationen $> 5\text{--}6\ \mu\text{M}$ beobachtet wurde (vgl. Abb. 5.7 d).

Oberflächenengineering. Neben dicht gepackten Strukturdesigns, wie in den bisher getesteten Origami-Objekten, ermöglicht die Designvielfalt, die die DNA-Origami-Technik mit sich bringt, auch die Konstruktion von Objekten mit deutlich kleineren Kontaktflächen und in der Struktur verborgenen Helixenden [9, 203]. Neben der Reduktion unspezifischer Interaktionen hat das Verbergen der Helixenden den Vorteil, dass die Duplexenden nicht durch Polythymine-Überhänge oder Templatstrangschlaufen passiviert werden müssen. Diese flexiblen Strukturelemente weisen auf Grund der vielen Rotationsfreiheitsgrade in den einzelsträngigen Überhängen in Lösung ein hohes Maß an Entropie auf. In einem Kristallgitter, in dem die passivierten Seitenflächen zweier benachbarter Objekte in Kontakt treten würden, könnten diese Freiheitsgrade auf Grund spezifischer Interaktionen zwischen den Einzelstrangüberhängen eingeschränkt sein. Die entropischen Kosten für den Einbau eines Objekts mit verborgenen Helixenden könnten daher deutlich geringer sein als für Objekte, die große Querschnittsflächen mit Einzelstrangüberhängen an den Helixenden aufweisen [71, 149, 204, 205]. Ein weiterer denkbarer Ansatz für die rationale Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der DNA-Origami-Objekte wäre die Verwendung von Peptid-Nukleinsäuren (PNA) [206] oder von Nukleinsäuren mit alkyliertem Phosphatrückgrat [207], mit deren Hilfe sich die Ladungsdichte und -verteilung auf den Oberflächen der DNA-Origami-Objekte verändern ließe.

Pufferscreenings könnten hilfreich sein. Ein weiterer Aspekt, den die Experimente zur Interaktionsstärke des Modellsystems zeigten, war, dass in einem anderen Puffersystem noch weitere Sticky-End-Varianten kristallisierten, die zunächst zu stark oder zu schwach für die Kristallisation im ersten Puffer waren (vgl. Kapitel 3.5.2). Für die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten könnte dies möglicherweise bedeuten, dass ein extensives Screening von Pufferzusammensetzungen hilfreich sein könnte, geeignete Bedingungen und Designs zu identifizieren, in denen attraktive und abstoßende Partikelinteraktionen im richtigen Gleichgewicht sind.

Zusammenfassung

Insgesamt wurde in den Modellsystemstudien des DNA-Dreiecks eine Reihe an Faktoren identifiziert, die auch für die Kristallisation von DNA-Origami-Objekten von Bedeutung sein könnten. Mögliche Probenheterogenitäten der Selbstassemblierungsreaktionsmischung, fehlerhafte Strangstöchiometrien und Verunreinigungen in den Kristallisationsansätzen zeigten sich als vergleichsweise unproblematische Faktoren für das Kristallisationsvermögen. Die Resultate machten deutlich, dass stattdessen die geometrische Kompatibilität, schwache Interaktionen zwischen den Partikeln und hohe Probenkonzentrationen entscheidende Kriterien für das Kristallisationsvermögen eines DNA-Objekts sind. Diese Ergebnisse werden durch andere Arbeiten in der Literatur bestätigt, die die Kristallisation von Proteinen, Viruspartikeln oder Makromolekülen im Allgemeinen beschreiben [16, 71].



Abbildung 7.2 – Graphische Zusammenfassung wichtiger Kriterien für das Kristallisationsvermögen eines DNA-Objekts.

Das DNA-Dreieck zeigte außerdem einige Strukturprinzipien, die möglicherweise günstig für die Kristallisation sind – hierzu zählen die intrinsische Flexibilität und die Rotations-symmetrie des Dreiecks, aber auch seine kleinen Kontaktflächen und die geometrische Kompatibilität mit dem Gittersystem. Diese Aspekte können beim Design neuer DNA-Origami-Strukturen Berücksichtigung finden. In weiterführenden Projekten, die derzeit von Floris Engelhardt⁶ und Dr. Thomas Gerling⁷ verfolgt werden, wird ein Teil der hier erlangten Einsichten bereits umgesetzt.

7.2 Herstellung und Kristallisation von DNA-Origami-Proben

Mit Hilfe der Erkenntnisse aus den Modellsystemstudien und den ersten Kristallisationsansätzen lassen sich mehrere mögliche Gründe finden, warum die Kristallisation bisher getesteter DNA-Origami-Objekte nicht erfolgreich war:

- **Die Probenqualität war nicht ausreichend.** Die getesteten Objekte wurden mittels PEG-Fällung aufgereinigt und aufkonzentriert und enthielten Rückstände von PEG-8000-Polymeren und zum Teil Aggregate (vgl. Abb. 5.5, Abb. 6.4).
- **Die bisher getesteten Pufferbedingungen waren noch nicht ideal.** Die Daten deuten an, dass Kombinationen aus mono- und divalenten Kationen noch näher untersucht werden müssen (vgl. Abb. 6.2). Ansätze mit monovalenten Kationen könnten

⁶ seit 2015 Doktorandin in der AG Dietz

⁷ 2010-2015 Doktorand in der AG Dietz, seit 2016 Postdoc in der AG Dietz

die Ladung der DNA-Objekte abschirmen, ohne effektive Anziehungskräfte zwischen DNA-Objekten zu ermöglichen, und sind für weitere Ansätze ebenfalls vielversprechende Ausgangsbedingungen [208, 209].

- **Die Geometrie der Objekte war nicht kompatibel für ein dreidimensionales Kristallgitter.** Bereits leichte Abweichungen von der geplanten Form könnten in den getesteten Objekten die Ursache dafür sein, dass sich Verdrehungen über größere Gitter aufsummieren [39].
- **Die Interaktionen zwischen den Partikeln waren zu stark.** Die Objekte wiesen große Kontaktflächen und Seitenflächen mit einzelsträngigen Überhängen an den Helixenden auf. Die Kristallisationsansätze blieben entweder klar oder zeigten Präzipitatbildung (vgl. Abb. 6.2). Hochkonzentrierte Probenlösungen hatten eine gelartige Konsistenz, was auf starke Partikelinteraktionen hindeutet (vgl. Abb. 5.7).

Dank kontinuierlicher Fortschritte in der Probenaufreinigung [128], der Charakterisierung der Partikelinteraktionen [28] und neuen Ansätzen für Strukturdesigns [42] können diese möglichen Ursachen in weiteren Kristallisationsansätzen adressiert werden.

Weitere Kristallisationsansätze brauchen systematischeres Vorgehen. Die grundsätzliche Herausforderung der Kristallisationsstudien ist hierbei, aus den Misserfolgen der Experimente die richtigen Schlüsse zu ziehen. Solange eine bestimmte getestete Bedingung nicht zum erwünschten Kristallisationsereignis führt, lässt sich aus den Tropfen nur schwer schließen, ob die getestete Bedingung im Vergleich zu einer anderen, in der ebenfalls keine Kristalle wuchsen, günstiger oder ungünstiger ist. Die große Anzahl an möglichen Parametern, die zu testen sinnvoll erscheint, sowie die vergleichsweise geringe Probenmenge, die für Kristallisationsansätze zur Verfügung steht, erschweren zusätzlich die systematische Charakterisierung des Phasenraums, der für jedes einzelne Strukturdesign individuell sein dürfte. Typische Probleme, die sich rückblickend bei der Auswertung der bisherigen Experimente zeigten, waren schwankende Probenkonzentrationen in den Platten, schwer abzuschätzende effektive Probenkonzentrationen in Bedingungen mit Reservoirlösungen aus Ammoniumsulfat, keine oder wenige identische Tropfen pro Probe, die eine Einschätzung der Stochastik des beobachteten Ereignisses erlauben würden, und das Fehlen ausreichend gleicher Pufferbedingungen für verschiedene DNA-Origami-Strukturen. Da bei keiner der getesteten Bedingungen ein Kristallisationsereignis stattfand, ist der Gesamtvergleich der getesteten Konditionen im Nachhinein schwierig. Für weitere Kristallisationsansätze wäre die Berücksichtigung dieser Aspekte möglicherweise hilfreich. Besonders für Versuche mit mehreren neuen Strukturdesigns, die die Erkenntnisse aus den Modellsystemstudien in verschiedenen Designstrategien umsetzen, wird der Vergleich mehrerer Kristallplatten notwendig sein, um die Auswirkungen der Probendesigns im Vergleich untereinander bewerten zu können. Die Anzahl an Versuchsbedingungen wird dann schlicht zu groß um weiterhin auf zufällige Treffer zu hoffen.

Kontrolle über die effektive Probenkonzentration. Eine systematischere Strategie für das Ansetzen weiterer Kristallplatten beinhaltet zunächst die Verwendung von Pufferstammlösungen, die eine korrekte Abschätzung der effektiven Probenkonzentration und Pufferzusammensetzung in den equilibrierten Tropfen erlauben. In den Kristallisationsansätzen mit DNA-Dreiecken konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die Verwendung einer zehnfachen Stammlösung eine effektive Volumenreduktion der Probentropfen erzeugt. Im Gegensatz zu

den Versuchen mit Reservoirlösungen aus Ammoniumsulfat könnten dann Tropfen mit unterschiedlichen Salzgehalten auf das gleiche Endvolumen eingestellt und besser verglichen werden (vgl. Abb. 3.2, Abb. 6.2). Trotzdem bringt auch diese Aufkonzentrationsstrategie den Nachteil mit sich, dass die effektive Konzentration an Pufferkomponenten eventuell zu hoch wird. Für die Stabilität der Objekte ist eine Ausgangskonzentration von mindestens 5 mM Magnesiumchlorid notwendig. Komplexere Oligomere könnten sogar höhere Konzentrationen an Magnesiumionen benötigen, um ihre Struktur zu erhalten [42]. Wenn die Probenkonzentration in solchen Fällen so niedrig ist, dass eine zehnfache Aufkonzentration notwendig wird, kann die Nukleationszone möglicherweise nicht mehr erreicht werden, weil nach der Tropfenequilibration ein zu hoher Magnesiumionengehalt vorliegen würde. Große Probenmengen sind der Schlüssel zu einer großen Flexibilität bezüglich rational angesetzter Kristallisationsbedingungen, die untereinander gut vergleichbar sind.

Phasendiagramme könnten den Vergleich verschiedener Ansätze erleichtern. Der Zusammenhang zwischen Probenkonzentration und Pufferzusammensetzung lässt sich am besten in Phasendiagrammen erfassen, die helfen könnten, die Trends eines bestimmten Parameters wie beispielsweise der Konzentration von Magnesiumchlorid oder Spermin in Abhängigkeit von der Probenkonzentration zu erkennen und darzustellen. Die graphische Zusammenfassung der Experimente würde ihre Vergleichbarkeit verbessern und könnte helfen, interessante Datenlücken in den Versuchen zu identifizieren. Die Ansätze, die in Kapitel 6 für das 42-Helixbündel und das 100-Helixbündel vorgestellt wurden, wurden jeweils für mehrere Probenkonzentrationen und steigende Magnesiumchlorid- bzw. Sperminkonzentrationen angesetzt. Diese wenigen Datenpunkte erlauben die Erstellung vorläufiger Phasendiagramme, die veranschaulichen können, wie die graphische Darstellung der Experimente die Auswertung der Versuche erleichtern kann. Beispielsweise zeigt sich im Vergleich der beiden Phasendiagramme direkt, dass die durch Magnesiumionen vermittelte Präzipitatbildung von der Probenkonzentration abhängt, während die Effekte der sperminhaltigen Tropfen hauptsächlich von der Konzentration des Spermins abzuhängen scheinen. Die initialen Darstellungen zeigen ebenfalls, dass deutlich mehr Datenpunkte notwendig wären, um die Grenzen der Probenlöslichkeit abzustecken (Abb. 7.3).

Kartierung der thermodynamischen Voraussetzung für die Kristallisation. Die Erstellung von Phasendiagrammen aus den Experimenten könnte bei der Kartierung und Identifizierung thermodynamisch günstiger Probenbedingungen helfen. Selbst unter thermodynamisch günstigen Bedingungen ist letztendlich allerdings die Kinetik des Kristallisationsprozesses entscheidend für das Kristallisationsvermögen eines Objekts. Die Kinetik der Kristallisation kann durch unterschiedliche Objekt designs, aber auch durch unterschiedliche Durchführungen gleicher Kristallisationsansätze beeinflusst werden – Beispiele hierfür sind *Hanging-Drop*-Ansätze, andere Temperaturbedingungen oder die Verwendung von Nukleationskeimen [149]. Die Phasendiagramme könnten helfen, ein Raster zu entwickeln, das auf eine größere Strukturbibliothek systematisch angewendet werden kann und dann auch die Vergleichbarkeit der Strukturen untereinander ermöglicht.

Systematischeres Vorgehen ist nur mit großen Probenmengen möglich. Es ist offensichtlich, dass die systematischere Durchführung von Kristallisationsansätzen mit mehreren identischen Tropfen pro Bedingung, mit verschiedenen Probenkonzentrationen, verschiedenen Struktur designs, eng abgesteckten Konzentrationen eines Additivs und verschiedenen Inkubations-

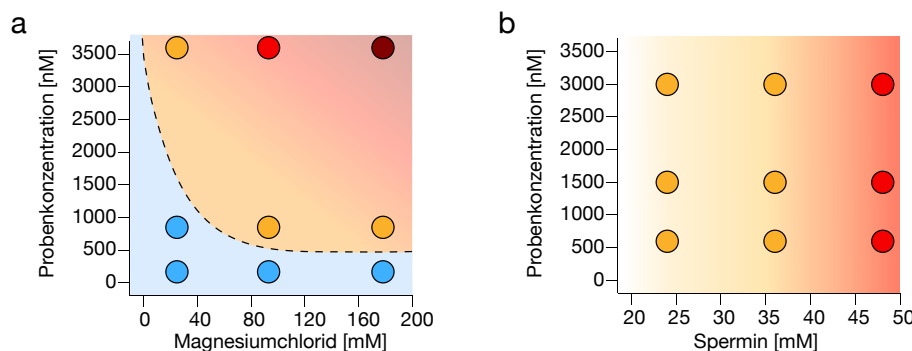


Abbildung 7.3 – Schematische Darstellung von Phasendiagrammen aus den Kristallisationsansätzen in Abb. 6.2 und 6.3. Die Graphen zeigen die abgeschätzten effektiven Konzentrationen der Probe und der Additive. **(a)** Auswirkung steigender Magnesiumchloridkonzentrationen auf die Präzipitation des 42-Helixbündels. Farbkodierungen markieren den Aggregatzustand in den equilibrierten Tropfen: blau: in Lösung; orange, rot bzw. dunkelrot: leichte, starke, bzw. sehr starke Präzipitatbildung. **(b)** Auswirkung steigender Sperminkonzentrationen auf die Bildung von Sphärolithen aus Proben des 100-Helixbündels. Orange: Sphärolithe; rot: Präzipitatbildung. Die Einfärbung des Hintergrunds dient der Visualisierung möglicher Löslichkeitsverläufe, die mit Hilfe von weiteren Datenpunkten aus den Phasendiagrammen ermittelt werden könnten.

bedingungen hohe Probenmengen erfordern würde (siehe auch Abschnitt 7.1.2). Ideal für die Vergleichbarkeit eines bestimmten Strukturdesigns bei verschiedenen Bedingungen wären mehrere Ansätze aus ein und derselben Ausgangsprobe. Die Stabilität der DNA-Origami-Objekte ist hierbei eine vorteilhafte Eigenschaft, da größere Mengen aufgereinigter DNA-Objekte, im Gegensatz zu den meisten Proteinen, durchaus über längere Zeiträume auf Vorrat gehalten werden können.

7.3 Kristallisationsstudien mit dem DNA-Dreieck

Das Kristallisationsverhalten des DNA-Dreiecks wurde in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner Konzentrationsabhängigkeit, seiner Anfälligkeit für Probenheterogenitäten und -verunreinigungen und hinsichtlich der Stärke der Watson-Crick-Basenpaarinteraktion untersucht. Hierbei verhielt sich das Modellsystem höchst reproduzierbar, sodass die zuverlässige Auswertung des Kristallisationsereignisses in Abhängigkeit von veränderten Ausgangsbedingungen möglich war.

Eine weitere Standardreferenz für die Untersuchung der Kristallisation. In der Vergangenheit war das Protein Lysozym der *Goldstandard* als Referenz für die Kristallisation von Makromolekülen. Da Lysozym robust kristallisiert, war mit diesem Protein die Untersuchung fundamentaler Aspekte der Kristallisation möglich – am Beispiel des Lysozyms wurde der Effekt von Verunreinigungen, die Abhängigkeit von Probenkonzentration und Temperatur, sowie die Effekte von Magnet-, Elektrizitäts- und Schwerfeldern untersucht [67, 76, 187, 210–213]. Phasendiagramme, thermodynamische Parameter und die Kinetik der Kristallisation wurden für das Lysozym-System im Detail bestimmt [76, 214]. Theoretische Aspekte der Kristallisation wurden mit Hilfe des Lysozyms als Modellsystem bewertet und weiterentwickelt [70, 73, 74, 77, 202]. Das DNA-Dreieck kristallisiert ähnlich robust und könnte diese Studien aus der Perspektive der durch Watson-Crick-Interaktionen vermittelten Kristallisation

komplettieren. Im Gegensatz zu Lysozym ist das DNA-Dreieck aber auf vielseitigere und rationalere Art und Weise veränderbar, um weitere Aspekte der Kristallisation zu untersuchen, wie in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur gezeigt wurde [56, 57].

Wirtsnetzwerke für Gastmoleküle. Schlussendlich zeigt die Studie einige Strategien auf, um neue DNA-Dreiecke zu erzeugen, die einfach kristallisieren und in verschiedenen Puffersystemen verwendbar sind. Derart modifizierte Dreiecke könnten als dreidimensionale Wirtsnetzwerke für andere Gastmoleküle genutzt werden. Beispielsweise zeigten Versuche mit Einzelstrangausbeulungen des M-Strangs Regionen auf, die sich gut für die Anbringung von Nanopartikeln oder Proteinkandidaten eignen könnten (vgl. Abb. 4.10). Erste Beispiele in diese Richtung wurden in der Literatur bereits demonstriert. Mögliche Strategien sind hier sowohl die Kristallisation von Dreiecken, die bereits an Gastmoleküle gebunden sind, als auch die Besetzung freier Koordinationsstellen nach der Kristallisation der Dreiecke [58, 215].

Kapitel 8

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Teilprojekte bearbeitet, die jeweils einen Beitrag zur Kristallisation komplexer DNA-Origami-Objekte leisteten.

Probenherstellung. Die erarbeiteten Methoden der PEG-Fällung und der Sedimentierung mittels Ultrazentrifugation werden hilfreich sein, um für Kristallisationsansätze ausreichende Probenmengen in hoher Konzentration herstellen zu können, mit denen systematische Untersuchungen möglich sind. Auch andere Anwendungen, die hohe Probenkonzentrationen erfordern, können von den beschriebenen Methoden profitieren – hierzu zählen beispielsweise Zellkultur- und *in-vivo*-Studien, die Kryoelektronenmikroskopie, Ensemblemessungen oder die Herstellung größerer Oligomere. Seit das optimierte Protokoll der PEG-Fällung 2014 veröffentlicht wurde, wurde die Methode in publizierten Arbeiten zur Herstellung von DNA-Origami-Strukturen für Oligomerisierungsreaktionen [28, 180, 216], AFM-Studien [208], Ensemblemessungen von Diffusionskinetiken [217], Proteinbindungsstudien [218, 219] und Zellkulturstudien [220] verwendet.

Die Effizienz und Anwendbarkeit verschiedener Präparationsmethoden für DNA-Origami-Objekte wurde mittlerweile in mehreren Studien und für verschiedene Spezialfälle charakterisiert [125, 127, 128, 221]. Zukünftige Aufreinigungsmethoden können von diesem zusammengetragenen Wissen und von der Entwicklung neuer Materialien profitieren, die erst seit kurzem die größenausschlussbasierte Trennung von Megadaltonkomplexen und Aggregaten erlauben [128]. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Sedimentation mittels Ultrazentrifugation bietet auch für weitere Methodenentwicklungen die Möglichkeit, stark verdünnte Proben in einem Sedimentationsschritt wieder zu konzentrieren, sodass dialysebasierte und chromatographische Aufreinigungsmethoden auch für deutlich höhere Probendurchsätze als die bisher möglichen 0,5–50 ml eine praktikable Option bleiben.

Objektdesign. Die Ergebnisse der Modellsystemstudien des DNA-Dreiecks tragen zu einem besseren Verständnis der Faktoren bei, die für die Kristallisation von DNA-Objekten entscheidend sind. Diese Einsichten und erste Erkenntnisse aus initialen Kristallisationsansätzen mit DNA-Origami-Objekten stellen einen validen Ansatzpunkt dar, von dem aus das Testen weiterer Pufferbedingungen und das Design neuer DNA-Origami-Strukturen möglich ist. Für zukünftige Objektdesigns kann auf diesem Wissen aufgebaut werden. Mit Hilfe von mittlerweile etablierten Designstrategien für dynamische Interaktionen, flexible Gelenkpunkte und komplexe Formen, kann eine Reihe neuer Objekte entstehen, die sich sowohl für die geplante als auch die zufällige Kristallisation besser eignen werden [36, 42, 128, 203]. Neue, kürzlich

vorgestellte Methoden zur Simulation der Molekulardynamik in DNA-Objekten werden helfen, die tatsächliche Form und Flexibilität der geplanten Strukturen besser einschätzen zu können [222, 223] und können bisherige Methoden zum Strukturdesign [2, 3] ergänzen. Kürzlich wurde die Anwendbarkeit der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, *small angle X-ray scattering*) für die Analyse von Strukturabweichungen der geplanten DNA-Origami-Formen vorgestellt. Die Messung ist eine vielversprechende Methode um Probenkonformationen und auch Partikelarrangements in Lösung zu charakterisieren [224, 225]. Eine weitere Methode, die den Zugang zu strukturellen Informationen über Einzelpartikel ermöglichen kann, ist die Kryoelektronenmikroskopie [36, 39, 203]. Zusammen mit geeigneten Algorithmen zur 3D-Rekonstruktion [226] kann die Methode hilfreiche Einsichten über die Verdrehung und die tatsächliche dreidimensionale Struktur der DNA-Objekte in Lösung liefern. Idealerweise könnten sich die strukturellen Informationen aus der Kristallographie, der Röntgenkleinwinkelstreuung und der Elektronenmikroskopie in Zukunft in ähnlicher Weise ergänzen, wie dies in der Strukturbiochemie für Proteinkomplexe bereits der Fall ist.

