

DNA-origami

DNA-nanostrukturer giver nye muligheder for studier af individuelle molekyler. Ved at udnytte DNAs unikke selvsamlende egenskaber kan man designe strukturer, hvorpå der kan studeres kemiske reaktioner, fluoroforer og biomolekyler på enkeltmolekyle-niveau

Af Niels V. Voigt, Thomas Tørring og Kurt V. Gothelf, Centre for DNA Nanotechnology og iNANO, Aarhus Universitet

Hundredvis af unikke molekyler i en vanddråbe finder sammen og danner en forudbestemt struktur. Det sker ikke bare én gang, men milliarder af gange i den samme dråbe, og hver gang samles en præcis kopi af den forudbestemte struktur. Det lyder som science fiction, men har været muligt siden 2006 takket være nyopdagelser inden for DNA-nanoteknologi. Disse nyopdagelser kan bl.a. udnyttes til at studere kemiske reaktioner mellem enkelte molekyler.

I 2006 udviklede Paul Rothemund ved California Institute of Technology *DNA Origami* (se faktaboks) [1], en teknik, hvor flere hundrede DNA-strenger programmeres til selv at samle sig til en forudbestemt og strukturelt veldefineret struktur med mere end en halv million atomer.

En todimensional DNA-origami består af parallelt organiserede DNA-helicer og er ca. 100x100 nanometer. Da hver af de 230 DNA-strenger, der anvendes til at danne strukturen, potentielt kan modificeres med andre materialer - fra proteiner til halvlederpartikler - blev DNA-origamiens potentiale som en molekylær printplade hurtigt fremført. De 230 modificerbare positioner, der findes på DNA-origamioverfladen, er fordelt med seks nanometers mellemrum. Denne størrelsesorden er utrolig interessant, hvis man ønsker at undersøge biologiske makromolekylers funktion. Det har også traditionelt været en svært tilgængelig størrelsesorden, da de fleste analyseteknikker enten er velegnede til små molekyler (0,1-2 nm) eller til makroskopiske størrelser som overflader eller materialer.

DNA-origamiens overflade rummer stort potentiale for at placere molekyler eller materialer i veldefinerede positioner. Her

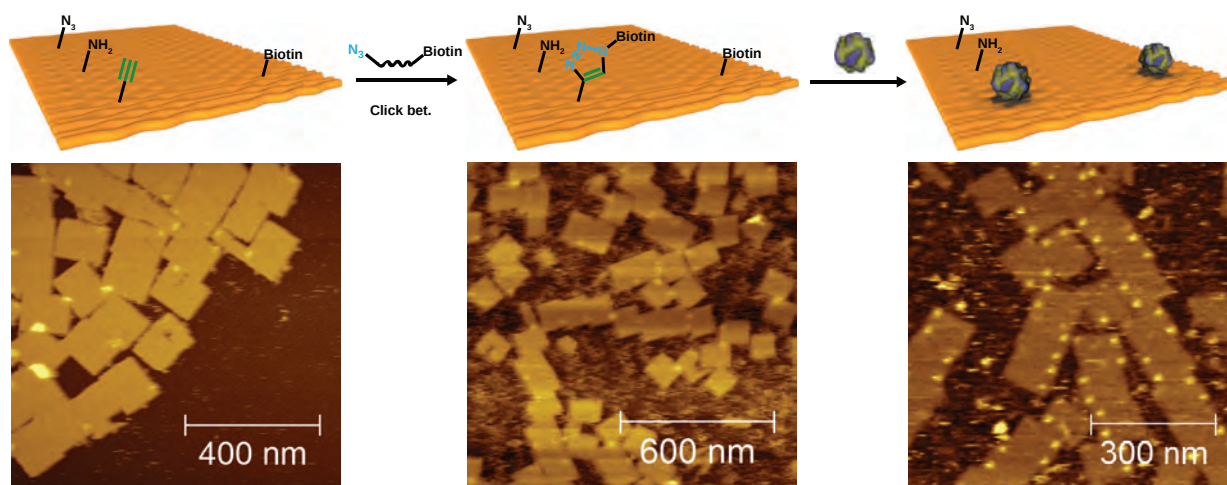
kan de enkelte molekylers reaktioner og interaktioner studeres med forskellige mikroskopi-teknikker. Studier af individuelle molekyler kan give et langt mere detaljeret indblik i molekylernes opførsel og vekselvirkninger end traditionelle teknikker, der typisk midler over mange milliarder molekyler.