Kristallisationsvermögen der Objekte. Zukünftige Kristallisationsansätze werden weiterhin von publizierten Arbeiten zu kristallisierenden DNA-Systemen profitieren [47, 65]. Ein besseres Verständnis der Partikelinteraktionen in hochkonzentrierten, aber auch in verdünnten Lösungen könnte helfen, rationale Kristallisationsansätze zu planen und den Effekt neuer Proben-Designs auf die Partikelinteraktion besser untersuchen zu können. Denkbare Ansätze hierfür wären die Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten zwischen DNA-Origami-Objekten mittels Lichtstreuung und generelle Analysen der Polydispersität in den Probenlösungen [227, 228]. Die Methode der Lichtstreuung ist allerdings anfällig für die Gegenwart weniger großer Aggregate und für diffuse Streuung in zu dichten Probenlösungen [229]. Übliche Methoden der Probenanalyse für DNA-Origami-Objekte, wie die Gelelektrophorese oder die Negativkontrastelektronenmikroskopie, sind auf Grund von Oberflächeneffekten nicht dafür geeignet, die Probenverteilung in hochkonzentrierten Lösungen wiederzugeben. Hier könnte die Kryoelektronenmikroskopie eine bessere Einschätzung der Partikelaggregation und Partikelorganisation in Lösung erlauben und bei der Analyse dreidimensionaler Nukleationskeime hilfreich sein. Insgesamt werden weitere Charakterisierungen von Nukleationskeimen, Kristallisationsbedingungen und Partikelinteraktionen nicht nur das Kristallisationsvermögen der Proben zugänglicher machen, sondern auch dazu beitragen können, die Partikelinteraktionen für Polymerisationsreaktionen, Interaktionsstudien und die Herstellung von DNA-Origami-Assemblierungen im Gigadaltonbereich besser zu verstehen.

Fazit. Es gibt unzählige denkbare Ansätze für neue Struktur-Designs, weitere Pufferbedingungen und Versuchsdurchführungen, die verfolgt werden können, um in naher Zukunft Kristalle aus DNA-Origami-Objekten züchten zu können. Die Modellsystemstudien dieser Arbeit sind ein Wegweiser, welche dieser Richtungen es wert sind, weiter verfolgt zu werden. Grundvoraussetzung für alle Ansätze ist die Verfügbarkeit von ausreichend hohen Probenmengen. Die in dieser Arbeit etablierten Präparationsverfahren leisten einen wichtigen Beitrag das dafür erforderliche Material erzeugen zu können.

Literaturverzeichnis

- [1] Wolfenden, R. and Snider, M. J. (2001) The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, **34**(12), 938–945.
- [2] Castro, C. E., Kilchherr, F., Kim, D.-N., Shiao, E. L., Wauer, T., Wortmann, P., Bathe, M., and Dietz, H. (2011) A primer to scaffolded DNA origami. *Nature methods*, **8**(3), 221–229.
- [3] Kim, D.-N., Kilchherr, F., Dietz, H., and Bathe, M. (2012) Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures. *Nucleic acids research*, **40**(7), 2862–2868.
- [4] Dong, Z., Luo, Q., and Liu, J. (2012) Artificial enzymes based on supramolecular scaffolds. *Chemical Society Reviews*, **41**(23), 7890–7908.
- [5] Gerling, T. Design and characterization of a nanomechanical two-state DNA-actuator. Dissertation, München, Technische Universität München, 2015 (2015).
- [6] Class for Chemistry of the Royal Swedish Academy of Science (2016) The Nobel Prize in Chemistry 2016 - Advanced Information. Nobelprize.org (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2016/advanced.html) Nobel Media AB 2014. Web. 12 Oct 2016.
- [7] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, **25**(13), 1605–1612.
- [8] Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N. (10, 1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech*, **14**(10), 1246–1251.
- [9] Dietz, H., Douglas, S. M., and Shih, W. M. (2009) Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, **325**(5941), 725–730.
- [10] Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, **7**(11), 1055–1061.
- [11] Rastogi, V. K. and Girvin, M. E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*, **402**(6759), 263–268.
- [12] Gopinath, A., Miyazono, E., Faraon, A., and Rothemund, P. W. (2016) Engineering and mapping nanocavity emission via precision placement of DNA origami. *Nature*, **535**(7612), 401–405.

- [13] Bell, A. T. (2003) The impact of nanoscience on heterogeneous catalysis. *Science*, **299**(5613), 1688–1691.
- [14] Stebe, K. J., Lewandowski, E., and Ghosh, M. (2009) Oriented assembly of metamaterials. *Science*, **325**(5937), 159–160.
- [15] Jones, M. R., Osberg, K. D., Macfarlane, R. J., Langille, M. R., and Mirkin, C. A. (2011) Templated techniques for the synthesis and assembly of plasmonic nanostructures. *Chemical Reviews*, **111**(6), 3736–3827.
- [16] Durbin, S. and Feher, G. (1996) Protein crystallization. *Annual review of physical chemistry*, **47**(1), 171–204.
- [17] Paukstelis, P. J. and Seeman, N. C. (2016) 3D DNA Crystals and Nanotechnology. *Crystals*, **6**(8), 97.
- [18] Zheng, J., Birktoft, J. J., Chen, Y., Wang, T., Sha, R., Constantinou, P. E., Ginell, S. L., Mao, C., and Seeman, N. C. (September, 2009) From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature*, **461**(7260), 74–77.
- [19] Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature*, **386**, 463–471.
- [20] Trakhanov, S., Yusupov, M., Agalarov, S. C., Garber, M., Ryazantsev, S., Tischenko, S., and Shirokov, V. (1987) Crystallization of 70 S ribosomes and 30 S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *Febs Letters*, **220**(2), 319–322.
- [21] Sehnke, P. C., Harrington, M., Hosur, M., Li, Y., Usha, R., Tucker, R. C., Bomu, W., Stauffacher, C. V., and Johnson, J. E. (1988) Crystallization of viruses and virus proteins. *Journal of Crystal Growth*, **90**(1-3), 222–230.
- [22] Jones, M. R., Seeman, N. C., and Mirkin, C. A. (February, 2015) Nanomaterials. Programmable materials and the nature of the DNA bond. *Science*, **347**(6224), 1260901–1–11.
- [23] Rothmund, P. W. (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440**(7082), 297–302.
- [24] Ke, G., Liu, M., Jiang, S., Qi, X., Yang, Y. R., Wootten, S., Zhang, F., Zhu, Z., Liu, Y., Yang, C. J., et al. (2016) Directional Regulation of Enzyme Pathways through the Control of Substrate Channeling on a DNA Origami Scaffold. *Angewandte Chemie International Edition*, **55**(26), 7483–7486.
- [25] Xu, W., Nathwani, B., Lin, C., Wang, J., Karatekin, E., Pincet, F., Shih, W., and Rothman, J. E. (2016) A programmable DNA origami platform to organize SNAREs for membrane fusion. *Journal of the American Chemical Society*, **138**(13), 4439–4447.
- [26] Langecker, M., Arnaut, V., Martin, T. G., List, J., Renner, S., Mayer, M., Dietz, H., and Simmel, F. C. (2012) Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures. *Science*, **338**(6109), 932–936.

- [27] Krishnan, S., Ziegler, D., Arnaut, V., Martin, T. G., Kapsner, K., Henneberg, K., Bausch, A. R., Dietz, H., and Simmel, F. C. (2016) Molecular transport through large-diameter DNA nanopores. *Nature Communications*, **7**(12787).
- [28] Kilchherr, F., Wachauf, C., Pelz, B., Rief, M., Zacharias, M., and Dietz, H. (2016) Single-molecule dissection of stacking forces in DNA. *Science*, **353**(6304).
- [29] Derr, N. D., Goodman, B. S., Jungmann, R., Leschziner, A. E., Shih, W. M., and Reck-Peterson, S. L. (2012) Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science*, **338**(6107), 662–665.
- [30] Douglas, S. M., Chou, J. J., and Shih, W. M. (2007) DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(16), 6644–6648.
- [31] Funke, J. J. and Dietz, H. (2016) Placing molecules with Bohr radius resolution using DNA origami. *Nature nanotechnology*, **11**(1), 47–52.
- [32] Knudsen, J. B., Liu, L., Kodal, A. L. B., Madsen, M., Li, Q., Song, J., Woehrstein, J. B., Wickham, S. F., Strauss, M. T., Schueder, F., et al. (2015) Routing of individual polymers in designed patterns. *Nature nanotechnology*, **10**(10), 892–898.
- [33] Yang, Y., Wang, J., Shigematsu, H., Xu, W., Shih, W. M., Rothman, J. E., and Lin, C. (2016) Self-assembly of size-controlled liposomes on DNA nanotemplates. *Nature chemistry*, **8**(5), 476–483.
- [34] Zhao, Z., Fu, J., Dhakal, S., Johnson-Buck, A., Liu, M., Zhang, T., Woodbury, N. W., Liu, Y., Walter, N. G., and Yan, H. (2016) Nanocaged enzymes with enhanced catalytic activity and increased stability against protease digestion. *Nature communications*, **7**(10619).
- [35] Helmi, S., Ziegler, C., Kauert, D. J., and Seidel, R. (2014) Shape-controlled synthesis of gold nanostructures using DNA origami molds. *Nano letters*, **14**(11), 6693–6698.
- [36] Benson, E., Mohammed, A., Gardell, J., Masich, S., Czeizler, E., Orponen, P., and Högberg, B. (2015) DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. *Nature*, **523**(7561), 441–444.
- [37] Tian, Y., Wang, T., Liu, W., Xin, H. L., Li, H., Ke, Y., Shih, W. M., and Gang, O. (2015) Prescribed nanoparticle cluster architectures and low-dimensional arrays built using octahedral DNA origami frames. *Nature nanotechnology*, **10**(7), 637–644.
- [38] Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, C. L., et al. (2009) Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, **459**(7243), 73–76.
- [39] Bai, X.-c., Martin, T. G., Scheres, S. H., and Dietz, H. (2012) Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(49), 20012–20017.
- [40] Wei, B., Dai, M., and Yin, P. (2012) Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature*, **485**(7400), 623–626.

- [41] Pfeifer, W. and Saccà, B. (2016) From Nano to Macro through Hierarchical Self-Assembly: The DNA Paradigm. *ChemBioChem*, **17**, 1063–1080.
- [42] Gerling, T., Wagenbauer, K. F., Neuner, A. M., and Dietz, H. (2015) Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components. *Science*, **347**(6229), 1446–1452.
- [43] Ke, Y., Ong, L. L., Sun, W., Song, J., Dong, M., Shih, W. M., and Yin, P. (2014) DNA brick crystals with prescribed depths. *Nature chemistry*, **6**(11), 994–1002.
- [44] Macfarlane, R. J., Lee, B., Jones, M. R., Harris, N., Schatz, G. C., and Mirkin, C. A. (2011) Nanoparticle superlattice engineering with DNA. *Science*, **334**(6053), 204–208.
- [45] Tian, Y., Zhang, Y., Wang, T., Xin, H. L., Li, H., and Gang, O. (2016) Lattice engineering through nanoparticle-DNA frameworks. *Nature materials*, **15**(6), 654–661.
- [46] Auyeung, E., Li, T. I., Senesi, A. J., Schmucker, A. L., Pals, B. C., de La Cruz, M. O., and Mirkin, C. A. (2014) DNA-mediated nanoparticle crystallization into Wulff polyhedra. *Nature*, **505**(7481), 73–77.
- [47] Simmons, C. R., Zhang, F., Birktoft, J. J., Qi, X., Han, D., Liu, Y., Sha, R., Abdallah, H., Hernandez, C., Ohayon, Y., et al. (2016) Construction and Structure Determination of a Three-dimensional DNA Crystal. *Journal of the American Chemical Society*, **138**(31), 10047–10054.
- [48] Liu, D., Wang, M., Deng, Z., Walulu, R., and Mao, C. (2004) Tensegrity: construction of rigid DNA triangles with flexible four-arm DNA junctions. *Journal of the American Chemical Society*, **126**(8), 2324–2325.
- [49] McKinney, S. A., Déclais, A.-C., Lilley, D. M., and Ha, T. (2003) Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nature Structural & Molecular Biology*, **10**(2), 93–97.
- [50] Snelson, K. (2012) The Art of Tensegrity. *International Journal of Space Structures*, **27**(2-3), 71–80.
- [51] Snelson, K. D. Space frame structure made by 3-D weaving of rod members. (May 25, 2004) US Patent 6,739,937.
- [52] Liedl, T., Högberg, B., Tytell, J., Ingber, D. E., and Shih, W. M. (2010) Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA. *Nature nanotechnology*, **5**(7), 520–524.
- [53] Pan, K., Kim, D.-N., Zhang, F., Adendorff, M. R., Yan, H., and Bathe, M. (2014) Lattice-free prediction of three-dimensional structure of programmed DNA assemblies. *Nature communications*, **5**(5578), 1–7.
- [54] Kantardjieff, K. A. and Rupp, B. (2003) Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein–nucleic acid complex crystals. *Protein Science*, **12**(9), 1865–1871.
- [55] Nguyen, N., Birktoft, J. J., Sha, R., Wang, T., Zheng, J., Constantinou, P. E., Ginell, S. L., Chen, Y., Mao, C., and Seeman, N. C. (2012) The absence of tertiary interactions in a self-assembled DNA crystal structure. *Journal of Molecular Recognition*, **25**(4), 234–237.

- [56] Sha, R., Birktoft, J. J., Nguyen, N., Chandrasekaran, A. R., Zheng, J., Zhao, X., Mao, C., and Seeman, N. C. (2013) Self-assembled DNA crystals: the impact on resolution of 5'-phosphates and the DNA source. *Nano letters*, **13**(2), 793–797.
- [57] Wang, T., Sha, R., Birktoft, J., Zheng, J., Mao, C., and Seeman, N. C. (2010) A DNA crystal designed to contain two molecules per asymmetric unit. *Journal of the American Chemical Society*, **132**(44), 15471–15473.
- [58] Rusling, D. A., Chandrasekaran, A. R., Ohayon, Y. P., Brown, T., Fox, K. R., Sha, R., Mao, C., and Seeman, N. C. (April, 2014) Functionalizing designer DNA crystals with a triple-helical veneer. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**(15), 3979–3982.
- [59] Zhao, J., Chandrasekaran, A. R., Li, Q., Li, X., Sha, R., Seeman, N. C., and Mao, C. (July, 2015) Post-Assembly Stabilization of Rationally Designed DNA Crystals. *Angewandte Chemie*, **54**(34), 9936–9939.
- [60] Abdallah, H. O., Ohayon, Y. P., Chandrasekaran, A. R., Sha, R., Fox, K. R., Brown, T., Rusling, D. A., Mao, C., and Seeman, N. C. (2016) Stabilisation of self-assembled DNA crystals by triplex-directed photo-cross-linking. *Chemical Communications*, **52**, 814–817.
- [61] Paukstelis, P. J., Nowakowski, J., Birktoft, J. J., and Seeman, N. C. (2004) Crystal structure of a continuous three-dimensional DNA lattice. *Chemistry & biology*, **11**(8), 1119–1126.
- [62] Paukstelis, P. J., Nowakowski, J., Birktoft, J. J., and Seeman, N. C. (April, 2005) Crystal Structure of a Continuous Three-Dimensional DNA Lattice. *Chemistry & Biology*, **12**(4), 497.
- [63] Saoji, M., Zhang, D., and Paukstelis, P. J. (November, 2015) Probing the role of sequence in the assembly of three-dimensional DNA crystals. *Biopolymers*, **103**(11), 618–626.
- [64] Paukstelis, P. J. (May, 2006) Three-dimensional DNA crystals as molecular sieves. *Journal of the American Chemical Society*, **128**(21), 6794–6795.
- [65] Zhang, D. and Paukstelis, P. J. (January, 2016) Enhancing DNA Crystal Durability through Chemical Crosslinking. *ChemBioChem*, **17**, 1163–1170.
- [66] Rosenberger, F. (1986) Inorganic and protein crystal growth-similarities and differences. *Journal of Crystal Growth*, **76**(3), 618–636.
- [67] Durbin, S. and Feher, G. (1986) Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. *Journal of Crystal Growth*, **76**(3), 583–592.
- [68] Kierzek, A. M. and Zielenkiewicz, P. (2001) Models of protein crystal growth. *Biophysical chemistry*, **91**(1), 1–20.
- [69] Malkin, A. J. and McPherson, A. (1993) Light scattering investigations of protein and virus crystal growth: ferritin, apoferritin and satellite tobacco mosaic virus. *Journal of crystal growth*, **128**(1-4), 1232–1235.

- [70] Malkin, A. J., Cheung, J., and McPherson, A. (1993) Crystallization of satellite tobacco mosaic virus I. Nucleation phenomena. *Journal of crystal growth*, **126**(4), 544–554.
- [71] Chayen, N. E. (2004) Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current opinion in structural biology*, **14**(5), 577–583.
- [72] McPherson, A., Malkin, A., and Kuznetsov, Y. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Structure*, **3**(8), 759 – 768.
- [73] Chernov, A. A. (2003) Protein crystals and their growth. *Journal of structural biology*, **142**(1), 3–21.
- [74] ten Wolde, P. R. and Frenkel, D. (1997) Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations. *Science*, **277**(5334), 1975–1978.
- [75] Feher, G. and Kam, Z. (1984) Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays. *Methods in enzymology*, **114**, 77–112.
- [76] Akella, S. V., Mowitz, A., Heymann, M., and Fraden, S. (September, 2014) Emulsion-Based Technique To Measure Protein Crystal Nucleation Rates of Lysozyme. *Crystal Growth & Design*, **14**(9), 4487–4509.
- [77] Garcia-Ruiz, J. M. (2003) Nucleation of protein crystals. *Journal of structural biology*, **142**(1), 22–31.
- [78] Jacobs, W. M. and Frenkel, D. (2016) Self-assembly of structures with addressable complexity. *Journal of the American Chemical Society*, **138**(8), 2457–2467.
- [79] Zandi, R., van der Schoot, P., Reguera, D., Kegel, W., and Reiss, H. (2006) Classical nucleation theory of virus capsids. *Biophysical journal*, **90**(6), 1939–1948.
- [80] De Yoreo, J. J., Gilbert, P. U. P. A., Sommerdijk, N. A. J. M., Penn, R. L., Whitelam, S., Joester, D., Zhang, H., Rimer, J. D., Navrotsky, A., Banfield, J. F., Wallace, A. F., Michel, F. M., Meldrum, F. C., Cölfen, H., and Dove, P. M. (2015) CRYSTAL GROWTH. Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments. *Science*, **349**(6247), aaa6760–aaa6760.
- [81] Sear, R. P. (2007) Nucleation: theory and applications to protein solutions and colloidal suspensions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **19**(3), 033101.
- [82] Sleutel, M. and Van Driessche, A. E. (2014) Role of clusters in nonclassical nucleation and growth of protein crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(5), E546–E553.
- [83] Sauter, A., Oelker, M., Zocher, G., Zhang, F., Stehle, T., and Schreiber, F. (December, 2014) Nonclassical Pathways of Protein Crystallization in the Presence of Multivalent Metal Ions. *Crystal Growth & Design*, **14**(12), 6357–6366.
- [84] Vekilov, P. G. (2004) Dense liquid precursor for the nucleation of ordered solid phases from solution. *Crystal growth & design*, **4**(4), 671–685.
- [85] Vekilov, P. G. (2010) Nucleation. *Crystal growth & design*, **10**(12), 5007–5019.

- [86] Ng, J. D., Kuznetsov, Y. G., Malkin, A. J., Keith, G., Giegé, R., and McPherson, A. (1997) Visualization of RNA crystal growth by atomic force microscopy. *Nucleic acids research*, **25**(13), 2582–2588.
- [87] McPherson, A., Malkin, A., and Kuznetsov, Y. G. (2000) Atomic force microscopy in the study of macromolecular crystal growth. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **29**(1), 361–410.
- [88] Stahl, E., Praetorius, F., de Oliveira Mann, C. C., Hopfner, K.-P., and Dietz, H. (2016) Impact of Heterogeneity and Lattice Bond Strength on DNA Triangle Crystal Growth. *ACS Nano*, **10**(10), 9156–9164 PMID: 27583560.
- [89] Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, **326**(5959), 1509–1512.
- [90] Wang, T., Sha, R., Birktoft, J., Birktoft, J., Zheng, J., Mao, C., and Seeman, N. C. (November, 2010) A DNA crystal designed to contain two molecules per asymmetric unit. *Journal of the American Chemical Society*, **132**(44), 15471–15473.
- [91] Bujacz, A. (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica section D: biological crystallography*, **68**(10), 1278–1289.
- [92] Deng, D., Yan, C., Wu, J., Pan, X., and Yan, N. (2014) Revisiting the TALE repeat. *Protein & cell*, **5**(4), 297–306.
- [93] Richert, C., Meng, M., and Singh, A. (December, 2009) Designed DNA crystals: triangles with short sticky ends. *Small*, **5**(24), 2782–2783.
- [94] SantaLucia, J. and Hicks, D. (2004) The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **33**(1), 415–440.
- [95] Kilchherr, F. Stärke und Kinetik der Stapelwechselwirkung zwischen DNA-Basenpaaren. Dissertation, Technische Universität München (2015).
- [96] Fraenkel, E., Rould, M. A., Chambers, K. A., and Pabo, C. O. (1998) Engrailed homeodomain-DNA complex at 2.2 Å resolution: a detailed view of the interface and comparison with other engrailed structures. *Journal of molecular biology*, **284**(2), 351–361.
- [97] Berson, J. A. (2006) Kinetik, Thermodynamik und das Problem der Selektivität: vom Reifen einer Idee. *Angewandte Chemie*, **118**(29), 4842–4847.
- [98] Eurofins-Genomics: Custom DNA Oligos. Online Service-Broschüre (2016) www.eurofinsgenomics.eu.
- [99] Greene, K. L., Jones, R. L., Li, Y., Robinson, H., Wang, A. H. J., Zon, G., and Wilson, W. D. (February, 1994) Solution Structure of a GA Mismatch DNA Sequence, d(CCATGAATGG)₂, Determined by 2D NMR and Structural Refinement Methods. *Biochemistry*, **33**(5), 1053–1062.

- [100] Peyret, N., Seneviratne, P. A., Allawi, H. T., and SantaLucia, J. (March, 1999) Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry*, **38**(12), 3468–3477.
- [101] Boulard, Y., Cognet, J., and Fazakerley, G. (1997) Solution structure as a function of pH of two central mismatches, C· T and C· C, in the 29 to 39 K-ras gene sequence, by nuclear magnetic resonance and molecular dynamics. *Journal of molecular biology*, **268**(2), 331–347.
- [102] Bhattacharyya, A. and Lilley, D. M. J. (September, 1989) The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucleic Acids Research*, **17**(17), 6821–6840.
- [103] Hsieh, C.-H. and Griffith, J. D. (1989) Deletions of bases in one strand of duplex DNA, in contrast to single-base mismatches, produce highly kinked molecules: possible relevance to the folding of single-stranded nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**(13), 4833–4837.
- [104] Langridge, R., Wilson, H., Hooper, C., Wilkins, M. H., and Hamilton, L. (1960) The molecular configuration of deoxyribonucleic acid: I. X-ray diffraction study of a crystalline form of the lithium salt. *Journal of Molecular Biology*, **2**(1), 19–111.
- [105] Dickerson, R. E., Drew, H. R., Conner, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V., and Kopka, M. L. (1982) The anatomy of a-, b-, and z-dna. *Science*, **216**(4545), 475–485.
- [106] Munnur, D., Mitchell, E., Forsyth, V., Teixeira, S., and Neidle, S. A Detailed Study of Water Network in the Minor Groove of D(Cgcaattcgcg)₂ and D(Cgcaatttgcg)₂ in Presence of Linear Groove Binders. To be published (2013) PDB ID: 4AGZ.
- [107] Rice, J. A. and Crothers, D. M. (May, 1989) DNA bending by the bulge defect. *Biochemistry*, **28**(10), 4512–4516.
- [108] Turner, D. H. (1992) Bulges in nucleic acids. *Current opinion in structural biology*, **2**(3), 334–337.
- [109] Zadeh, J. N., Steenberg, C. D., Bois, J. S., Wolfe, B. R., Pierce, M. B., Khan, A. R., Dirks, R. M., and Pierce, N. A. (2011) NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems. *Journal of computational chemistry*, **32**(1), 170–173.
- [110] Joshua-Tor, L., Frolow, F., Appella, E., Hope, H., Rabinovich, D., and Sussman, J. L. (1992) Three-dimensional structures of bulge-containing DNA fragments. *Journal of molecular biology*, **225**(2), 397–431.
- [111] Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J.-F., and Tajmir-Riahi, H.-A. (2007) Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, **827**(1), 35–43.
- [112] Gu, B., Zhang, F., Wang, Z., and Zhou, H. (2008) Solvent-induced DNA conformational transition. *Physical review letters*, **100**(088104), 1–4.
- [113] Sushko, M. L., Thomas, D. G., Pabit, S. A., Pollack, L., Onufriev, A. V., and Baker, N. A. (January, 2016) The Role of Correlation and Solvation in Ion Interactions with B-DNA. *Biophysical Journal*, **110**(2), 315–326.

- [114] Maehigashi, T., Hsiao, C., Woods, K. K., Moulaei, T., Hud, N. V., and Williams, L. D. (2011) B-DNA structure is intrinsically polymorphic: even at the level of base pair positions. *Nucleic Acids Research*, **40**(8), 3714–3722.
- [115] McFail-Isom, L., Sines, C. C., and Williams, L. D. (1999) DNA structure: cations in charge?. *Current opinion in structural biology*, **9**(3), 298–304.
- [116] Zaugg, H. E. (1955) A mechanical resolution of dl-methadone base. *Journal of the American Chemical Society*, **77**(10), 2910–2910.
- [117] Martin, T. G. and Dietz, H. (2012) Magnesium-free self-assembly of multi-layer DNA objects. *Nature communications*, **3**(1103).
- [118] Weeks, D. P., Beerman, N., and Griffith, O. (1986) A small-scale five-hour procedure for isolating multiple samples of CsCl-purified DNA: application to isolations from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast, and bacterial sources. *Analytical biochemistry*, **152**(2), 376–385.
- [119] Brousseau, T., Clavey, V., Bard, J., and Fruchart, J. (1993) Sequential ultracentrifugation micromethod for separation of serum lipoproteins and assays of lipids, apolipoproteins, and lipoprotein particles.. *Clinical chemistry*, **39**(6), 960–964.
- [120] Lis, J. T. and Schleif, R. (1975) Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic acids research*, **2**(3), 383–390.
- [121] Polson, A., Potgieter, G., Largier, J., Mears, G., and Joubert, F. (1964) The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **82**(3), 463–475.
- [122] Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L., and Treiber, G. (1970) Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, **40**(3), 734–744.
- [123] Vinograd, J., Bruner, R., Kent, R., and Weigle, J. (1963) Band-centrifugation of macromolecules and viruses in self-generating density gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **49**(6), 902–910.
- [124] Bellot, G., McClintock, M. A., Chou, J. J., and Shih, W. M. (2013) DNA nanotubes for NMR structure determination of membrane proteins. *Nature protocols*, **8**(4), 755–770.
- [125] Lin, C., Perrault, S. D., Kwak, M., Graf, F., and Shih, W. M. (2012) Purification of DNA-origami nanostructures by rate-zonal centrifugation. *Nucleic acids research*, (gks1070), 1–6.
- [126] Martin, T. G. et al. Functional Synthetic DNA Nanostructures. Dissertation, Technische Universität München (2014).
- [127] Stahl, E., Martin, T. G., Praetorius, F., and Dietz, H. (2014) Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions. *Angewandte Chemie*, **126**(47), 12949–12954.

- [128] Wagenbauer, K. F., Engelhardt, F. A. S., Stahl, E., Hecht, V. K., Stömm, P., Seebacher, F., Meregalli, L., Ketterer, P., Gerling, T., and Dietz, H. How we make DNA origami at preparative scales with application-ready quality. *eingereichter Artikel* (2016).
- [129] Hou, S., Trochimczyk, P., Sun, L., Wisniewska, A., Kalwarczyk, T., Zhang, X., Wielgus-Kutrowska, B., Bzowska, A., and Holyst, R. (2016) How can macromolecular crowding inhibit biological reactions? The enhanced formation of DNA nanoparticles. *Scientific reports*, **6**(22033).
- [130] Yang, Y., Barry, E., Dogic, Z., and Hagan, M. F. (2012) Self-assembly of 2D membranes from mixtures of hard rods and depleting polymers. *Soft Matter*, **8**(3), 707–714.
- [131] Gibaud, T., Barry, E., Zakhary, M. J., Henglin, M., Ward, A., Yang, Y., Berciu, C., Oldenbourg, R., Hagan, M. F., Nicastro, D., et al. (2012) Reconfigurable self-assembly through chiral control of interfacial tension. *Nature*, **481**(7381), 348–351.
- [132] Sobczak, J.-P. J., Martin, T. G., Gerling, T., and Dietz, H. (2012) Rapid folding of DNA into nanoscale shapes at constant temperature. *Science*, **338**(6113), 1458–1461.
- [133] Wei, R., Martin, T. G., Rant, U., and Dietz, H. (2012) DNA Origami Gatekeepers for Solid-State Nanopores. *Angewandte Chemie*, **124**(20), 4948–4951.
- [134] Millipore-Corporation: User Guide - Amicon® Ultra 0.5 Centrifugal Filtration Devices. Online Service-Broschüre (2011) www.merckmillipore.com/DE.
- [135] Thuring, R., Sanders, J., and Borst, P. (1975) A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Analytical biochemistry*, **66**(1), 213–220.
- [136] Bellot, G., McClintock, M. A., Lin, C., and Shih, W. M. (2011) Recovery of intact DNA nanostructures after agarose gel-based separation. *Nature methods*, **8**(3), 192–194.
- [137] Beaucage, S. and Caruthers, M. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters*, **22**(20), 1859–1862.
- [138] Levine, L., Gordon, J. A., and Jencks, W. P. (1963) The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **2**(1), 168–175.
- [139] Herskovits, T. T. (1962) Nonaqueous solutions of DNA: Factors determining the stability of the helical configuration in solution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **97**(3), 474–484.
- [140] Markarian, S. A., Asatryan, A. M., Grigoryan, K. R., and Sargsyan, H. R. (2006) Effect of diethylsulfoxide on the thermal denaturation of DNA. *Biopolymers*, **82**(1), 1–5.
- [141] Reichardt, C. and Welton, T. (2010) Appendix A. Properties, Purification, and Use of Organic Solvents. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Fourth Edition*, pp. 549–586.
- [142] Dimroth, K., Reichardt, C., Siepmann, T., and Bohlmann, F. (1963) Über Pyridinium-N-phenol-betaïne und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **661**(1), 1–37.

- [143] Rozenman, M. M. and Liu, D. R. (2006) DNA-Templated Synthesis in Organic Solvents. *ChemBioChem*, **7**(2), 253–256.
- [144] Kim, H., Surwade, S. P., Powell, A., O'Donnell, C., and Liu, H. (2014) Stability of DNA origami nanostructure under diverse chemical environments. *Chemistry of Materials*, **26**(18), 5265–5273.
- [145] Gállego, I., Grover, M. A., and Hud, N. V. (2015) Folding and Imaging of DNA Nanostructures in Anhydrous and Hydrated Deep-Eutectic Solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**(23), 6765–6769.
- [146] Schachman, H. K. (2013) Ultracentrifugation in biochemistry, Elsevier, .
- [147] Kick, B., Praetorius, F., Dietz, H., and Weuster-Botz, D. (2015) Efficient production of single-stranded phage DNA as scaffolds for DNA origami. *Nano letters*, **15**(7), 4672–4676.
- [148] Dunlop, K. V. and Hazes, B. (2005) A modified vapor-diffusion crystallization protocol that uses a common dehydrating agent. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **61**(8), 1041–1048.
- [149] Chayen, N. E. and Saridakis, E. (2008) Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature methods*, **5**(2), 147–153.
- [150] Dunlop, K. V. and Hazes, B. (2003) When less is more: a more efficient vapour-diffusion protocol. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **59**(10), 1797–1800.
- [151] Lu, Q.-Q., Yin, D.-C., Xie, S.-X., Liu, Y.-M., and Chen, R.-Q. (2011) The effect of diluting crystallization droplets on protein crystallization in vapor diffusion method. *Crystal Research and Technology*, **46**(9), 917–925.
- [152] Goldar, A., Thomson, H., and Seddon, J. M. (2007) Structure of DNA cholesteric spherulitic droplet dispersions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **20**(3), 035102.
- [153] Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., and Sica, F. (2013) An overview of biological macromolecule crystallization. *International journal of molecular sciences*, **14**(6), 11643–11691.
- [154] Berger, I., Kang, C., Sinha, N., Wolters, M., and Rich, A. (1996) A highly efficient 24-condition matrix for the crystallization of nucleic acid fragments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **52**(3), 465–468.
- [155] Shtukenberg, A. G., Punin, Y. O., Gunn, E., and Kahr, B. (2011) Spherulites. *Chemical reviews*, **112**(3), 1805–1838.
- [156] Smith, M., Sharp, J., and Roberts, C. (2012) Giant amyloid spherulites reveal their true colours. *Soft Matter*, **8**(14), 3751–3755.
- [157] Pelta, J., Livolant, F., and Sikorav, J.-L. (1996) DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(10), 5656–5662.

- [158] Pelta Jr, J., Durand, D., Doucet, J., and Livolant, F. (1996) DNA mesophases induced by spermidine: structural properties and biological implications.. *Biophysical journal*, **71**(1), 48.
- [159] Krebs, M. R., MacPhee, C. E., Miller, A. F., Dunlop, I. E., Dobson, C. M., and Donald, A. M. (2004) The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(40), 14420–14424.
- [160] Tien, N.-D., Nishikawa, Y., Hashimoto, M., Tosaka, M., Sasaki, S., and Sakurai, S. (2015) Three-dimensional analyses of spherulite morphology in poly (oxyethylene) and its blends with amorphous poly (d, l-lactic acid) using X-ray computerized tomography. *Polymer Journal*, **47**(1), 37–44.
- [161] Stanley, C. B., Hong, H., and Strey, H. H. (2005) DNA cholesteric pitch as a function of density and ionic strength. *Biophysical journal*, **89**(4), 2552–2557.
- [162] Kelly, A. A. and Knowles, K. M. (2012) Crystallography and crystal defects, John Wiley & Sons, .
- [163] Jethmalani, J. M., Ford, W. T., and Beaucage, G. (1997) Crystal structures of monodisperse colloidal silica in poly methyl acrylate films. *Langmuir*, **13**(13), 3338–3344.
- [164] Querol-Audí, J., Perez-Luque, R., Fita, I., López-Iglesias, C., Castón, J. R., Carrascosa, J. L., and Verdaguer, N. (2005) Preliminary analysis of two and three dimensional crystals of vault ribonucleoprotein particles. *Journal of structural biology*, **151**(1), 111–115.
- [165] Anderson, D. H., Kickhoefer, V. A., Sievers, S. A., Rome, L. H., and Eisenberg, D. (2007) Draft crystal structure of the vault shell at 9-Å resolution. *PLoS Biol*, **5**(11), e318.
- [166] White, J. M. and Johnson, J. E. (1980) Crystalline cowpea mosaic virus. *Virology*, **101**(1), 319–324.
- [167] Bamford, J. K., Cockburn, J. J., Diprose, J., Grimes, J. M., Sutton, G., Stuart, D. I., and Bamford, D. H. (2002) Diffraction quality crystals of PRD1, a 66-MDa dsDNA virus with an internal membrane. *Journal of structural biology*, **139**(2), 103–112.
- [168] Reddy, V., Natchiar, S., Gritton, L., Mullen, T.-M., Stewart, P. L., and Nemerow, G. (2010) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human adenovirus. *Virology*, **402**(1), 209–214.
- [169] Reddy, V. S., Natchiar, S. K., Stewart, P. L., and Nemerow, G. R. (2010) Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science*, **329**(5995), 1071–1075.
- [170] Krueger, A., Protozanova, E., and Frank-Kamenetskii, M. D. (2006) Sequence-dependent basepair opening in DNA double helix. *Biophysical journal*, **90**(9), 3091–3099.
- [171] Anson, M. (1937) Carboxypeptidase I. The preparation of crystalline carboxypeptidase. *The Journal of general physiology*, **20**(5), 663–669.

- [172] Jones, M. R. and Mirkin, C. A. (2013) Bypassing the Limitations of Classical Chemical Purification with DNA-Programmable Nanoparticle Recrystallization. *Angewandte Chemie International Edition*, **52**(10), 2886–2891.
- [173] Petersen, K. Method of producing crystalline insulin. (January 20, 1953) US Patent 2,626,228.
- [174] Chan, P., Sakano, K., Singh, S., and Wildman, S. (1972) Crystalline fraction I protein: preparation in large yield. *Science*, **176**(4039), 1145–1146.
- [175] Pillow, J. N., Halim, M., Lupton, J. M., Burn, P. L., and Samuel, I. D. (1999) A facile iterative procedure for the preparation of dendrimers containing luminescent cores and stilbene dendrons. *Macromolecules*, **32**(19), 5985–5993.
- [176] Jacobsen, C., Garside, J., and Hoare, M. (1998) Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths. *Biotechnology and bioengineering*, **57**(6), 666–675.
- [177] Smejkal, B. Aufreinigung und Formulierung eines therapeutischen Antikörpers mittels Kristallisation PhD thesis Universität München (2013).
- [178] Ke, Y., Bellot, G., Voigt, N. V., Fradkov, E., and Shih, W. M. (2012) Two design strategies for enhancement of multilayer–DNA–origami folding: underwinding for specific intercalator rescue and staple-break positioning. *Chemical Science*, **3**(8), 2587–2597.
- [179] Dunn, K. E., Dannenberg, F., Ouldrige, T. E., Kwiatkowska, M., Turberfield, A. J., and Bath, J. (2015) Guiding the folding pathway of DNA origami. *Nature*, **525**.
- [180] Ketterer, P., Willner, E. M., and Dietz, H. (2016) Nanoscale rotary apparatus formed from tight-fitting 3D DNA components. *Science advances*, **2**(2), e1501209.
- [181] Wagenbauer, K. F., Wachauf, C. H., and Dietz, H. (2014) Quantifying quality in DNA self-assembly. *Nature communications*, **5**(3691), 1–7.
- [182] Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**(3), 218–229.
- [183] Romig, T. S., Bell, C., and Drolet, D. W. (1999) Aptamer affinity chromatography:: combinatorial chemistry applied to protein purification. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **731**(2), 275–284.
- [184] Labrou, N. (2003) Design and selection of ligands for affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, **790**(1), 67–78.
- [185] McPherson, A. (1991) A brief history of protein crystal growth. *Journal of crystal growth*, **110**(1), 1–10.
- [186] Dobrianov, I., Caylor, C., Lemay, S., Finkelstein, K., and Thorne, R. (1999) X-ray diffraction studies of protein crystal disorder. *Journal of crystal growth*, **196**(2), 511–523.

- [187] Lorber, B., Skouri, M., Munch, J.-P., and Giegé, R. (1993) The influence of impurities on protein crystallization; the case of lysozyme. *Journal of crystal growth*, **128**(1), 1203–1211.
- [188] Caylor, C., Dobrianov, I., Lemay, S., Kimmer, C., Kriminski, S., Finkelstein, K., Zipfel, W., Webb, W., Thomas, B., Chernov, A., et al. (1999) Macromolecular impurities and disorder in protein crystals. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **36**(3), 270–281.
- [189] Morimoto, Y., Mizushima, T., Yagi, A., Tanahashi, N., Tanaka, K., Ichihara, A., and Tsukihara, T. (1995) Ordered structure of the crystallized bovine 20S Proteasome. *Journal of biochemistry*, **117**(3), 471–474.
- [190] Kato, K., Tanaka, H., Sumizawa, T., Yoshimura, M., Yamashita, E., Iwasaki, K., and Tsukihara, T. (2008) A vault ribonucleoprotein particle exhibiting 39-fold dihedral symmetry. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **64**(5), 525–531.
- [191] Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**(5481), 905–920.
- [192] Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E., Sumizawa, T., Zhou, Y., Yao, M., Iwasaki, K., Yoshimura, M., and Tsukihara, T. (2009) The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science*, **323**(5912), 384–388.
- [193] Ortiz-Lombardía, M., González, A., Eritja, R., Aymamí, J., Azorín, F., and Coll, M. (1999) Crystal structure of a DNA Holliday junction. *Nature Structural & Molecular Biology*, **6**(10), 913–917.
- [194] Qiu, H., Dewan, J. C., and Seeman, N. C. (1997) A DNA decamer with a sticky end: The crystal structure of d-CGACGATCGT. *Journal of Molecular Biology*, **267**(4), 881–898.
- [195] Nowakowski, J., Shim, P. J., Prasad, G. S., Stout, C. D., and Joyce, G. F. (1999) Crystal structure of an 82-nucleotide RNA–DNA complex formed by the 10-23 DNA enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, **6**(2), 151–156.
- [196] Royant, A. and Noirclerc-Savoye, M. (2011) Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. *Journal of structural biology*, **174**(2), 385–390.
- [197] Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, **330**(6008), 1203–1209.
- [198] Zheng, J., Constantinou, P. E., Micheel, C., Alivisatos, A. P., Kiehl, R. A., and Seeman, N. C. (July, 2006) Two-dimensional nanoparticle arrays show the organizational power of robust DNA motifs. *Nano Letters*, **6**(7), 1502–1504.
- [199] Mandal, P. K., Collie, G. W., Kauffmann, B., and Huc, I. (2014) Racemic DNA crystallography. *Angewandte Chemie*, **126**(52), 14652–14655.
- [200] Yeates, T. O. and Kent, S. B. (2012) Racemic protein crystallography. *Annual review of biophysics*, **41**, 41–61.

- [201] Zenk, J., Tuntivate, C., and Schulman, R. (2016) Kinetics and Thermodynamics of Watson–Crick Base Pairing Driven DNA Origami Dimerization. *Journal of the American Chemical Society*, **138**(10), 3346–3354.
- [202] Malkin, A. J. and McPherson, A. (1994) Light-scattering investigations of nucleation processes and kinetics of crystallization in macromolecular systems. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **50**(4), 385–395.
- [203] Veneziano, R., Ratanalert, S., Zhang, K., Zhang, F., Yan, H., Chiu, W., and Bathe, M. (2016) Designer nanoscale DNA assemblies programmed from the top down. *Science*, p. aaf4388.
- [204] Cooper, D. R., Boczek, T., Grelewska, K., Pinkowska, M., Sikorska, M., Zawadzki, M., and Derewenda, Z. (2007) Protein crystallization by surface entropy reduction: optimization of the SER strategy. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **63**(5), 636–645.
- [205] Derewenda, Z. S. (2004) Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure*, **12**(4), 529–535.
- [206] Hyrup, B. and Nielsen, P. E. (1996) Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **4**(1), 5–23.
- [207] Burns, J. R., Stulz, E., and Howorka, S. (2013) Self-assembled DNA nanopores that span lipid bilayers. *Nano letters*, **13**(6), 2351–2356.
- [208] Aghebat Rafat, A., Pirzer, T., Scheible, M. B., Kostina, A., and Simmel, F. C. (2014) Surface-Assisted Large-Scale Ordering of DNA Origami Tiles. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**(29), 7665–7668.
- [209] Luan, B. and Aksimentiev, A. (2008) DNA attraction in monovalent and divalent electrolytes. *Journal of the American Chemical Society*, **130**(47), 15754–15755.
- [210] Burke, M. W., Leardi, R., Judge, R. A., and Pusey, M. L. (2001) Quantifying main trends in lysozyme nucleation: the effect of precipitant concentration, supersaturation, and impurities. *Crystal Growth & Design*, **1**(4), 333–337.
- [211] Snell, E., Weisgerber, S., Helliwell, J., Weckert, E., Hölzer, K., and Schroer, K. (1995) Improvements in lysozyme protein crystal perfection through microgravity growth. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **51**(6), 1099–1102.
- [212] Ataka, M., Katoh, E., and Wakayama, N. I. (1997) Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of crystallization of lysozyme. *Journal of crystal growth*, **173**(3), 592–596.
- [213] Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeot, J., and Aubry, A. (2001) Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field. *Journal of crystal growth*, **232**(1), 250–255.
- [214] Ataka, M. and Asai, M. (1988) Systematic studies on the crystallization of lysozyme: determination and use of phase diagrams. *Journal of Crystal Growth*, **90**(1), 86–93.