Studiet af DNA-origami

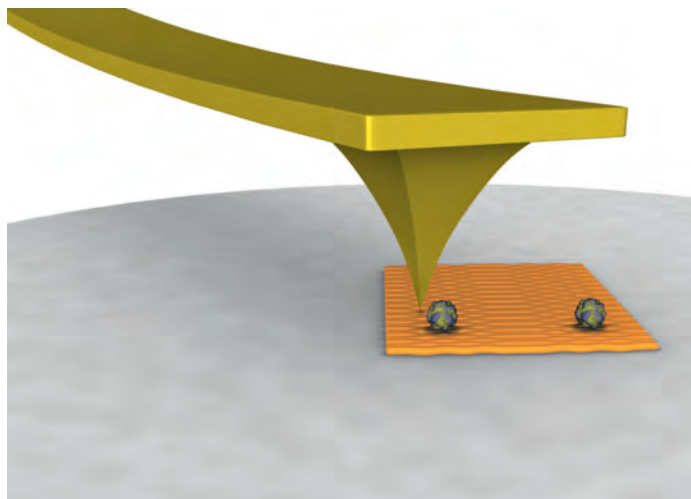
Ved Danmarks Grundforskningsfonds *Centre for DNA Nanotechnology*, CDNA, har vi kombineret traditionel organisk kemi og den nyudviklede DNA-origamiteknologi [2].

For at kunne det, var det nødvendigt først at lave en DNA-origami med forskellige kemiske grupper på overfladen. Senere kunne der tilsættes reagenser, der reagerede specifikt med hver af disse kemiske grupper. Vi introducerede tre forskellige kemiske grupper på udvalgte steder på origamioverfladen. Da de efterfølgende reaktioner skulle være kompatible med DNA og foregå i vandig buffer, faldt valget på den kobberkatalyserede reaktion mellem en terminal alkyn og et azid, også kaldet Huisgen-Meldal-Sharpless-reaktionen, og desuden reaktionen mellem en aktiveret ester og en primær amin. Da alle DNA-strengene i en origami er unikke, vil de tre kemiske grupper kun optræde én gang på hver origami. Desuden vil deres positioner og indbyrdes afstande være præcist definerede. En skematisk repræsentation af den endelige struktur er vist i figur 1.

Atomar kraft mikroskopi (AFM) er en særdeles velegnet teknik til at studere DNA-origami (figur 2), men da reaktionerne foregår på origamiens overflade, og origami er meget større end reaktionsproduktet, kan produktet ikke observeres direkte.



Figur 1. Reaktioner på origami. DNA-origami og AFM gør det muligt at se produktet af enkelte kemiske reaktioner ved at "fremkalde" med proteinet streptavidin. I vores studier har vi udnyttet, at positionerne af hver hæftestreg kendes. Dermed kendes positionen af modifikationerne, og man kan derfra udlede identiteten af det dannede molekyle. Her er kun reaktionen med biotin-azid vist. Med andre reagenser kan der reageres specifikt med de øvrige kemiske grupper. I den øverste del af figuren er størrelsen af de kemiske strukturer øget for klarhedens skyld.



Figur 2. Atomar kraft mikroskopi. Ved at bevæge en meget spids nål henover en overflade og følge nålens afbøjning, kan meget små ujævnheder på overfladen måles. Det udnyttes i et atomar kraft mikroskop, eller Atomic Force Microscope, AFM. Bladfjederen, som nålen sidder på, er reelt omtrent 500 gange så bred som DNA-origamien.

For at kunne se om en reaktion har fundet sted, er det nødvendigt, at produktet kan "fremkaldes" efter reaktionen. Det opnås ved at udnytte, at det lille molekyle biotin binder stærkt til proteinet streptavidin. Streptavidin er med en diameter på ca. 5 nm stort nok til at kunne detekteres ved AFM. En biotin-gruppe er integreret i de molekyler, der anvendes til at reagere med de

kemiske grupper på origamioverfladen. Det betyder, at der hvert sted, hvor der er sket en reaktion, sidder et biotin-molekyle, og dette kan fremkaldes med streptavidin.

Da DNA har mange negative ladninger, binder origamierne stærkt til positivt ladede overflader. Når origamierne binder til overfladen, kan reagenserne skylles hen over dem, og vi opdagede, at de immobiliserede DNA-strukturer er forbavsende stabile. Adskillige vaske med buffere, organiske opløsningsmidler og kemiske reagenser kan udføres uden at det ødelægger origamiens strukturelle integritet (figur 1).