- [215] Zhao, J., Chandrasekaran, A. R., Li, Q., Li, X., Sha, R., Seeman, N. C., and Mao, C. (2015) Post-Assembly Stabilization of Rationally Designed DNA Crystals. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**(34), 9936–9939.
- [216] List, J., Falgenhauer, E., Kopperger, E., Pardatscher, G., and Simmel, F. C. (2016) Long-range movement of large mechanically interlocked DNA nanostructures. *Nature Communications*, **7**(12414).
- [217] Kopperger, E., Pirzer, T., and Simmel, F. C. (2015) Diffusive Transport of Molecular Cargo Tethered to a DNA Origami Platform. *Nano letters*, **15**(4), 2693–2699.
- [218] Le, J. V., Luo, Y., Darcy, M. A., Lucas, C. R., Goodwin, M. F., Poirier, M. G., and Castro, C. E. (2016) Probing Nucleosome Stability With a DNA Origami Nanocaliper. *ACS nano*, **10**(7), 7073–7084.
- [219] Sagredo, S., Pirzer, T., Aghebat Rafat, A., Goetzfried, M. A., Moncalian, G., Simmel, F. C., and de la Cruz, F. (2016) Orthogonal Protein Assembly on DNA Nanostructures Using Relaxases. *Angewandte Chemie International Edition*, **55**.
- [220] Kohman, R. E., Cha, S. S., Man, H.-Y., and Han, X. (2016) Light-Triggered Release of Bioactive Molecules from DNA Nanostructures. *Nano letters*, **16**(4), 2781–2785.
- [221] Shaw, A., Benson, E., and Högberg, B. (2015) Purification of functionalized DNA origami nanostructures. *ACS nano*, **9**(5), 4968–4975.
- [222] Maffeo, C., Yoo, J., and Aksimentiev, A. (2016) De novo reconstruction of DNA origami structures through atomistic molecular dynamics simulation. *Nucleic acids research*, p. gkw155.
- [223] Slone, S. M., Li, C.-Y., Yoo, J., and Aksimentiev, A. (2016) Molecular mechanics of DNA bricks: in situ structure, mechanical properties and ionic conductivity. *New Journal of Physics*, **18**(5), 055012.
- [224] Fischer, S., Hartl, C., Frank, K., Rädler, J. O., Liedl, T., and Nickel, B. (2016) Shape and Interhelical Spacing of DNA Origami Nanostructures Studied by Small-Angle X-ray Scattering. *Nano Letters*, **16**(7), 4282–4287 PMID: 27184452.
- [225] Bruetzel, L. K., Gerling, T., Sedlak, S. M., Walker, P. U., Zheng, W., Dietz, H., and Lipfert, J. (2016) Conformational Changes and Flexibility of DNA Devices Observed by Small-Angle X-Ray Scattering. *Nano Letters*, **16**(8), 4871–4879.
- [226] Scheres, S. H. (2012) RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology*, **180**(3), 519 – 530.
- [227] Hitscherich, C., Kaplan, J., Allaman, M., Wiencek, J., and Loll, P. J. (2000) Static light scattering studies of OmpF porin: implications for integral membrane protein crystallization. *Protein Science*, **9**(08), 1559–1566.
- [228] George, A. and Wilson, W. W. (1994) Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **50**(4), 361–365.

- [229] Wilson, W. W. (2003) Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth—A practical approach. *Journal of structural biology*, **142**(1), 56–65.
- [230] Fasman, G. D., Sober, H. A., et al. (1977) Handbook of biochemistry and molecular biology, Vol. 1, CRC press Cleveland, .
- [231] Cantor, C. R., Warshaw, M. M., and Shapiro, H. (1970) Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleolides. *Biopolymers*, **9**(9), 1059–1077.
- [232] Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I., and Ludtke, S. J. (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of structural biology*, **157**(1), 38–46.
- [233] Scheres, S. H., Núñez-Ramírez, R., Sorzano, C. O., Carazo, J. M., and Marabini, R. (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nature protocols*, **3**(6), 977–990.

Anhang A

Ergänzende Daten

A.1 Einfluss der Interaktionsstärke und der Temperatur

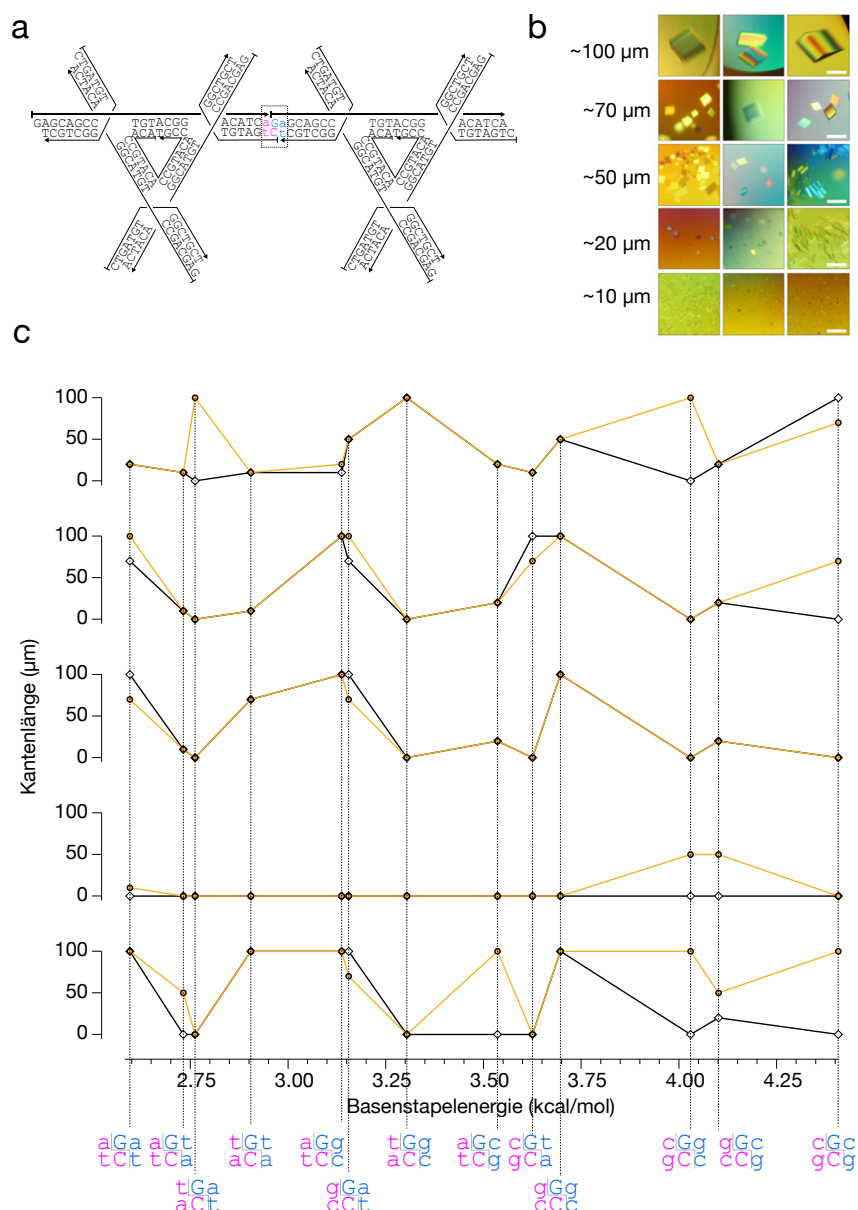


Abbildung A.1 – Sortierung der Daten aus Abbildung 3.8 nach dem NN-Modell. (a) Schematische Darstellung der Sticky-End-Interaktion zwischen zwei DNA-Dreiecken. (b) Typische Bilder von Kristallen der Sequenzvarianten zur Illustration der Daten in (c). Maßstab: 100 µm. (c) Klassifizierung der Kristalle in Puffer I (schwarz, Rauten) und Puffer II (gelb, Kreise) anhand ihrer Kantenlängen wie in (b). Linien zwischen den Markierungen dienen der optischen Führung. Die Sequenzvarianten wurden nach den thermodynamischen Parametern des Nächste-Nachbarn-Modells für DNA-Watson-Crick-Basenpaare in 1M NaCl sortiert [94]. Die Proben wurden separat annealt und in identischen Ansätzen bei 4, 16, 25 und 37 °C und bei einem Temperaturgradienten von 60–20 °C inkubiert (Endkonzentration des DNA-Dreiecks: 60 µM). Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

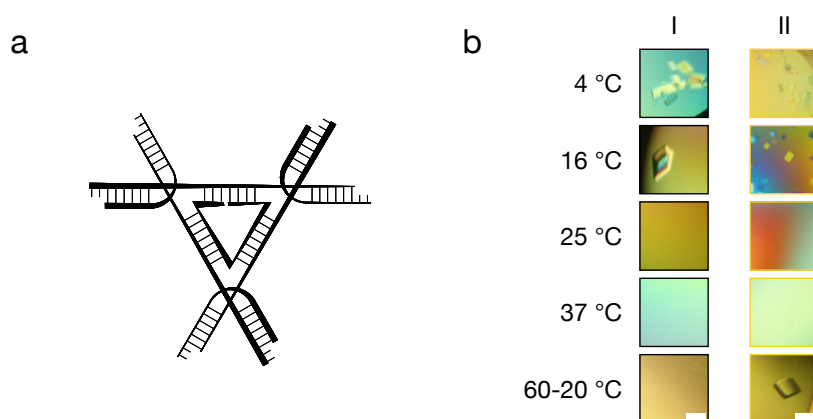


Abbildung A.2 – Temperaturabhängiges Kristallisationsverhalten der GA-Variante. (a) Schematische Darstellung der Strangtopologie der GA-Variante. (b) Typische Bilder von Kristallen der GA-Variante. Die Proben wurden separat annealt und in identischen Ansätzen bei 4, 16, 25 und 37 °C und bei einem Temperaturgradienten von 60–20 °C inkubiert (Endkonzentration des DNA-Dreiecks: 60 µM). Maßstäbe: 100 µm.

A.2 Kristallisation in heterogenen Gemischen

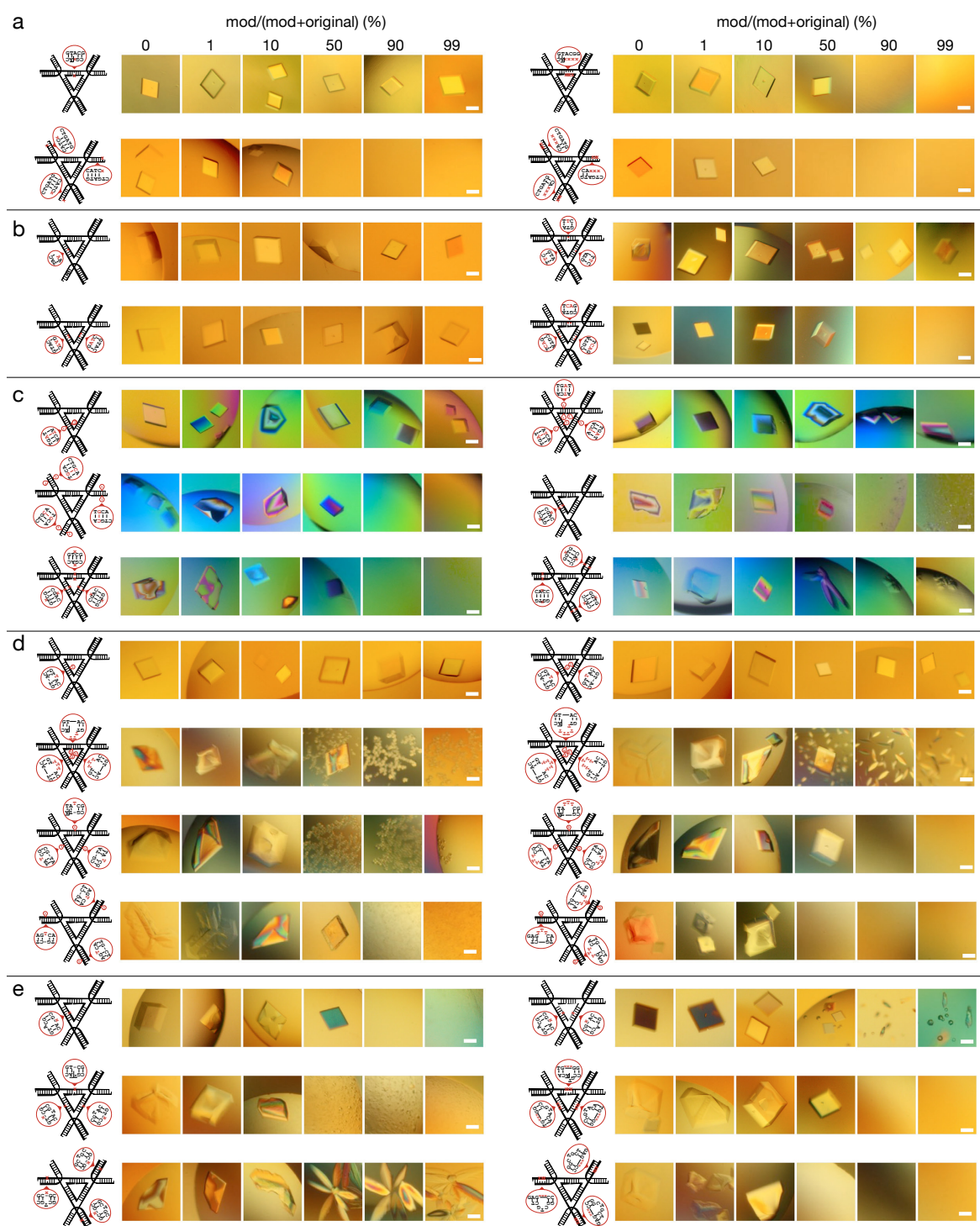


Abbildung A.3 – Übersicht über alle Versuchsreihen in heterogenen Gemischen für die G-Variante in Puffer I. (a-e) Typische Bilder von Kristallen, die bei zunehmendem Anteil an modifizierten Strängen (mod) und abnehmendem Anteil der entsprechenden originalen Stränge (original) gewachsen sind (vgl. Abb. 4.1 a). Schematische Darstellungen zeigen Details der modifizierten Dreiecke mit (a) Strangverkürzungen, (b) Basenfehlpaarungen, (c) Basenpaarinserktionen und -deletionen, (d) Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen und (e) Ausstülpungen durch Einzelstrangdeletionen. Maßstäbe: 100 μm . Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

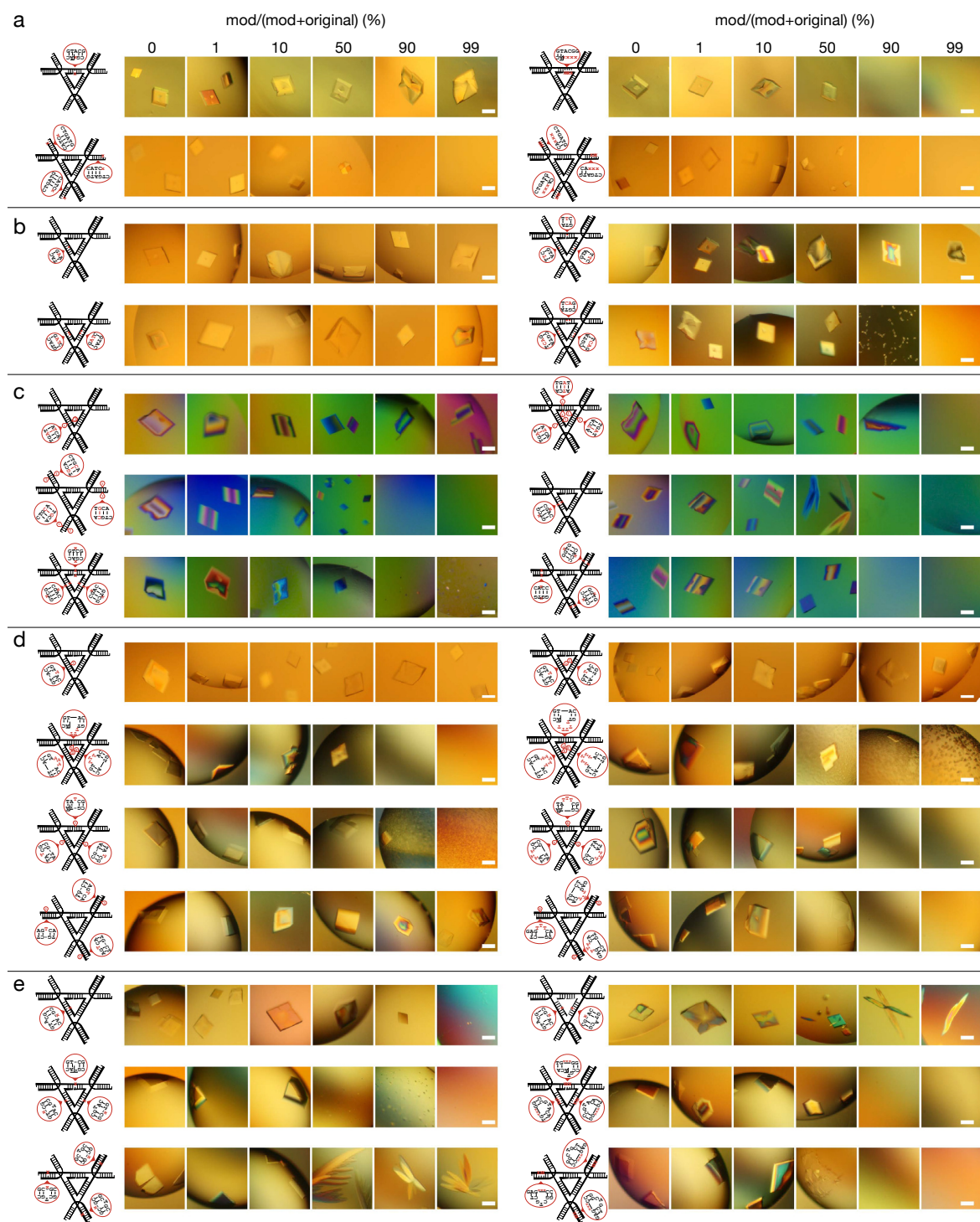


Abbildung A.4 – Übersicht über alle Versuchsreihen in heterogenen Gemischen für die G-Variante in Puffer II. (a-e) Typische Bilder von Kristallen, die bei zunehmendem Anteil an modifizierten Strängen (mod) und abnehmendem Anteil der entsprechenden originalen Stränge (original) gewachsen sind (vgl. Abb. 4.1 a). Schematische Darstellungen zeigen Details der modifizierten Dreiecke mit (a) Strangverkürzungen, (b) Basenfehlpaarungen, (c) Basenpaarinserktionen und -deletionen, (d) Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen und (e) Ausstülpungen durch Einzelstrangdeletionen. Maßstäbe: 100 μm . Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

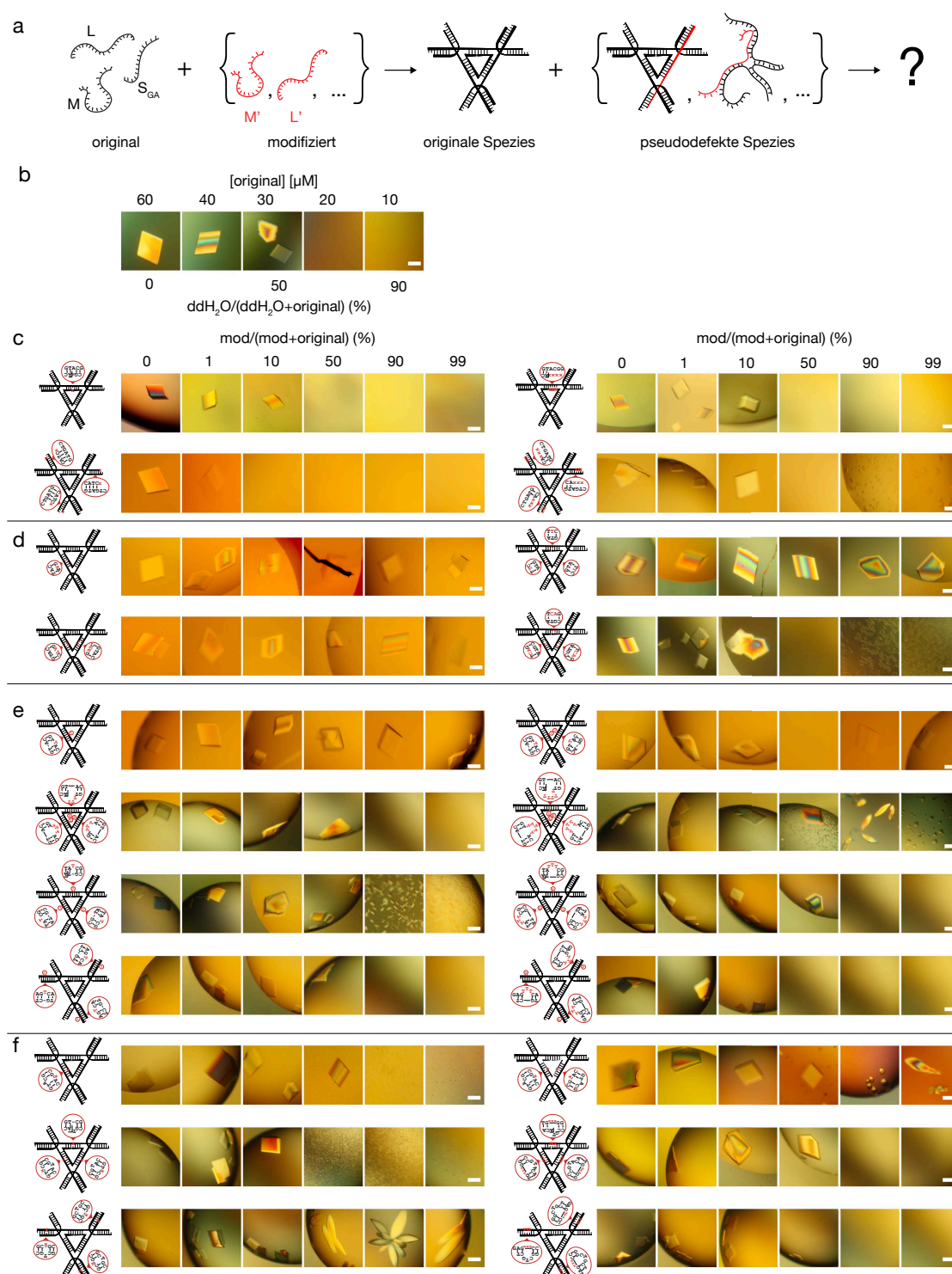


Abbildung A.5 – Übersicht über alle Versuchsreihen in heterogenen Gemischen für die GA-Variante in Puffer II. (a) Schematische Darstellung der Herstellung heterogener Probengemische. Speziell modifizierte Dreiecksstränge (rot) wurden zusammen mit originalen Strängen in angesetzt. (b) Konzentrationsabhängiges Kristallisationsverhalten der GA-Variante in Puffer II. (c-f) Typische Bilder von Kristallen, die bei zunehmendem Anteil an modifizierten Strängen (mod) und abnehmendem Anteil der entsprechenden originalen Stränge (original) gewachsen sind. Schematische Darstellungen zeigen Details für entsprechende G-Varianten, modifiziert GA-Varianten wurden wie dargestellt, allerdings unter Verwendung des S_{GA}-Strangs erzeugt. (c) Strangverkürzungen, (d) Basenfehlpaarungen, (e) Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen und (f) Ausstülpungen durch Einzelstrangdeletionen. Maßstäbe: 100 μm . Teile dieser Abbildung wurden mit freundlicher Genehmigung von [88] adaptiert; © (2016) American Chemical Society.