På den måde kan adskillige reaktionstrin laves efter hinanden, uden at origamierne oprenses. Efter en eller flere kemiske reaktioner kan resultatet fremkaldes ved at skylle med en opløsning af streptavidin. Proteinene binder sig til alle de biotiner, der har reageret med de kemiske grupper på origamien. De vil efterfølgende fremstå som lysere og dermed højere områder på AFM-billederne.

De forskellige kemiske funktionaliteter, der er placeret på origamioverfladen, reagerer uafhængigt af hinanden, og flere forskellige kemiske reaktioner kan dermed studeres parallelt på en $100 \times 100 \text{ nm}^2$ origamiplatform (figur 1). Normalt bestemmes kemiske reaktionsudbytter spektroskopisk eller ved at veje produktet. Ved den nye teknik kan man ud fra AFM-billederne optælle produktet af de individuelle reaktioner, der har fundet sted på hver origamistruktur og derfra bestemme udbyttet. Disse studier har vist, at kemien er forbavsende selektiv og effektiv. Reaktionerne havde udelukkende fundet sted på de øn-


Stockholmsmässan


Bella Center
Copenhagen



THIS YEAR'S MOST IMPORTANT DATING SERVICE

BioTech Forum Copenhagen, September 28–30, 2010

READ MORE AND SIGN UP AT WWW.BIOTECHFORUM.ORG

Partnering Organizer
EBD GROUP

**BIOTECH
FORUM**
Biotech & Medtech Partnering

Official Media Partner
BiotechSweden

Organizers: Stockholm International Fairs and Bella Center | Visiting Address: Center Boulevard 5, DK-2300 København, Denmark | www.biotechforum.org

skede positioner, og der blev observeret udbytter på 85-90% ved optælling af flere hundrede origamier.

Et hurtigt udviklende felt

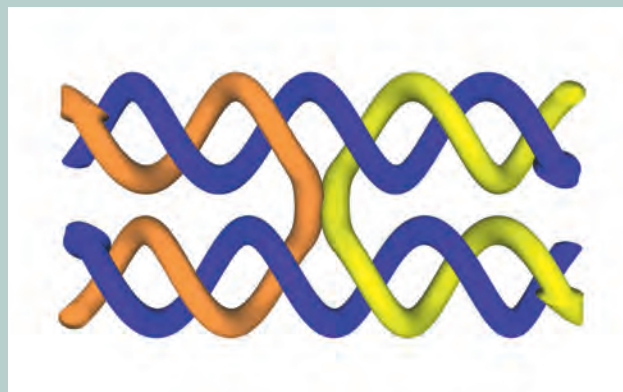
På CDNA har vi fokuseret på de kemiske reaktioner af enkelte molekyler på origamioverfladen. Imens har andre grupper udviklet DNA-origamiteknikken i andre og lige så spændende retninger. Forskere fra München udnyttede den meget præcise positionering på origamien til at lave fluorescensmikroskopi med superopløsning, hvor man omgår diffraktionsgrænsen. Derved kan man bestemme molekylernes position med ned mod en enkelt nanometers præcision med lysmikroskopi [3]. En japansk forskergruppe ledet af Hiroshi Sugiyama har undersøgt nogle af de DNA-interagerende enzymer, som er essentielle for vores celler [4]. I deres studie bruger de origamien til at udspænde DNA-stykker, hvorpå enzymerne binder. Herpå kan de vha. hurtige AFM-optagelser lave korte film, der viser, hvordan enzymer arbejder. Endelig er der for nylig blevet publiceret to artikler, hvor to uafhængige forskergrupper beskriver, hvordan det er muligt for små kunstige DNA-robotter at bevæge sig langs en forudprogrammeret sti på origamien [5,6]. En af robotterne kunne sågar samle nanobyggesten op langs den rute, den fulgte på origamioverfladen [5]. Dertil har der gennem det seneste år har været en stigende interesse for tredimensionelle DNA-origamistrukturer. Inden for dette felt har CDNA bl.a. bidraget med en origamikasse med et låg, der kan åbnes og lukkes [7].