A.3 Faltungsanalyse der 100-Helixbündel-Objekte

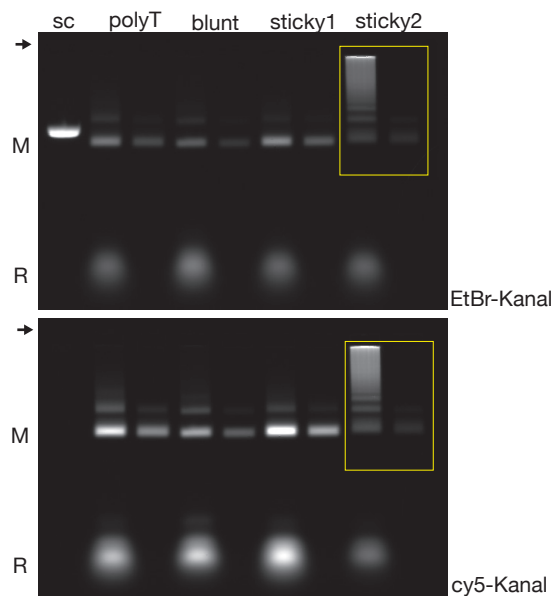


Abbildung A.6 – Faltungsanalyse der Varianten des 100-Helixbündels. Abbildung der gelelektrophoretischen Analyse von unaufgereinigten (links) und PEG-gefällten (rechts) Proben der 100-Helixbündelvarianten mit Polythymine-Überhängen (polyT), Blunt Ends (blunt) und Sticky Ends (sticky1, sticky2) an den Helixenden der formkomplementären Oberflächenelemente. Die Detektion erfolgte im Ethidiumbromid (EtBr)- und Cy5-Kanal. Pfeile markieren die Geltaschen; M: Monomere; R: nicht integrierte Klammeroligonukleotide; sc: Templatstrang p7560. Gelbe Rahmen markieren kontrastverstärkte Regionen. Diese Gel-Analyse wurde von Dominik Renn im Rahmen seiner Tätigkeit als Werkstudent in der AG Dietz im Auftrag der Verfasserin dieser Arbeit durchgeführt.

Anhang B

Material und Methoden

B.1 Puffer

B.1.1 Probenpuffer für DNA-Origami-Objekte

FoBxM

Faltungspuffer ohne Magnesiumchlorid.

- 5 mM Tris-Base
- 1 mM EDTA
- 5 mM NaCl

FoB5

Faltungspuffer mit 5 mM Magnesiumchlorid.

- 5 mM Tris-Base
- 1 mM EDTA
- 5 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂

FoB20

Faltungspuffer mit 20 mM Magnesiumchlorid.

- 5 mM Tris-Base
- 1 mM EDTA
- 5 mM NaCl
- 20 mM MgCl₂

Elektrophoresepuffer

Der Elektrophoresepuffer entspricht 0,5×TBE mit 11 mM Magnesiumchlorid.

- 44,5 mM Tris-Base

- 44,5 mM Borsäure
- 1 mM EDTA
- 11 mM MgCl_2

Fällungspuffer

- 5 mM Tris-Base
- 1 mM EDTA
- 505 mM NaCl
- 15 % (*w/v*) PEG-8000

Fällungspuffer mit 10% fPEG-Anteil

Fällungspuffer, in dem im Mittel jedes zehnte PEG-Molekül an beiden Enden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert ist.

- 5 mM Tris-Base
- 1 mM EDTA
- 505 mM NaCl
- 13,5 % (*w/v*) PEG-8000
- 1,5 % (*w/v*) di-FITC-PEG-8000

Fällungspuffer mit 20% fPEG-Anteil

Fällungspuffer, in dem im Mittel jedes fünfte PEG-Molekül an beiden Enden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert ist.

- 5 mM Tris-Base
- 1 mM EDTA
- 505 mM NaCl
- 12 % (*w/v*) PEG-8000
- 3 % (*w/v*) di-FITC-PEG-8000

B.1.2 Kristallisationspuffer in Ansätzen mit DNA-Dreiecken

Puffer I

- 25 mM Tris-HCl pH 8,5
- 20 mM MgCl_2
- Reservoirlösung: 10× Puffer I

Puffer II

- 25 mM Tris-HCl pH 8,5
- 5 mM MgCl_2
- 50 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- 30 mM $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$
- 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Reservoirlösung: 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Puffer III

- 25 mM Tris-HCl pH 8,5
- 1 M NaCl
- Reservoirlösung: 4 M NaCl

Puffer IV

- 25 mM Tris-HCl pH 8,5
- 55 mM MgCl_2
- 55 mM NaCl
- Reservoirlösung: 10× Puffer IV

B.1.3 Kristallisationspuffer in Ansätzen mit DNA-Origami-Objekten

Alle Kristallisationspuffer für DNA-Origami-Objekte enthielten 25 mM Tris-HCl pH 8,5 und die in den Bildunterschriften angegebenen Komponenten. Die Angaben beziehen sich stets auf die Ausgangskonzentrationen in den Tropfen direkt nach dem Ansetzen der Kristallisationstropfen. Die Konzentration der equilibrierten Tropfen hing von den jeweiligen verwendeten Reservoirlösungen ab.

B.2 Material**B.2.1 Oligonukleotide**

Alle verwendeten, synthetischen DNA-Einzelstränge wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) durch chemische Festphasensynthese hergestellt.

DNA-Dreiecksstränge. Oligonukleotide, die für die Herstellung von DNA-Dreiecken verwendet wurden, wurden von der Firma Eurofins Genomics im HPLC(*high-performance liquid chromatography*)-Reinheitsgrad [98] hergestellt und in lyophilisierter Form verschickt. Die Oligonukleotide wurden in nukleasefreiem Wasser (Qiagen) zu einer Konzentration von etwa 300 μM gelöst. Die tatsächlichen Strangkonzentrationen wurden photometrisch aus 1:10-verdünnten Proben anhand der DNA-Absorption der Oligonukleotide bei 260 nm bestimmt

(Nanodrop, Eppendorf). Der Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide wurde mit Hilfe des Nächste-Nachbarn-Modells berechnet [230, 231].

Klammeroligonukleotide für die Selbstassemblierung von DNA-Origami-Objekten. Oligonukleotide, die als Klammeroligonukleotide für die Herstellung von DNA-Origami-Objekten verwendet wurden, wurden in von der Firma Eurofins Genomics im HPSF(*high pure salt free*)-Reinheitsgrad [98] hergestellt und in Wasser gelöster Form bei einer Konzentration von ca. 100 μM geliefert. Die Oligonukleotide wurden ohne weitere Konzentrationsanpassung verwendet. Stichprobenmessungen zeigten, dass die Konzentration der Oligonukleotide im Allgemeinen im Bereich zwischen 80 μM und 120 μM lag.

B.2.2 Zirkuläre Templatstränge

Templatstränge für Selbstassemblierungsreaktionsmischungen von DNA-Origami-Objekten basieren auf dem einzelsträngigen Genom des Bakteriophagen M13. Es wurden insgesamt vier Varianten mit unterschiedlichen Längen verwendet (7249 bp, 7560 bp, 7704 bp und 8064 bp). Das Templatstrangmaterial, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde im Labor für Biomolekulare Nanotechnologie von Florian Praetorius¹ in flüssigen Bakterienkulturen, die mit Phagen infiziert waren, kultiviert und anschließend aus dem phagenhaltigen Überstand isoliert und aufgereinigt. Das Herstellungs- und Aufreinigungsverfahren wurde in [147] beschrieben.

B.2.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Carl Roth (Karlsruhe) im p.a.-Reinheitsgrad (Pufferan[®], Rotipuran[®]) bezogen. FITC-markiertes PEG-8000 wurde von der Firma chemicell GmbH (Berlin) bezogen.

B.3 Methoden

B.3.1 Herstellung von DNA-Origami-Objekten

Selbstassemblierungsreaktionsmischungen für die Herstellung von DNA-Origami-Objekten enthielten 50 nM Templatstrang und 200 nM Klammeroligonukleotide in FoB20. Die Reaktionsmischungen wurden für 15 min auf 65 °C erhitzt und dann während einer Temperaturrampe inkubiert, die in 1 °C-Schritten mit 2 h pro Schritt von 60 °C auf 40 °C abkühlt.

Ausnahmen. Mit Ausnahme des 42-Helixbündels und des 100-Helixbündels wurden alle DNA-Objekte in der Strukturbibliothek für die Charakterisierung der PEG-Fällung in Mischungen mit 20 nM Templatstrang und 200 nM Klammeroligonukleotide in FoB20 hergestellt (vgl. 5.3). Die Reaktionsmischungen wurden wie beschrieben inkubiert, allerdings wurden die Proben mit 3 h pro 1 °C-Schritt von 60 °C auf 40 °C abgekühlt, nachdem sie für 15 min bei 65 °C erhitzt worden waren.

¹seit 2012 Doktorand in der AG Dietz

B.3.2 Ansetzen der Probengemische für die Kristallisation

Kristallisationsansätze mit DNA-Dreiecken

Die Mischungen der Dreiecksstränge wurden jeweils frisch am Versuchstag auf Basis der ermittelten Konzentrationswerte in nukleasefreiem Wasser angesetzt, wobei im Allgemeinen Volumina im Bereich von 1-50 μl pipettiert wurden.

Für jede Versuchsreihe wurde eine frische *original*-Probe mit Konzentrationen von 30 μM M-Strang, 90 μM L-Strang und 90 μM S-Strang in nukleasefreiem Wasser angesetzt. Die *original*-Probe der G-Variante enthielt die Stränge L, M und S_G , die der GA-Variante enthielt die Stränge L, M und S_{GA} (Sequenzen sind in Kapitel C aufgelistet). Für die verschiedenen Versuchsreihen wurde die *original*-Probe wie folgt verändert oder weiter mit anderen Komponenten vermischt. Falls nicht extra beschrieben, wurden die Kristallisationstropfen wie oben beschrieben angesetzt.

Konzentrationsreihen. Versuchsreihen mit unterschiedlichen Probenkonzentrationen wurden durch Verdünnen der *original*-Probe mit nukleasefreiem Wasser hergestellt.

Versuchsreihen zu den Strangstöchiometrien. Statt der *original*-Probe wurden drei Titrationsreihen für die Dreiecksstränge L, M und S angesetzt, in denen die Standardkonzentration eines bestimmten Stranges in der *original*-Probe um den angegebenen stöchiometrischen Faktor (0,3–2) verändert wurde.

Versuchsreihen mit DNA-Verunreinigungen. Die *original*-Probe wurde mit einer Kompetitorenmischung aus 179 verschiedenen Oligonukleotiden vermischt, von denen jedes eine Konzentration von ca. 560 nM hatte. Die gesamte DNA-Konzentration der Kompetitorenmischung betrug 100 μM . *Original*-Probe und Kompetitorenmischung wurden in den Verhältnissen 1:1 (*v/v*) und 1:9 (*v/v*) vermischt um Gemische mit 50 % bzw. 90 % Anteil (*v/v*) an Kompetitorenmischung zu erhalten, die wie beschrieben für Kristallisationsansätze verwendet wurden. Die Sequenzen der Kompetitorenstränge waren je 42 Basen lange, reverskomplementäre Sequenzabschnitte des einzelsträngigen Phagengenoms p7560, das auf das Genom des M13-Phagen zurückgeht. Die Sequenzen sind in Kapitel C aufgelistet.

Versuchsreihen mit BSA-Verunreinigungen. Die *original*-Probe wurde mit einer kommerziell erhältlichen BSA-Lösung (New England Biolabs Inc., 10 mg/ml) im Verhältnis 9:1 (*v/v*) vermischt. Das BSA-Lösung enthielt 150 μM BSA, 20 mM Tris-HC (pH 8), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA und 50 % (*w/v*) Glycerin.

Versuchsreihen mit TAL-Verunreinigungen. Für diese Experimente wurde eine Sequenzvariante des DNA-Dreiecks verwendet, für die die Armregionen zweier interagierender DNA-Dreiecke eine Erkennungssequenz für das TAL-Protein bildeten. Die Sequenzen der Dreiecksstränge sind in Kapitel C aufgelistet. Die Dreiecksstränge wurden mit einer Stöchiometrie von L:M:S=3:1:3 bei einer M-Strang-Konzentration von 25 μM und entsprechenden L- und S-Strang-Konzentrationen von je 75 μM in 20 mM MgCl_2 angesetzt und annealt, indem sie von 65 °C auf 20 °C mit einer Rampe von 1 °C/min abgekühlt wurden.

Die annealten Dreiecksproben wurden weiter mit Proteinlösung vermischt. 3,3 μl dieser Mischung wurden dann mit 1,7 μl Kristallisationspuffer angesetzt. Hierbei wurden die

Pufferbedingungen für die Ansätze mit TAL-Proteinen ausgehend von Puffer II an die Pufferanforderungen des TAL-Proteins angepasst. Die frisch angesetzten Kristallisationstropfen enthielten dann Konzentrationen von 6 μM DNA-Dreieck, 6 bzw. 12 μM TAL-Protein, 25 mM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM Magnesiumacetat, 30 mM Natriumkacodylat, 5 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Ammoniumsulfat, 100 mM Natriumchlorid und 4 mM TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphin) und equilibrierten in Probenkammern, die durch eine 1,7 M Reservoirlösung aus Ammoniumsulfat abgesättigt waren, während sie mit einer Temperaturrampe von 0,2 °C/h von 40 °C auf 20 °C abgekühlt und weiter bei 20 °C inkubiert wurden. Nach zehn Tagen war das Tropfenvolumen der Kristallisationsansätze auf ca. 10 % des Ausgangsvolumens reduziert.

Versuchsreihen mit Sequenzvarianten der Sticky-End-Region. Dreiecksstränge für die Sequenzvarianten mit unterschiedlichen Sticky-End-Regionen wurden wie die *original*-Probe mit Konzentrationen von 30 μM M-Strang, 90 μM des jeweiligen L-Strangs und 90 μM des jeweiligen S-Strangs in 12,5 mM Tris-HCl, pH 8,5 und 10 mM MgCl_2 angesetzt und annealt, indem sie von 65 °C auf 20 °C mit einer Rampe von 1 °C/min abgekühlt wurden. Die Sequenzen der Stränge sind in Kapitel C aufgelistet. Die vorannealten Proben wurden mit passenden Stammlösungen von Puffer I und Puffer II zu fertigen Kristallisationstropfen vermischt, die eine M-Strang-Konzentration von 6 μM und die Bedingungen von Puffer I bzw. Puffer II enthielten (vgl. Kapitel B.1). Tropfen a 5 μl der vorgemischten Proben wurden auf fünf verschiedene Kristallisationsplatten verteilt, sodass pro Pufferbedingung und Temperatur jeweils sechs identische Kristallisationstropfen für jede Sequenzvariante vorlagen, die mit den entsprechenden Reservoirlösungen von Puffer I und Puffer II angesetzt wurden (siehe Abschnitt *Ansetzen der Kristallisationstropfen*). Die *Sitting-Drop*-Kristallisationsplatten (Intelliplates, ArtRobins Instruments, 48-well-Format) wurden für 21 Tage bei 4, 16, 25, 37 und 50 °C sowie bei einer Temperaturrampe inkubiert, die innerhalb von 5 Tagen mit 0,4 °C/h von 60 °C auf 20 °C abkühlte und danach konstant bei 20 °C gehalten wurde.

Versuchsreihen mit modifizierten DNA-Strängen. Eine *modifiziert*-Probe wurde mit einer M-Strang-Konzentration von 30 μM wie für die *original*-Probe beschrieben angesetzt, allerdings wurden in der *modifiziert*-Probe ein oder zwei der originalen Stränge (L, M, oder S) durch einen (Einzelstrangmodifikationen) oder zwei (Doppelstrangmodifikationen) entsprechende modifizierte Stränge (L', M' oder S') ersetzt. Die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel C aufgelistet. Aus Mischungen der *original*-Probe und *modifiziert*-Probe wurden Versuchsreihen angesetzt, in der der Anteil an *modifiziert*-Probe jeweils 0, 1, 10, 50, 90 und 99 % (v/v) betrug.

Versuchsreihen mit modifizierten und markierten DNA-Strängen. Für die Fluoreszenzverfolgung modifizierter Stränge wurde eine *modifiziert und markiert*-Probe mit einer M-Strang-Konzentration von 30 μM wie für die *modifiziert*-Probe beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Versionen der modifizierten Stränge (L*, M*, oder S*) angesetzt. Die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel C aufgelistet. Aus Mischungen der *original*-Probe und *modifiziert und markiert*-Probe wurden Versuchsreihen angesetzt, in der der Anteil an *modifiziert und markiert*-Probe jeweils 0, 10, 50 und 90 % (v/v) betrug.

Probenherstellung für Kristallisationsansätze mit DNA-Origami-Objekten

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Kristallisationsansätze wurden die gefalteten DNA-Origami-Objekte in einem oder zwei PEG-Fällungszyklen aufgereinigt. In einem letzten Fällungszyklus wurden die Proben aufkonzentriert und in FoB20 (42-Helixbündel) bzw. FoB5 (Varianten des 100-Helixbündels) aufgelöst.

B.3.3 Ansetzen der Kristallisationstropfen

Die verwendeten Kristallisationspuffer wurden am Versuchstag aus einer Stammlösung verdünnt und gefiltert (0,22 μm Porengröße).

Sofern nicht anders angegeben, wurden je 300 μl Reservoirlösung (ungefiltert) und 4 μl 1,25 \times Kristallisationspuffer in den *Sitting-Drop*-Kristallisationsplatten vorgelegt (Intelliplates, ArtRobins Instruments, 24-well- oder 48-well-Format). Anschließend wurde 1 μl Probe (siehe *Ansetzen der Probengemische für die Kristallisation* und *Präparation der DNA-Origami-Proben für die Kristallisation*) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit den Kristallisationspuffertropfen vermischt.

Ansätze mit DNA-Dreiecken. Für jede Probe wurden zweimal vier identische Tropfen in zwei 24-well-Platten angesetzt, wobei die erste Platte Puffer I und als Reservoirlösung eine zehnfache Stammlösung von Puffer I, und die zweite Platte Puffer II und eine Reservoirlösung aus 1,7 M Ammoniumsulfat enthielt. Beide Platten wurden parallel aufgesetzt, bevor sie mit hitzebeständigen Polyolefin-Folien mit selbstklebender Silikonbeschichtung verschlossen wurden (ThermalSeal RTSTM, Excel Scientific). Die verschlossenen Kristallisationsplatten wurden in einem programmierbaren Kühlbrutschrank (EchoThermTM IN35, Torrey Pines Scientific) auf 60 °C aufgeheizt und dann bei einer Temperaturrampe von 0,4 °C/h innerhalb von fünf Tagen auf 20 °C abgekühlt und weiter bei 20 °C inkubiert. Während dieser Zeit reduzierte sich das Tropfenvolumen auf etwa 10 % des Ausgangsvolumens. Nach etwa zehn Tagen wurden die Tropfen lichtmikroskopisch dokumentiert.

Hanging-Drop-Ansätze. Dreieckskristalle, die für die Kryokonservierung gezüchtet wurden, wurden zum Teil in *Hanging-Drop*-Kristallisationsplatten angesetzt (VDX-Plates, Hampton Research). Auf einem Deckgläschen (Hampton Research) wurden jeweils vier Tropfen mit 4 μl Kristallisationspuffer vorgelegt und mit je 1 μl Probe vermischt, bevor das Deckgläschen kopfüber auf einer am oberen Rand mit Vakuumfett beschichteten Probenkammer platziert und festgedrückt wurde. Die Probenkammern waren mit 300 μl Reservoirlösung gefüllt. Die verschlossenen Kristallisationsplatten wurden wie beschrieben zusammen mit anderen *Sitting-Drop*-Platten inkubiert.

Ansätze mit DNA-Origami-Objekten. DNA-Origami-Proben wurden ausschließlich in *Sitting-Drop*-Platten angesetzt. Die Platten wurden grundsätzlich wie beschrieben angesetzt, allerdings variierte hierbei das Volumen und das Mischungsverhältnis von Probe und Kristallisationspuffern. Die jeweiligen Volumen- und Konzentrationsangaben sind direkt in der Bildunterschrift zu den Experimenten notiert. Auch die Reservoirlösungen wurden auf verschiedene Art und Weise mit den Kristallisationspuffern kombiniert, die Bedingungen sind ebenfalls direkt in den Bildunterschriften zu den gezeigten Experimenten notiert. Die verschlossenen Kristallisationsplatten wurden bei Raumtemperatur inkubiert oder auf 45 °C aufgeheizt und dann bei einer Temperaturrampe von 0,4 °C/h innerhalb von fünf Tagen auf 20 °C abgekühlt.

Lichtmikroskopische Dokumentation

Kristallisationsplatten, die vor Juli 2015 angesetzt wurden, wurden an einem Lichtmikroskop im Durchlichtmodus (Zeiss) mit Hilfe einer an das Mikroskop angekoppelten Olympus-Farbkamera dokumentiert. Dies betrifft die Weißlichtaufnahmen der Experimente, die in den Abbildungen 3.6 b, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 a,b, 4.3, 4.4, 4.5, 4.10, 4.12, 4.14 und 4.15 dargestellt sind. Die Proben wurden mit linear polarisiertem Licht belichtet und durch ein $5\times$ Objektiv sowie einen zweiten Polfilter (Analysator) abgebildet. Die Maßstäbe der Aufnahmen basieren auf der Skala eines Objektmikrometers (1 mm-Länge, unterteilt in 100 μm - und 10 μm -Linien), das bei identischen Mikroskopeinstellungen abgebildet wurde.

Alle Kristallplatten, die fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide enthielten, sowie Kristallplatten, die nach Juli 2015 angesetzt wurden (Abb. 3.2, 3.3, 3.4, 3.6 a, 3.7, 3.11 c, 4.6 und 4.7), wurden mit einem Stereomikroskop der Firma Leica (M165FC) mit angekoppelter Fluoreszenzbelichtungsquelle (EL6000) und angekoppelter Farbkamera (Leica DFC 7000 T) dokumentiert. Die Maßstäbe der Aufnahmen basieren auf der internen Kalibrierung des Geräts und wurden mit jeder Bilddatei abgespeichert.

Weißlichtaufnahmen am Stereomikroskop M165FC. Weißlichtaufnahmen wurden im Durchlichtmodus (Leica TL5000 Ergo Durchlichtbasis) mit linear polarisiertem Weißlicht beleuchtet und durch einen weiteren linearen Polfilter (Analysator) betrachtet. Die Aufnahme der Kristallbilder (12-bit TIF-Dateien) erfolgte im Farbkameramodus für eine Belichtungszeit von 25 ms bei einem Detektor-Verstärkungsfaktor von 0, einer Belichtungsintensität von 90 % und einer Blendenöffnung von 60–85 %

Fluoreszenzdetektion. Das Anregungslicht der Metallhalid-Fluoreszenzquelle (EL6000) wurde über einen dritten Strahlengang im Auflichtmodus auf die Proben geführt, während das Emissionssignal wurde durch die beiden Stereostrahlengänge des Mikroskops betrachtet wurde. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Proben im Cy3-Kanal unter Verwendung des Filtersatzes ET-Cy3 (Anregungsfilter ET545/25 nm, Emissionsfilter ET605/70 nm) für 1,5 ms beleuchtet und im monochromatischen Kameramodus als 12-bit TIF-Dateien mit einem Detektor-Verstärkungsfaktor von 5 dokumentiert.

Für die Ablichtung des unspezifischen Fluoreszenzsignals von Cyanin-5-Farbstoffen wurde in manchen Fällen neben dem Cy3-Kanal auch der Cy2-Kanal mit dem Filtersatz ET-GFP (Anregungsfilter ET470/40 nm, Emissionsfilter ET525/50 nm) verwendet.

B.3.4 Auswertung der Tropfen

Kristallwertung. Um die Vergleichbarkeit zwischen mehreren Versuchsreihen zu erleichtern, wurde die Morphologie der Kristalle anhand makroskopisch erkennbarer Merkmale bewertet, um die Kristallwertungen später in eine graphische Darstellung zu übertragen. Für die Kristallwertung wurden Aspekte wie die Größe und Form der Kristalle berücksichtigt, ob die Kristalle einzeln, verzwilligt oder in großen Mengen vorlagen und ob sie erkennbare Defekte in den Seitenflächen oder -kanten aufwiesen. Die Kristallwertung lässt dabei keine Rückschlüsse auf das Streuvermögen der Kristalle zu. Im Hinblick auf die rhomboedrische Equilibriumform der Dreieckskristalle wurde für jede dieser Betrachtungskategorien ein Punkteschema erstellt, dass verschiedene Kristallmorphologien für dieses Kriterium passend bewertete (Abb. B.1 a, b). Aus der Summe der einzelnen Punktwerte für einen Probentropfen ergab sich eine Tropfenwertung, die über vier identische Probentropfen gemittelt wurde (Abb. B.1 c). Die maximale

Kristallwertung von 100 wäre von einzelnen und fehlerfreien rhomboedrischen Kristallen mit einer Kantenlänge von etwa $200\ \mu\text{m}$ in vier identischen Tropfen erreicht worden.

a	Kantenlänge		Seitenverhältnis		Einkristallinität		Kantendefekte		Flächendefekte	
	< 10 μm	1	Stäbe, Krümel	1	Mengen	1	nicht definiert, rau	1	stark	1
	10–50 μm	5	sehr flach	10	Zwillinge, Drillinge	5	nicht vollständig	5	gemischt	5
	50–100 μm	10	flach	20	gemischt	10	gemischt	10	klein	10
	100–150 μm	15	quader-förmig	25	einzel	15	glatt, definiert	20	keine	15
	150–200 μm	18	rhomboedrisch	30						
	> 200 μm	20								

b

c

	1	2	3	4	
Kantenlänge	15	18	18	15	
Seitenverhältnis	25	25	25	25	
Einkristallinität	15	15	15	15	
Kantendefekte	20	20	20	20	
Flächendefekte	10	1	5	15	
Summe	85	79	83	90	$84,2 \pm 4,5$

Abbildung B.1 – Auswertung der Probestropfen anhand der Kristallmorphologie. (a) Punkteschema für die Bewertung entstandener Kristalle anhand ihrer Morphologie. (b) Abbildungen zeigen vier identische, equilibrierte Probestropfen, die das originale DNA-Dreieck bei einer Konzentration von $60\ \mu\text{M}$ enthalten. Maßstäbe: $100\ \mu\text{m}$ (c) Beispielbewertung der Kristallen in den Probestropfen aus (b). Die resultierende Kristallwertung stellt den Mittelwert aus vier identischen Probestropfen dar. Die Fehlerangabe gibt die Standardabweichung aus den vier Werten wieder.

Fluoreszenzauswertung in Tropfen mit fluoreszenzmarkierten Dreieckssträngen. Die Gesamtfluoreszenz in den Tropfen wurde mit Hilfe der Software Igor Pro (V.6.37, WaveMetrics, Oregon, USA) durch Vergleich der mittleren Intensität pro Pixel in der Fläche, die von Kristallen eingenommen wurde mit der mittleren Intensität pro Pixel in der Fläche des Tropfenhintergrunds ausgewertet. Hierfür wurden die Graustufenwerte der Originalabbildungen (Abb.B.2 a und e zeigen kontrastverstärkte, rot eingefärbte Versionen der originalen Bilddateien) innerhalb des Tropfenradius (Abb.B.2 b, f) mit binären Masken der Kristallfläche (cr) (Abb.B.2 c, h) bzw. der Hintergrundfläche (bg) (Abb.B.2 c, h) multipliziert. Die so erhaltenen Graustufenwerte wurden aufsummiert und über die Kristallfläche (cr) bzw. Hintergrundfläche (bg) gemittelt. Für intensiv eingefärbte Kristalle (Abb.B.2 a-d) wurden die Grenzen der Kristallfläche über einen Schwellwert bestimmt (Abb.B.2 a-d). Für schwach eingefärbte Kristalle vor stark fluoreszierendem Hintergrund wurden die Grenzen der Kristallflächen mit Hilfe der

Software ImageJ64 (1.47v, National Institute of Health, USA) unter Berücksichtigung des Weißlichtsignals polarisierender Kristalle manuell festgelegt (Abb.B.2 a-i).

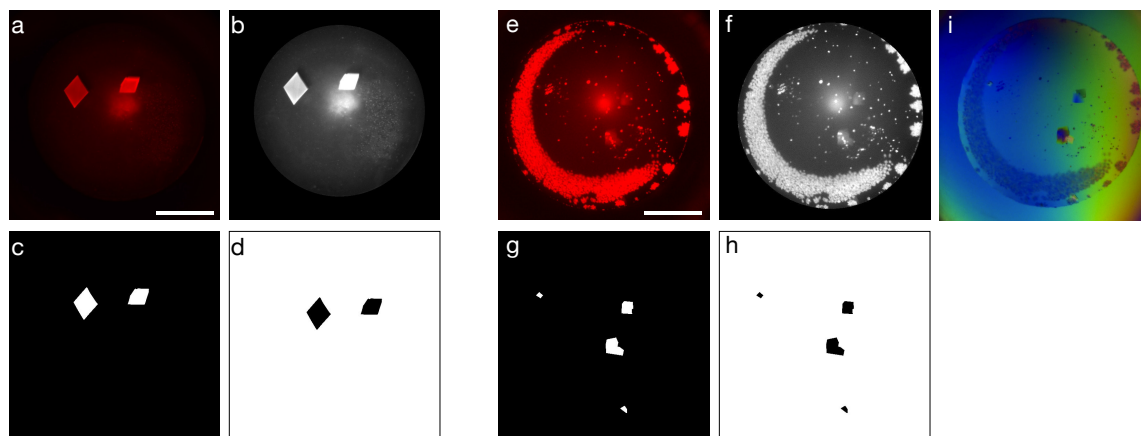


Abbildung B.2 – Auswertung des Fluoreszenzsignals in den Probentropfen. (a-d) Beispielbilder eines Probentropfens mit stark fluoreszierenden Kristallen. (a) Originalabbildung des Probentropfens. Die Abbildung ist rot eingefärbt und kontrastverstärkt dargestellt. (b) Darstellung des Tropfenradius, über den die Graustufenwerte aufsummiert wurden. Die Fläche außerhalb des Tropfenradius ist maskiert dargestellt; die Abbildung zeigt eine kontrastverstärkte Darstellung der Bilddatei. (c) Darstellung der Binärmaske für die Kristallfläche aus (a). (d) Darstellung der Binärmaske für die Hintergrundfläche aus (a). (e-h) Daten wie in (a-d) für ein weiteres Datenbeispiel mit schwach fluoreszierenden Kristallen und stark fluoreszierendem Hintergrund. (i) Abbildung des Probentropfens aus (e) unter linear polarisiertem Weißlicht. Maßstäbe: 500 μm .

Röntgenstreuemessungen der Kristalle

Kryokonservierung. Mit Hilfe von CryoLoops (Hampton Research, Molecular Dimension) wurden die Kristalle von Carina C. de Oliveira Mann² oder unter ihrer Anleitung in eine Kryolösung aus 30 % (v/v) Glycerin, 250 mM Tris-HCl und 200 mM Magnesiumchlorid übertragen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Streudaten. Röntgenstreudaten wurden von Carina C. de Oliveira Mann² bei einer Wellenlänge von 1 Å an der Beamline SLS X06SA (Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) aufgenommen. Die Streumuster wurden mit $\Delta\Phi=0,5^\circ$, einer Belichtungszeit von 0,5 s, 50 % Strahltransmission, einem Detektorabstand von 640 mm und bei einer Temperatur von 100 K aufgenommen.

B.3.5 Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Analysen der Proben wurden sowohl für die Analyse von DNA-Origami-Proben als auch für die Analyse der Faltungsausbeute verschiedener DNA-Dreiecksvarianten verwendet. Anhand der Laufweite der Monomere wurde in beiden Fällen die Assemblierung der Zielobjekte nachgewiesen. Weitere Banden in den Gelspuren gaben zudem Aufschluss über die Reinheit der Proben.

²Lehrstuhl für strukturelle Molekularbiologie, AG Hopfner am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Gelelektrophorese von DNA-Dreiecken

Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Dreiecksstränge mit einer Stöchiometrie von $L:M:S=3:1:3$ in Puffer I mit einer M-Strang-Konzentration von $6\text{ }\mu\text{M}$ angesetzt und annealt, indem sie von $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Rampe von $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ abgekühlt wurden. Die annealten Proben wurden 1:10 in Puffer I verdünnt und mit sechsfachem Gelprobenpuffer (15 % Ficoll 400, 0,15 % Bromphenolblau, 5 mM Tris-HCl, pH 8,5) vermischt.

Gelelektrophorese. Die Analyse der Proben erfolgte in 5 % (w/v)-igen Agarosegelen, die Elektrophoresepuffer (siehe Kapitel B.1) und den Farbstoff SybrGold (ThermoFisher) in einer Verdünnung von 1:15 000 enthielten. Für die Agarosegele wurden 6,25 mg Agarose (Ultra-pure, Invitrogen) mit 0,5-fachem TBE-Puffer auf 125 mg aufgefüllt und in mehreren Zyklen aus kurzem Erhitzen und Schwenken des Kolbens so lange erhitzt, bis eine klare, flüssige, Gelmasse entstanden war. Die Masse wurde durch Auffüllen von destilliertem Wasser auf 124 mg abgekühlt und erneut geschwenkt, bis die Gelmasse homogen war. Dann wurden 1 ml 1,375 M Magnesiumchlorid und $8\text{ }\mu\text{l}$ SybrGold zugegeben und durch erneutes Schwenken im Gel verteilt, bevor es zum Aushärten in ein horizontales Gelelektrophoresesystem gegossen wurde (OwlTM EasyCastTM Horizontale Gelsysteme, ThermoFisher). Die Proben wurden für 3 h bei 90 V in einer eiswassergekühlten Gelkammer, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt war, aufgetrennt. Als Referenz für die Laufweite diente eine DNA-Leiter (O'RangeRulerTM 10 bp DNA-Leiter, ThermoFisher).

Gelelektrophorese von DNA-Origami-Objekten

Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese. Die Proben wurden mit sechsfachem Gelprobenpuffer (15 % Ficoll 400, 0,15 % Bromphenolblau, 5 mM Tris-HCl, pH 8,5) vermischt und in die Geltaschen aufgetragen.

Gelelektrophorese. Die Analyse der Proben erfolgte in 2 % (w/v)-igen Agarosegelen, die Elektrophoresepuffer (siehe Kapitel B.1) und, falls nicht anders angegeben, $1\text{ }\mu\text{M}$ Ethidiumbromid enthielten (Herstellung wie oben für andere Mengen beschrieben). Die Proben wurden für 1,5–2 h bei 70–90 V in einer wassergekühlten Gelkammer, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt war, aufgetrennt.

Dokumentation der Gele

Nach der Probenauftrennung wurden die Agarosegele mit einem Laserscanner (Typhoon FLA9500, GE Healthcare) bei einer Auflösung von $50\text{ }\mu\text{m}$ pro Pixel gescannt um 16-bit TIF-Bilddateien zu erhalten. Die Detektion des SybrGold-Signals und des FITC-Signals erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 473 nm und in einem Emissionsfenster von 520–540 nm. Das Fluoreszenzsignal von Ethidiumbromid, *Cyanin-3* und *ATTO550* wurde bei 532 nm angeregt und bei $\geq 575\text{ nm}$ oder in einem Fenster von 560–580 nm detektiert. Das *Cyanin-5*-Signal wurde bei 635 nm angeregt und bei $\geq 665\text{ nm}$ detektiert.

B.3.6 Negativkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Negativkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde genutzt um die strukturelle Beschaffenheit von DNA-Origami-Objekten zu überprüfen und abzubilden.

Probenpräparation. Falls nicht anders angegeben wurden die Proben in FoB20 bis zu einer Konzentration von 1–20 nM verdünnt. 2–5 μl Probe wurden auf die kohlebedampfte Seite eines plasmagereinigten Kupfergrids mit einer Formvar-Supportschicht (Cu400, Science Services, München) aufgetragen und für 30–60 Sekunden inkubiert. Der Probenüberstand wurde mit einem Filterpapier abgenommen (Whatman), die Oberfläche des Probengrids wurde kurz mit 5 μl einer Kontrastmittellösung – einer 2 % (w/v)-Uranylformiatlösung, die 25 mM Natriumhydroxid enthielt – gewaschen und anschließend in 20 μl der Kontrastmittellösung für 30–60 Sekunden inkubiert. Der Überstand wurde sorgfältig mit einem Filterpapier abgenommen und die Probenträger wurden für mindestens 20 Minuten zum Trocknen inkubiert.

Probenabbildung. Das Abbilden der DNA-Objekte erfolgte mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop bei einer Betriebsspannung von 100 kV und einer Vergrößerung von $\times 28\,500$. Bilddateien wurden elektronisch mit einer AMT 4 Megapixel CCD Camera (Advanced Microscopy Techniques) im 16-bit TIF-Format aufgenommen. Die angegebenen Maßstäbe basieren auf Kalibrierdaten, die von Christian Wachauf³ anhand der Gitterkonstanten eines zweidimensional abgebildeten Katalase-Kristalls ermittelt wurden.

Bildmittelung. Einzelpartikelaufnahmen für die Bildmittelung wurden mit Hilfe der Software *EMAN2 boxing routine* selektiert und isoliert [232]. Die Berechnung gemittelter Einzelpartikel-Darstellungen erfolgte unter Verwendung des Xmipp mlf2d Algorithmus [233].

B.3.7 PEG-Fällung

Mit Hilfe der PEG-Fällung wurden Selbstassemblierungsreaktionsmischungen aufgereinigt und konzentriert. Eine detaillierte Anleitung und Beschreibung zur PEG-Fällung findet sich in Kapitel 5 und wurde außerdem für [128] zusammengestellt.

Standardprotokoll. Selbstassemblierungsreaktionsmischungen in 20 mM Magnesiumchlorid wurden sorgfältig 1:1 (v/v) mit Fällungspuffer vermischt und in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5420, Hamburg) für 25 min bei 16 000 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet wurde anschließend wie angegeben im Zielpuffer gelöst.

PEG-Fällung von 20 ml. Faltungsansätze im 20 ml-Maßstab wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Fällungspuffer vermischt und für 40 min bei 15 000 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert; Rückstände des Überstands wurden mit einer Pipette abgenommen.

Ausnahmen. In Experimenten, in denen rückständiges fPEG quantifiziert wurde, wurde der restliche Überstand, der nach dem Abpipettieren auf Grund der Oberflächenspannung über dem Pellet verblieb, mit einem Filterpapierstreifen (Whatman) abgenommen (vgl. Abb 5.5).

B.3.8 Ultrafiltration

Ultrafiltration wurde unter Verwendung von Amicon Ultra-0.5-Filtrationseinheiten (Millipore) mit Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa, 30 kDa und 100 kDa durchgeführt. Die Filtrati-

³seit 2011 Doktorand in der AG Dietz

onseinheiten wurden zunächst mit FoB20 gefüllt und durch Zentrifugation 2 min bei 10 000 g gespült. Anschließend wurden 50 μ l Probe aufgetragen und mit FoB20 auf 500 μ l aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend für 30 min bei 2000 g zentrifugiert und der Filterdurchfluss wurde verworfen. Weitere Waschzyklen wurden durch erneutes Auffüllen der Filtrationseinheit mit FoB20 und erneute Zentrifugation durchgeführt. Die Rückgewinnung der Probe aus der Filtrationseinheit erfolgte durch Invertieren der Filtrationseinheit und Zentrifugation für 10 min bei 1000 g.

B.3.9 Gelaufreinigung

Die Gelaufreinigung von DNA-Origami-Proben erfolgte nach gelelektrophoretischer Trennung der Proben in einem 1.5 % (*w/v*)-Agarosegel, das 1 μ M Ethidiumbromid enthielt und mit Präparativen Geltaschen für Probenvolumina bis zu 65 μ l hergestellt wurde. Gelbanden von Interesse wurden auf einem UV-Lichttisch visualisiert und ausgeschnitten. Zur physikalischen Extraktion der DNA-Origami-Proben wurden die Gelstücke in eine Freeze'N Squeeze Filtrationseinheit (0.45 μ m, Biorad) übertragen und für 10 min bei 10 000 g zentrifugiert.

B.3.10 Sedimentation mittels Ultrazentrifugation

Die Sedimentation mittels Ultrazentrifugation wurde angewandt um DNA-Origami-Proben aufzukonzentrieren und von restlichen PEG-Molekülen zu trennen. Die Sedimentation erfolgte in einer Mikroultrazentrifuge mit Vakuumpumpe (OptimaTM Max-TL, Beckman Coulter) unter Verwendung eines Festwinkelrotors mit einem Fassungsvermögen von 8 \times 3.5 ml (TLA-110, Beckman Coulter). Im folgenden wird die Versuchsdurchführung der Experimente in dieser Arbeit beschrieben. Ein optimiertes Protokoll, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde ist in Kapitel 5 beschrieben und wurde in Zusammenarbeit mit Floris Engelhardt⁴ für [128] weiter optimiert und zusammengestellt.

Zentrifugationsgefäße. Für die Ultrazentrifugation wurden entweder 1,5 ml Probe in ein verschließbares Polypropylen-Reaktionsgefäß (Microfuge[®], Beckman Coulter) in Kombination mit passendem Adaptor oder 1,5–3,2 ml Probe in ein offenes Polycarbonat-Reaktionsgefäß übertragen und mit entsprechend gefüllten Gegengewichten austariert. Die Probenvolumina wurden bis zum vorgeschriebenen Minimalvolumen von 1,5 ml mit FoB5 aufgefüllt. Die verschließbaren Polypropylen-Gefäße sind laut Herstellerangaben nur für einen Zentrifugationszyklus geeignet und wurden für einmalige Aufkonzentrationsschritte verwendet (vgl. Abb 5.10). Die offenen Polycarbonat-Gefäße sind laut Herstellerangaben wiederverwendbar und wurden für größere Probenvolumina oder Anwendungen mit mehreren Zentrifugationszyklen verwendet (vgl. Abb 5.11).

Zentrifugation. Sobald das Vakuum in den Zentrifugationskammern aufgebaut war, wurden die Proben für 30–90 min bei den angegebenen Rotationsgeschwindigkeiten (45 000–60 000 rpm) zentrifugiert. Nach Anhalten des Rotors wurden die Zentrifugationsröhrchen vorsichtig auf einen Probenständer transferiert und der Überstand wurde von oben durch vorsichtiges Abpipettieren in den angegebenen Volumenfraktionen abgenommen. Die Pellets wurden zum Lösen über Nacht bei Raumtemperatur oder für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert.

⁴seit 2015 Doktorandin in der AG Dietz

B.3.11 Probenquantifizierung

Auswertung aus Agarosegelen

Um die Effizienz verschiedener Aufreinigungsmethoden zu bewerten wurden Testproben vor und nach den Aufreinigungsschritten gelelektrophoretisch analysiert und quantifiziert. Hierfür wurden Querschnittsintensitätsprofile der Gelspuren berechnet, indem die Graustufenwerte entlang einer Gelspur über einen 20–75 Pixel breiten Bereich gemittelt wurden. Nach einer linearen Hintergrundkorrektur der Querschnittsprofile wurden die Regionen von Interesse durch Integration der Fläche unter den Zielbanden vor- und nach der Aufreinigung quantifiziert und verglichen.

Photometrische Quantifizierung aufgereinigter Proben

Die photometrische Quantifikation eignet sich für die Analyse aufgereinigter DNA-Origami-Proben, die keine überschüssigen Klammeroligonukleotide mehr enthalten, da diese ebenfalls bei der DNA-spezifischen Wellenlänge von 260 nm absorbieren würden.

Die Quantifizierung von Proben, die mittels Ultrazentrifugation sedimentiert wurden, erfolgte durch Vergleich des Absorptionssignals bei 260 nm in der Probe vor und in verschiedenen Volumenfraktionen nach der Sedimentation. Die Messung wurde an einem Nanophotometer durchgeführt (Nanodrop 800, Thermo Scientific).

Quantifizierung des FITC-Signals nach der Ultrazentrifugation. Da die Quantifizierung von FITC-markiertem PEG-8000 vor und nach der Ultrazentrifugation konnte durch Fluoreszenzdetektion des FITC-Signals bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge von 516 nm in einem Realtime-PCR-Detektor (Mx3005p RT-PCR System, Agilent) erfolgen, da beide Proben bei gleichen Pufferbedingungen vorlagen.

Anhang C

Sequenzen

C.1 DNA-Dreiecke

Tabelle C.1 – Liste der Oligonukleotidsequenzen für originale Dreicksvarianten. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind von 5' nach 3' notiert. Orange Einfärbung und Sternchen bezeichnen fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Intern markierte Stränge enthalten ein X an der Position der amino-dT-Base. Die Bezeichnung S ohne weitere Kennzeichnung bezieht sich im Text auf S_G -Strang, der für die Herstellung der G-Variante verwendet wurde. GA-Varianten wurden durch Verwendung der Stränge L, M und S_{GA} hergestellt.

Originale Dreiecksstränge

L	GAGCAGCCTGTACGGACATCA	
L*	GAGCAGCCXGTACGGACATCA	X: amino-dT-atto550
M	ACACCGTACACCGTACACCGT	
M*	Cy3-ACACCGTACACCGTACACCGT	
S_G	CTGATGTGGCTGCT	
S_G^*	CTGATGTGGCXGCT	X: amino-dT-atto550
S_{GA}	TCTGATGTGGCTGC	

Tabelle C.2 – Liste der Sequenzen pseudodefekter Dreiecksstränge. Modifikationen der pseudodefekten Stränge sind für Insertionen und Sequenzveränderungen rot hervorgehoben. Regionen in denen Basenpaare weggelassen wurden, sind unterstrichen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind von 5' nach 3' notiert. Orange Einfärbungen mit Sternchen und Strich bezeichnen fluoreszenzmarkierte und modifizierte Dreiecksstränge. Intern markierte Stränge enthalten ein X an der Position der amino-dT-Base.

Pseudodefekte Dreiecksstränge

Strangverkürzungen

M'(3'-1) ACACCGTACACCGTACACCG_
 M^{*}'(3'-1) Cy3-ACACCGTACACCGTACACCG_
 M'(3'-4) ACACCGTACACCGTACA____
 M^{*}'(3'-4) Cy3-ACACCGTACACCGTACA____
 L'(3'-1) GAGCAGCCTGTACGGACATC_
 L'(3'-3) GAGCAGCCTGTACGGACA____
 L^{*}'(3'-3) GAGCAGCCXGTACGGACA____ X: amino-dT-atto550

Basenfehlpaarungen

M'(1MM) ACACCGAACACCGTACACCGT
 M'(2x2MM) ACACCGATCACCGATCACCGT
 L'(1MM) GAGCAGCCTGTTCGGACATCA
 L'(2MM) GAGCAGCCTGTACAGGACATCA

Basenpaarinsertionen

ML'(+1bp) M'(1x8ML) ACACCGTATCACCGTACACCGT
 L'(8ML) GAGCAGCCTGATACGGACATCA
 ML^{*}'(+1bp) M^{*}'(1x8ML) Cy3-ACACCGTATCACCGTACACCGT
 L'(8ML) GAGCAGCCTGATACGGACATCA
 ML'(+3bp) M'(3x8ML) ATCACCGTATCACCGTATCACCGT
 L'(8ML) GAGCAGCCTGATACGGACATCA
 ML^{*}'(+3bp) M^{*}'(3x8ML) Cy3-ATCACCGTATCACCGTATCACCGT
 L'(8ML) GAGCAGCCTGATACGGACATCA
 LS'(+3bp) S_G'(8SL) CTGCATGTGGCTGCT
 S_G^{*}'(8SL) CTGCATGTGGCXGCT X: amino-dT-atto550
 L'(8SL) GAGCAGCCTGTACGGACATGCA

Tabelle C.3 – Fortsetzung der Liste der Sequenzen pseudodefekter Dreiecksstränge. Modifikationen der pseudodefekten Stränge sind für Insertionen und Sequenzveränderungen rot hervorgehoben.

Basenpaardeletionen

ML'(-1bp)	M'(1x6ML)	ACACCG <u>A</u> CACCGTACACCGT	
	L'(6ML)	GAGCAGCCTGT <u>TC</u> GGACATCA	
ML ^{*'(-1bp)}	M ^{*'(1x6ML)}	Cy 3-ACACCG <u>A</u> CACCGTACACCGT	
	L'(6ML)	GAGCAGCCTGT <u>TC</u> GGACATCA	
ML'(-3bp)	M'(3x6ML)	ACACCGACACCGACACCG	
	L'(6ML)	GAGCAGCCTGT <u>TC</u> GGACATCA	
LS ^{*'(-3bp)}	M ^{*'(3x6ML)}	Cy 3-ACACCGACACCGACACCG	
	L'(6ML)	GAGCAGCCTGT <u>TC</u> GGACATCA	
LS'(-3bp)	S _G '(6SL)	CTGATGTG <u>GT</u> GCT	
	S _G ^{*'(6SL)}	CTGATGTG <u>G</u> XGCT	X: amino-dT-atto550
	L'(6SL)	GAGC <u>AC</u> CTGTACGGACATCA	

Ausstülpungen durch Einzelstranginsertionen

	M'(Ins1)	ACACCGT <u>T</u> ACACCGTACACCGT	
	M'(Ins2x1)	ACACCGT <u>T</u> ACACCGT <u>T</u> ACACCGT	
	M'(Ins3x3)	ACACCGT <u>TTT</u> ACACCGT <u>TTT</u> ACACCGT <u>TTT</u>	
	M ^{*'(Ins3x3)}	Cy 3-ACACCGT <u>TTT</u> ACACCGT <u>TTT</u> ACACCGT <u>TTT</u>	
	M'(Ins3x5)	ACACCGT <u>TTTTT</u> ACACCGT <u>TTTTT</u> ACACCGT <u>TTTTT</u>	
	M ^{*'(Ins3x5)}	Cy 3-ACACCGT <u>TTTTT</u> ACACCGT <u>TTTTT</u> ACACCGT <u>TTTTT</u>	
	L(Ins1)	GAGCAGCCTGT <u>A</u> TCGGACATCA	
	L ^{*(Ins1)}	GAGCAGCCXGT <u>A</u> TCGGACATCA	X: amino-dT-atto550
	L'(Ins3)	GAGCAGCCTGT <u>ATT</u> TCGGACATCA	
	L'(5'Ins1)	GAG <u>T</u> CAGCCTGTACGGACATCA	
	L'(5'Ins3)	GAG <u>TTT</u> CAGCCTGTACGGACATCA	
	L ^{*'(5'Ins3)}	GAG <u>TTT</u> CAGCCXGTACGGACATCA	X: amino-dT-atto550

Ausstülpungen durch Einzelstrangdeletionen

	M'(Del1)	ACACCG <u>A</u> CACCGTACACCGT	
	M'(Del2)	ACACCG <u>A</u> CACCG <u>A</u> CACCGT	
	M ^{*'(Del2)}	Cy 3-ACACCG <u>A</u> CACCG <u>A</u> CACCGT	
	L'(Del1)	GAGCAGCCTGT <u>TC</u> GGACATCA	
	L'(Del3)	GAGCAGCCTG <u>GG</u> GACATCA	
	L'(5'Del1)	GAGC <u>G</u> CCTGTACGGACATCA	
	L'(5'Del3)	GAG <u>C</u> CCTGTACGGACATCA	
	L ^{*'(5'Del3)}	GAGC <u>C</u> XGTACGGACATCA	

Tabelle C.4 – Liste der Sequenzen für Sequenzvarianten der G-Variante. L- und S-Stränge für die Erzeugung von DNA-Dreiecken mit veränderten Sequenzen in der Armregion (pink) und in den Nachbarpositionen zum G-C-Sticky End. Alle gelisteten Dreiecksvarianten wurden in Kombination mit originalem M-Strang erzeugt (siehe Tab.C.1. Die veränderte Position der Nukleotide ist durch Kleinbuchstaben hervorgehoben. Sequenzen sind von 5' nach 3' notiert.

Kristallisationsansätze mit TAL-Proteinen

cGt	L'(TAL) g TcAGCCTGTACGG t ATGCTC	TAL Erkennungssequenz
	S _G '(TAL) c GAGC A TAGGCTG A	TAL Erkennungssequenz

Sequenzvarianten des G-C-Sticky Ends

cGc	L(cGc) GcGCAGCCTGTACGGACATC c
	S(cGc) CgGATGTGGCTG C g
tGt	L(tGt) GtGCAGCCTGTACGGACATC t
	S(tGt) CaGATGTGGCTG C a
gGg	L(gGg) GgGCAGCCTGTACGGACATC g
	S(gGg) CcGATGTGGCTG C c
gGa	L(gGa) GaGCAGCCTGTACGGACATC g
	S(gGa) CcGATGTGGCTG C t
cGt	L(cGt) GtGCAGCCTGTACGGACATC c
	S(cGt) CgGATGTGGCTG C a
tGa	L(tGa) GaGCAGCCTGTACGGACATC t
	S(tGa) CaGATGTGGCTG C t
tGg	L(tGg) GgGCAGCCTGTACGGACATC t
	S(tGa) CaGATGTGGCTG C c
cGg	L(cGg) GgGCAGCCTGTACGGACATC c
	S(cGg) CgGATGTGGCTG C c
aGc	L(aGc) GcGCAGCCTGTACGGACATC a
	S(aGc) CtGATGTGGCTG C g
aGg	L(aGg) GgGCAGCCTGTACGGACATC a
	S(aGg) CtGATGTGGCTG C c
aGt	L(aGt) GtGCAGCCTGTACGGACATC a
	S(aGt) CtGATGTGGCTG C a
gGc	L(gGc) GcGCAGCCTGTACGGACATC g
	S(gGc) CcGATGTGGCTG C g

C.2 DNA-Origami-Objekte

C.2.1 Design und Sequenzen für das 24-Helixbündel

Tabelle C.5 – Liste der Oligonukleotidsequenzen für das 24hb. Grau: Kernregion; Blau: Oligonukleotide mit Bindesequenzen (pink) für ein Reporteroligonukleotid (1888-ES,magenta, unterste Reihe). Die Struktur wurde mit p7560 gefaltet. Die Plattenpositionen nicht verwendeter Oligonukleotide sind ausgeblendet.

Oligonukleotid	Position	Oligonukleotidsequenz	Benutzte	länge
ES_P01	84	18 TTTTGGG	possible	75
ES_P02	85	17 TTTTGGG	possible	76
ES_P03	86	16 TTTTGGG	possible	77
ES_P04	87	15 TTTTGGG	possible	78
ES_P05	88	14 TTTTGGG	possible	79
ES_P06	89	13 TTTTGGG	possible	80
ES_P07	90	12 TTTTGGG	possible	81
ES_P08	91	11 TTTTGGG	possible	82
ES_P09	92	10 TTTTGGG	possible	83
ES_P10	93	9 TTTTGGG	possible	84
ES_P11	94	8 TTTTGGG	possible	85
ES_P12	95	7 TTTTGGG	possible	86
ES_P13	96	6 TTTTGGG	possible	87
ES_P14	97	5 TTTTGGG	possible	88
ES_P15	98	4 TTTTGGG	possible	89
ES_P16	99	3 TTTTGGG	possible	90
ES_P17	100	2 TTTTGGG	possible	91
ES_P18	101	1 TTTTGGG	possible	92
ES_P19	102	18 TTTTGGG	possible	93
ES_P20	103	17 TTTTGGG	possible	94
ES_P21	104	16 TTTTGGG	possible	95
ES_P22	105	15 TTTTGGG	possible	96
ES_P23	106	14 TTTTGGG	possible	97
ES_P24	107	13 TTTTGGG	possible	98
ES_P25	108	12 TTTTGGG	possible	99
ES_P26	109	11 TTTTGGG	possible	100
ES_P27	110	10 TTTTGGG	possible	101
ES_P28	111	9 TTTTGGG	possible	102
ES_P29	112	8 TTTTGGG	possible	103
ES_P30	113	7 TTTTGGG	possible	104
ES_P31	114	6 TTTTGGG	possible	105
ES_P32	115	5 TTTTGGG	possible	106
ES_P33	116	4 TTTTGGG	possible	107
ES_P34	117	3 TTTTGGG	possible	108
ES_P35	118	2 TTTTGGG	possible	109
ES_P36	119	1 TTTTGGG	possible	110
ES_P37	120	18 TTTTGGG	possible	111
ES_P38	121	17 TTTTGGG	possible	112
ES_P39	122	16 TTTTGGG	possible	113
ES_P40	123	15 TTTTGGG	possible	114
ES_P41	124	14 TTTTGGG	possible	115
ES_P42	125	13 TTTTGGG	possible	116
ES_P43	126	12 TTTTGGG	possible	117
ES_P44	127	11 TTTTGGG	possible	118
ES_P45	128	10 TTTTGGG	possible	119
ES_P46	129	9 TTTTGGG	possible	120
ES_P47	130	8 TTTTGGG	possible	121
ES_P48	131	7 TTTTGGG	possible	122
ES_P49	132	6 TTTTGGG	possible	123
ES_P50	133	5 TTTTGGG	possible	124
ES_P51	134	4 TTTTGGG	possible	125
ES_P52	135	3 TTTTGGG	possible	126
ES_P53	136	2 TTTTGGG	possible	127
ES_P54	137	1 TTTTGGG	possible	128
ES_P55	138	18 TTTTGGG	possible	129
ES_P56	139	17 TTTTGGG	possible	130
ES_P57	140	16 TTTTGGG	possible	131
ES_P58	141	15 TTTTGGG	possible	132
ES_P59	142	14 TTTTGGG	possible	133
ES_P60	143	13 TTTTGGG	possible	134
ES_P61	144	12 TTTTGGG	possible	135
ES_P62	145	11 TTTTGGG	possible	136
ES_P63	146	10 TTTTGGG	possible	137
ES_P64	147	9 TTTTGGG	possible	138
ES_P65	148	8 TTTTGGG	possible	139
ES_P66	149	7 TTTTGGG	possible	140
ES_P67	150	6 TTTTGGG	possible	141
ES_P68	151	5 TTTTGGG	possible	142
ES_P69	152	4 TTTTGGG	possible	143
ES_P70	153	3 TTTTGGG	possible	144
ES_P71	154	2 TTTTGGG	possible	145
ES_P72	155	1 TTTTGGG	possible	146
ES_P73	156	18 TTTTGGG	possible	147
ES_P74	157	17 TTTTGGG	possible	148
ES_P75	158	16 TTTTGGG	possible	149
ES_P76	159	15 TTTTGGG	possible	150
ES_P77	160	14 TTTTGGG	possible	151
ES_P78	161	13 TTTTGGG	possible	152
ES_P79	162	12 TTTTGGG	possible	153
ES_P80	163	11 TTTTGGG	possible	154
ES_P81	164	10 TTTTGGG	possible	155
ES_P82	165	9 TTTTGGG	possible	156
ES_P83	166	8 TTTTGGG	possible	157
ES_P84	167	7 TTTTGGG	possible	158
ES_P85	168	6 TTTTGGG	possible	159
ES_P86	169	5 TTTTGGG	possible	160
ES_P87	170	4 TTTTGGG	possible	161
ES_P88	171	3 TTTTGGG	possible	162
ES_P89	172	2 TTTTGGG	possible	163
ES_P90	173	1 TTTTGGG	possible	164
ES_P91	174	18 TTTTGGG	possible	165
ES_P92	175	17 TTTTGGG	possible	166
ES_P93	176	16 TTTTGGG	possible	167
ES_P94	177	15 TTTTGGG	possible	168
ES_P95	178	14 TTTTGGG	possible	169
ES_P96	179	13 TTTTGGG	possible	170
ES_P97	180	12 TTTTGGG	possible	171
ES_P98	181	11 TTTTGGG	possible	172
ES_P99	182	10 TTTTGGG	possible	173
ES_P100	183	9 TTTTGGG	possible	174
ES_P101	184	8 TTTTGGG	possible	175
ES_P102	185	7 TTTTGGG	possible	176
ES_P103	186	6 TTTTGGG	possible	177
ES_P104	187	5 TTTTGGG	possible	178
ES_P105	188	4 TTTTGGG	possible	179
ES_P106	189	3 TTTTGGG	possible	180
ES_P107	190	2 TTTTGGG	possible	181
ES_P108	191	1 TTTTGGG	possible	182
ES_P109	192	18 TTTTGGG	possible	183
ES_P110	193	17 TTTTGGG	possible	184
ES_P111	194	16 TTTTGGG	possible	185
ES_P112	195	15 TTTTGGG	possible	186
ES_P113	196	14 TTTTGGG	possible	187
ES_P114	197	13 TTTTGGG	possible	188
ES_P115	198	12 TTTTGGG	possible	189
ES_P116	199	11 TTTTGGG	possible	190
ES_P117	200	10 TTTTGGG	possible	191
ES_P118	201	9 TTTTGGG	possible	192
ES_P119	202	8 TTTTGGG	possible	193
ES_P120	203	7 TTTTGGG	possible	194
ES_P121	204	6 TTTTGGG	possible	195
ES_P122	205	5 TTTTGGG	possible	196
ES_P123	206	4 TTTTGGG	possible	197
ES_P124	207	3 TTTTGGG	possible	198
ES_P125	208	2 TTTTGGG	possible	199
ES_P126	209	1 TTTTGGG	possible	200
ES_P127	210	18 TTTTGGG	possible	201
ES_P128	211	17 TTTTGGG	possible	202
ES_P129	212	16 TTTTGGG	possible	203
ES_P130	213	15 TTTTGGG	possible	204
ES_P131	214	14 TTTTGGG	possible	205
ES_P132	215	13 TTTTGGG	possible	206
ES_P133	216	12 TTTTGGG	possible	207
ES_P134	217	11 TTTTGGG	possible	208
ES_P135	218	10 TTTTGGG	possible	209
ES_P136	219	9 TTTTGGG	possible	210
ES_P137	220	8 TTTTGGG	possible	211
ES_P138	221	7 TTTTGGG	possible	212
ES_P139	222	6 TTTTGGG	possible	213
ES_P140	223	5 TTTTGGG	possible	214
ES_P141	224	4 TTTTGGG	possible	215
ES_P142	225	3 TTTTGGG	possible	216
ES_P143	226	2 TTTTGGG	possible	217
ES_P144	227	1 TTTTGGG	possible	218
ES_P145	228	18 TTTTGGG	possible	219
ES_P146	229	17 TTTTGGG	possible	220
ES_P147	230	16 TTTTGGG	possible	221
ES_P148	231	15 TTTTGGG	possible	222
ES_P149	232	14 TTTTGGG	possible	223
ES_P150	233	13 TTTTGGG	possible	224
ES_P151	234	12 TTTTGGG	possible	225
ES_P152	235	11 TTTTGGG	possible	226
ES_P153	236	10 TTTTGGG	possible	227
ES_P154	237	9 TTTTGGG	possible	228
ES_P155	238	8 TTTTGGG	possible	229
ES_P156	239	7 TTTTGGG	possible	230
ES_P157	240	6 TTTTGGG	possible	231
ES_P158	241	5 TTTTGGG	possible	232
ES_P159	242	4 TTTTGGG	possible	233
ES_P160	243	3 TTTTGGG	possible	234
ES_P161	244	2 TTTTGGG	possible	235
ES_P162	245	1 TTTTGGG	possible	236
ES_P163	246	18 TTTTGGG	possible	237
ES_P164	247	17 TTTTGGG	possible	238
ES_P165	248	16 TTTTGGG	possible	239
ES_P166	249	15 TTTTGGG	possible	240
ES_P167	250	14 TTTTGGG	possible	241
ES_P168	251	13 TTTTGGG	possible	242
ES_P169	252	12 TTTTGGG	possible	243
ES_P170	253	11 TTTTGGG	possible	244
ES_P171	254	10 TTTTGGG	possible	245
ES_P172	255	9 TTTTGGG	possible	246
ES_P173	256	8 TTTTGGG	possible	247
ES_P174	257	7 TTTTGGG	possible	248
ES_P175	258	6 TTTTGGG	possible	249
ES_P176	259	5 TTTTGGG	possible	250
ES_P177	260	4 TTTTGGG	possible	251
ES_P178	261	3 TTTTGGG	possible	252
ES_P179	262	2 TTTTGGG	possible	253
ES_P180	263	1 TTTTGGG	possible	254
ES_P181	264	18 TTTTGGG	possible	255
ES_P182	265	17 TTTTGGG	possible	256
ES_P183	266	16 TTTTGGG	possible	257
ES_P184	267	15 TTTTGGG	possible	258
ES_P185	268	14 TTTTGGG	possible	259
ES_P186	269	13 TTTTGGG	possible	260
ES_P187	270	12 TTTTGGG	possible	261
ES_P188	271	11 TTTTGGG	possible	262
ES_P189	272	10 TTTTGGG	possible	263
ES_P190	273	9 TTTTGGG	possible	264
ES_P191	274	8 TTTTGGG	possible	265
ES_P192	275	7 TTTTGGG	possible	266
ES_P193	276	6 TTTTGGG	possible	267
ES_P194	277	5 TTTTGGG	possible	268
ES_P195	278	4 TTTTGGG	possible	269
ES_P196	279	3 TTTTGGG	possible	270
ES_P197	280	2 TTTTGGG	possible	271
ES_P198	281	1 TTTTGGG	possible	272
ES_P199	282	18 TTTTGGG	possible	273
ES_P200	283	17 TTTTGGG	possible	274
ES_P201	284	16 TTTTGGG	possible	275
ES_P202	285	15 TTTTGGG	possible	276
ES_P203	286	14 TTTTGGG	possible	277
ES_P204	287	13 TTTTGGG	possible	278
ES_P205	288	12 TTTTGGG	possible	279
ES_P206	289	11 TTTTGGG	possible	280
ES_P207	290	10 TTTTGGG	possible	281
ES_P208	291	9 TTTTGGG	possible	282
ES_P209	292	8 TTTTGGG	possible	283
ES_P210	293	7 TTTTGGG	possible	284
ES_P211	294	6 TTTTGGG	possible	285
ES_P212	295	5 TTTTGGG	possible	286
ES_P213	296	4 TTTTGGG	possible	287
ES_P214	297	3 TTTTGGG	possible	288
ES_P215	298	2 TTTTGGG	possible	289
ES_P216	299	1 TTTTGGG	possible	290
ES_P217	300	18 TTTTGGG	possible	291
ES_P218	301	17 TTTTGGG	possible	292
ES_P219	302	16 TTTTGGG	possible	293
ES_P220	303	15 TTTTGGG	possible	294
ES_P221	304	14 TTTTGGG	possible	295
ES_P222	305	13 TTTTGGG	possible	296
ES_P223	306	12 TTTTGGG	possible	297
ES_P224	307	11 TTTTGGG	possible	298
ES_P225	308	10 TTTTGGG	possible	299
ES_P226	309	9 TTTTGGG	possible	300
ES_P227	310	8 TTTTGGG	possible	301
ES_P228	311	7 TTTTGGG	possible	302
ES_P229	312	6 TTTTGGG	possible	303
ES_P230	313	5 TTTTGGG	possible	304
ES_P231	314	4 TTTTGGG	possible	305
ES_P232	315	3 TTTTGGG	possible	306
ES_P233	316	2 TTTTGGG	possible	307
ES_P234	317	1 TTTTGGG	possible	308
ES_P235	318	18 TTTTGGG	possible	309
ES_P236	319	17 TTTTGGG	possible	310
ES_P237	320	16 TTTTGGG	possible	311
ES_P238	321	15 TTTTGGG	possible	312
ES_P239	322	14 TTTTGGG	possible	313
ES_P240	323	13 TTTTGGG	possible	314
ES_P241	324	12 TTTTGGG	possible	315
ES_P242	325	11 TTTTGGG	possible	316
ES_P243	326	10 TTTTGGG	possible	317
ES_P244	327	9 TTTTGGG	possible	318
ES_P245	328	8 TTTTGGG	possible	319
ES_P246	329	7 TTTTGGG	possible	320
ES_P247	330	6 TTTTGGG	possible	321
ES_P248	331	5 TTTTGGG	possible	322
ES_P249	332	4 TTTTGGG	possible	323
ES_P250	333	3 TTTTGGG	possible	324

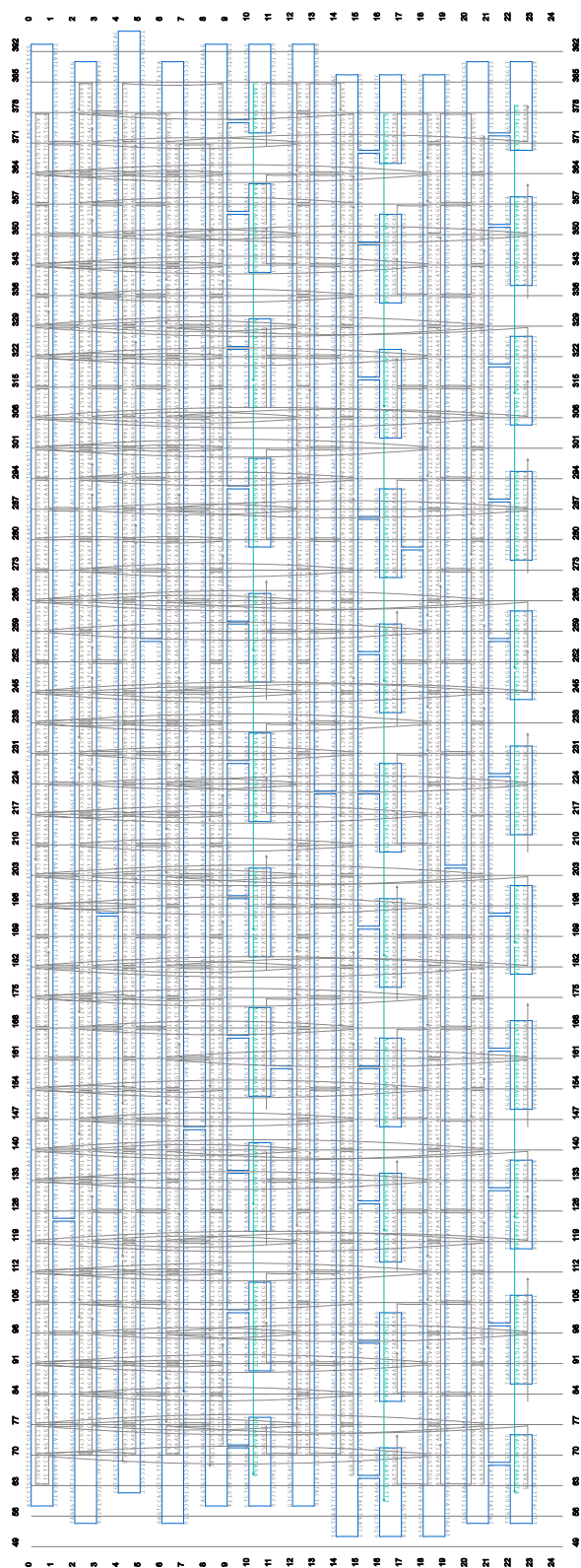


Abbildung C.1 – Strangtopologie des 24-Helixbündels. Das Design erzeugt eine honigwabentartige Helixpackung und faltet mit einem p7560-Templatstrang; Farbkodierung wie in Tab. C.5.

C.2.2 Design und Sequenzen für Varianten des 100-Helixbündels

Die Struktur des 100-Helixbündels (100hb v2) wurde von Philip Ketterer¹ entworfen.

Tabelle C.6 – Liste der Oligonukleotidsequenzen für die 100-Helixbündelvarianten. Grau, rot, bzw. orange: Kernregion und Polythymine-Passivierung für die Blunt-End-Version (vgl. Abb. C.2; Blau: Oligonukleotide, die für die Erzeugung der Sticky-End-Versionen ersetzt werden müssten (vgl. Abb. C.3 und Abb. C.4. Die Struktur wurde mit p7560 gefaltet.

[illegible]

¹seit 2013 Doktorand in der AG Dietz

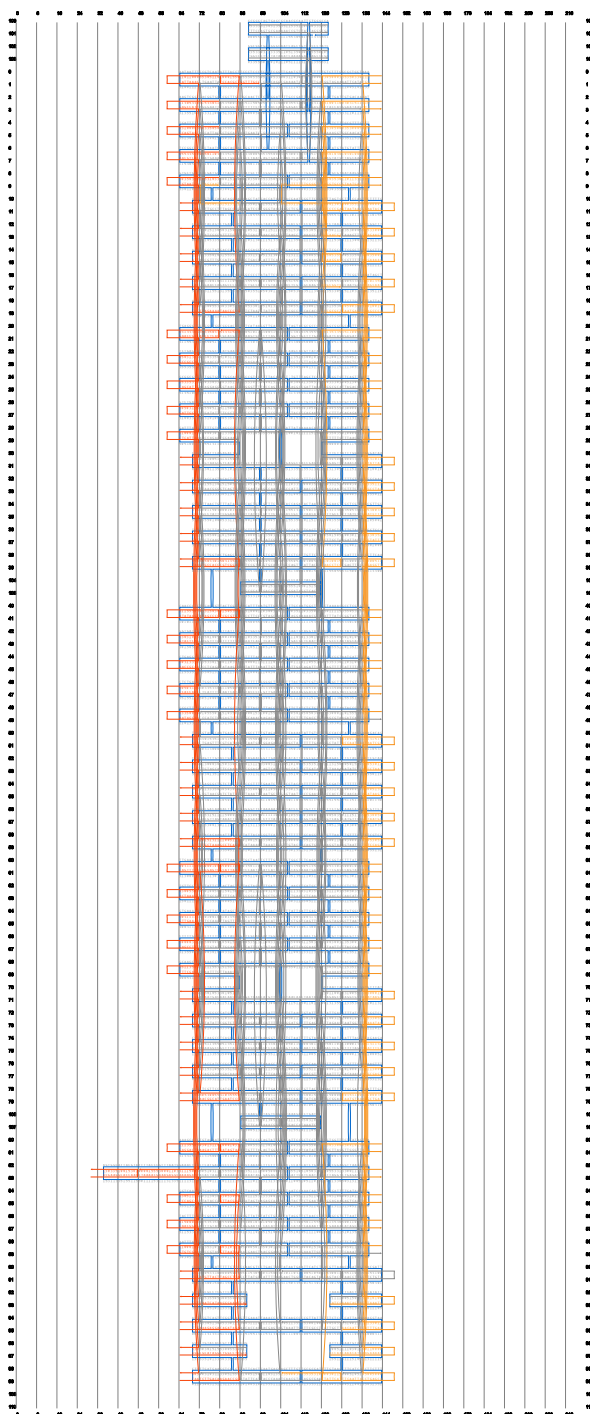


Abbildung C.2 – Strangtopologie des 100-Helixbündels mit Blunt-End-Interaktionen zwischen formkomplementären Oberflächenelementen. Das Design erzeugt eine rechteckige Helixpackung und faltet mit einem p7560-Templatstrang; Farbkodierung: grau: Kernregion; rot bzw. orange: Passivierung der Helixenden.

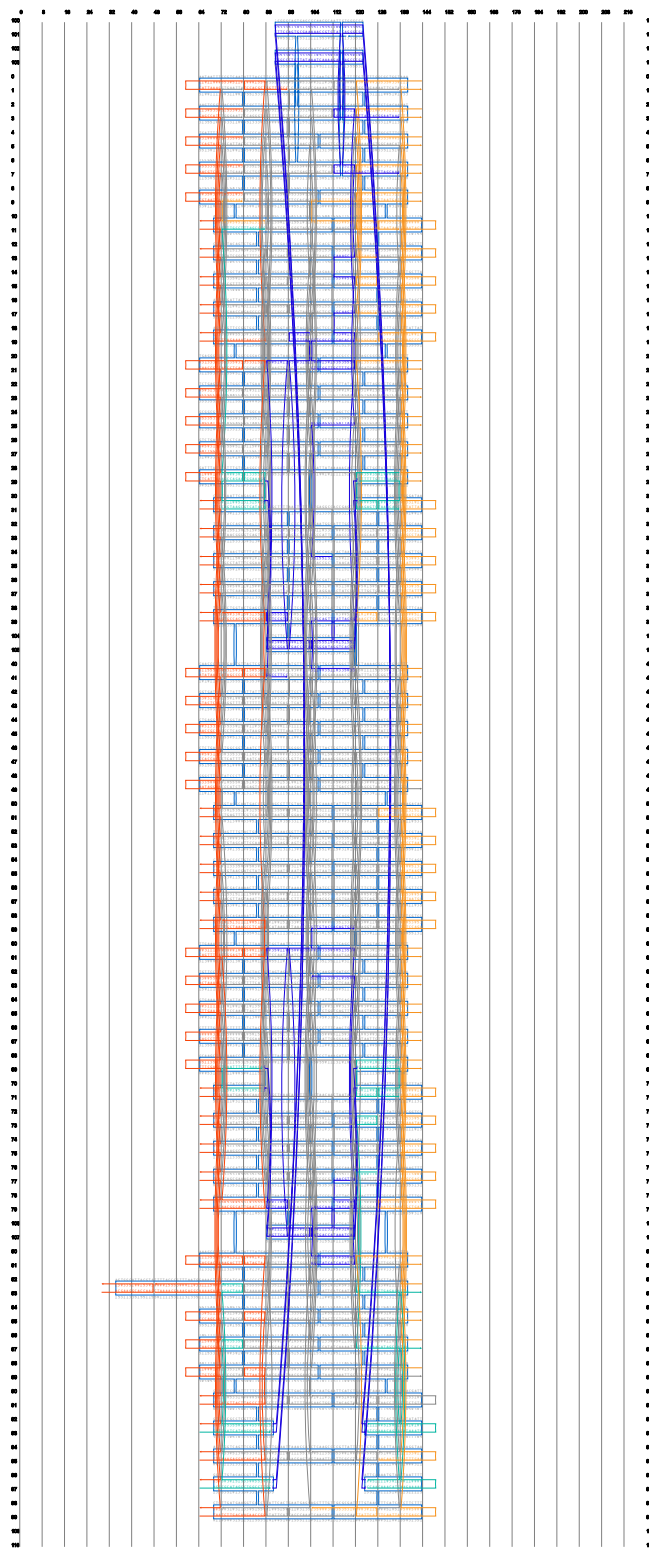


Abbildung C.3 – Strangtopologie des 100-Helixbündels mit 1-Basen-Sticky-End-Interaktionen zwischen formkomplementären Oberflächenelementen. Design wie in Abb. C.2, abweichende Oligonukleotidsequenzen sind farblich markiert.

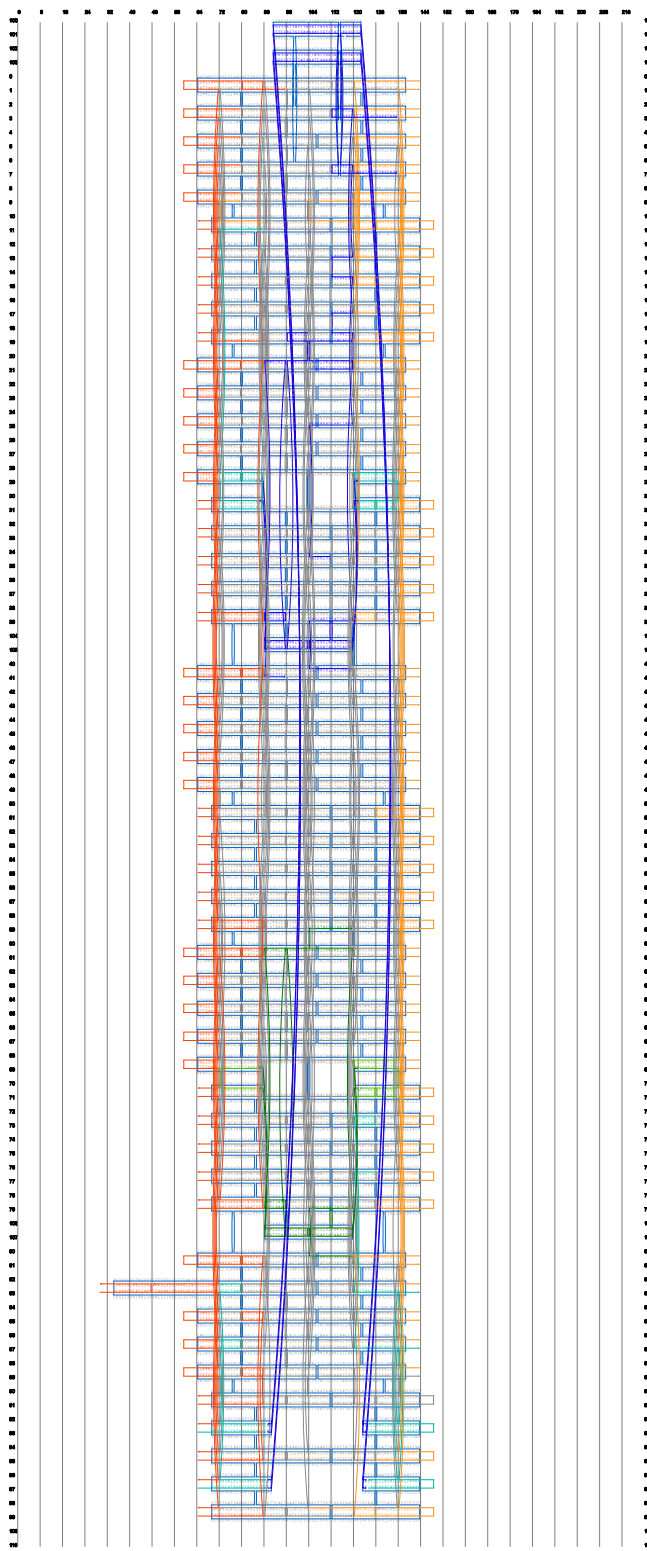


Abbildung C.4 – Strangtopologie des 100-Helixbündels mit 2-Basen-Sticky-End-Interaktionen zwischen formkomplementären Oberflächenelementen. Design wie in Abb. C.2, abweichende Oligonukleotidsequenzen sind farblich markiert.

Danksagung

Fünf Jahre lang die Gelegenheit zu haben, ein Thema zu erkunden, mich auf interessante Aspekte zu konzentrieren und darin mein Wissen zu vertiefen, empfinde ich als ein nicht selbstverständliches Privileg, für das ich sehr dankbar bin.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Hendrik Dietz für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Labor für Biomolekulare Nanotechnologie anzufertigen. Vielen Dank für die Bereitstellung meines Themas und eines Forschungsumfeldes, das es mir stets möglich machte, meine Ideen zu verwirklichen. Ich habe während meiner Promotionszeit viel gelernt und mich in der AG Dietz sehr wohl gefühlt – vielen Dank für diese offene und kreative Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Dr. Thomas Martin, Florian Praetorius, Dr. Carina C. de Oliveira Mann, Klaus Wagenbauer und Floris Engelhardt für die gute Zusammenarbeit an unseren gemeinsam veröffentlichten und eingereichten Artikeln. Ich danke außerdem Dr. Haissi Cui, Angela Oberhofer und Dr. Zeynep Ökten für den Einblick, den ich in ihre Forschungsprojekte auf Grund der TEM-Aufnahmen ihrer Proben und durch die Koautorenschaft in den Veröffentlichungen und eingereichten Artikeln erhalten konnte.

Ich danke Prof. Hopfner für seine Bereitschaft, Synchrotron-Messzeit für unser Kristallwachstumsprojekt zur Verfügung zu stellen und danke besonders Dr. Carina C. de Oliveira Mann für ihre Zeit und Mühe, die sie in die Messung der Kristalle investiert hat.

Ich danke Prof. Groll und Dr. Eva Huber für ihre anfängliche Unterstützung des Kristallisationsprojekts.

Ich danke der International Graduate School for Science and Engineering (IGSSE) für die Unterstützung dieser Doktorarbeit und meiner fachlichen Weiterbildung im Rahmen des Projekts BioMat04.

Vielen Dank an Tom, Flo, Marc, Matthias, Christian, Klaus, Katha, Jonas und Floris für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ihr habt mir wirklich sehr geholfen.

Vielen Dank auch an Erika Bischofs, Sonja Kraus und Dr. Petra Bele für die Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten. Ich möchte mich außerdem bei allen Praktikanten, Werkstudenten, Bachelor- und Masterstudenten für ihre Mitarbeit an meinen Projekten und die indirekten Lektionen in Sachen Projektleitung bedanken.

Ein großer Dank gilt meinen Kollegen:

Liebe AG Dietz, ich danke Euch für die wahnsinnig gute Zeit mit Euch und für Eure Hilfsbereitschaft, die für mich nie und für Euch immer selbstverständlich schien. Jede Frage, die ich hatte und jedes Problem, das in meinen Projekten auftauchte, konnte ich mit Euch besprechen, diskutieren und oft lösen. Ich habe viel von Euch und mit Euch gelernt und weiß es sehr zu schätzen, dass Ihr Euch so oft Zeit genommen habt, mit mir auch über meine Baustellen nachzudenken. Danke Matthias, Christian, Fabian (FaKi), Flo und Jonas für Eure Hilfe mit diversen Auswertungen. Danke Tom für alle Deine Spezialtipps. Danke an jeden von Euch, der eines der DNA-Origami-Objekte entworfen hat, die ich für meine Arbeit verwenden durfte. Ganz besonders möchte ich mich bei Dir, Flo, bedanken. Unsere Diskussionen über nächste Schritte und mögliche Ursachen bei aufgetretenen Problemen haben mir sehr geholfen, meine Experimente zu strukturieren und zu reflektieren. Vielen Dank Euch für die gemeinsamen Laufrunden, Dir, liebe Katha, für die montäglichen Damensaunaabende und Euch allen für die Labhikes, Pubcrawls, Paperparties, Weihnachtsfeiern, Grillabende, Feierabendbierchen und Kaffeepausen.

Vielen Dank auch an die Mitglieder der AG Simmel für eine gute Atmosphäre im 2. Stock des ZNN und an die Mitglieder der Biophysik für den wertvollen Austausch, das gute Verhältnis und natürlich auch die angenehmen Winterschulen, die wir zusammen verbracht haben.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie, für das Zuhören, ihren Zuspruch und den Ausgleich zur Arbeit.

Mein tiefer Dank gilt meiner Familie für ihre Liebe und ihre immerwährende Unterstützung.

Vielen Dank an meine Eltern für die Unterstützung, die ich erhalten habe.

Liebe Tante Inge, lieber Onkel Franz, vielen Dank für Eure liebevolle Fürsorge, dass Ihr mit Euren Gedanken immer bei mir seid und ich mich stets auf Euch verlassen kann – Ihr beide seid mein Fundament und ich bin Euch unendlich dankbar dafür.

Liebe Babsi, lieber Armin, lieber Peter und lieber Hiasi, es ist schön, Euch als meine Geschwister immer an meiner Seite zu wissen. Danke, dass es Euch gibt.

Liebe Iris, lieber Horst, Ihr beide habt mich ebenfalls liebevoll umsorgt und mich unterstützt wo immer es nur ging. Vielen, vielen Dank dafür.

Ich danke Dir, Marc – für Dich, für alles. Du bist mein Komplementär.