Fremtidige muligheder

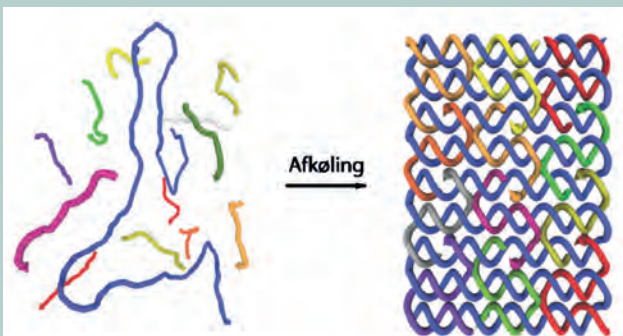
Med DNA-origami er det for alvor blevet muligt at kontrollere

DNA som selvsamlende nanobyggemateriale

For at bygge strukturer, der er mere komplekse end en enkelt lineær DNA-helix, må man indføre forgreninger, der binder flere helicer sammen. Det kan opnås ved at lave en DNA-streng, hvor én del binder til én streng, og en anden del binder til en anden. Princippet er illustreret nedenfor med en såkaldt holliday-samling. Ved at indsætte to eller flere af disse forgreninger kan man arrangere DNA-helicer parallelt.

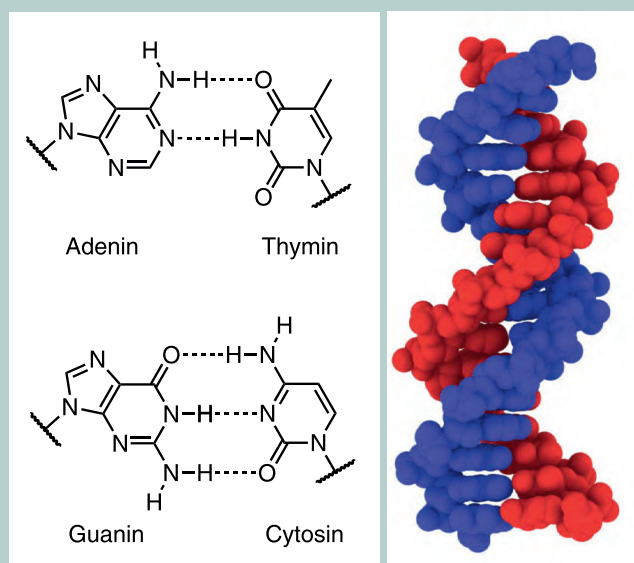


Hvis mange af disse strukturer sættes sammen, kan man lave større og mere komplekse strukturer. I praksis kan det være svært at realisere, og det har været en af de store udfordringer for DNA-nanoteknologien gennem de seneste 20 år. I 2006 skete der et gennembrud i form af DNA-origamimetoden. Det nye ved metoden var, at én lang DNA-streng blev *foldet* til den ønskede struktur vha. mange korte *hæfestreng*e (se nedenfor). Derfor fik metoden navnet *DNA Origami*, opkaldt efter japansk papirfoldningskunst. Strengen, der foldes, er oprenset fra naturen og kan derfor være meget lang. De korte strenge fremstilles syntetisk. Hver af dem hæfter forudbestemte dele af den lange streng sammen. Det gør hver position i en DNA-origami unik, og kemiske modifikationer kan derfor indføres præcis, hvor det ønskes.



komplekse strukturer på nanoskala. Som i et skakspil, hvor det både er de enkelte brikkers funktion, men især deres indbyrdes placering på skakbrættet, der afgør deres vekselvirkninger, har vi nu fået en molekylær platform med omkring 200 felter. Herfra kan vi placere og flytte rundt på molekylære brikker, kontrollere deres indbyrdes afstande og studere deres interaktioner. Det rummer et fantastisk videnskabeligt potentiale for at samle naturlige og kunstige nanomaterialer til komplekse funktionelle strukturer. Metoden har også en række potentielle anvendelsesmuligheder. Det at man ved præcis, hvad afstanden mellem f.eks. fluorescerende grupper eller metalpartikler på overfladen

DNA



DNA (deoxyribonukleinsyre) består af fire forskellige baser, adenin, A, der kan baseparre til thymin, T, og guanin, G, der kan baseparre til cytosin, C. Baseparrene holdes sammen af hydrogenbindinger som vist i figuren. Én DNA-streng er en fosfat-kulhydratkæde, hvor hvert led på kæden har en af de fire baser. Hvis to strenge har tilstrækkeligt mange baser i træk, der kan baseparre, vil de finde sammen til den klassiske dobbelthelix.

er, gør det anvendeligt som værktøj til at kalibrere avancerede instrumenter. Origamistrukturerne har samtidig en størrelse, der potentielt kan gøre det muligt at danne bro mellem den molekylære og den makroskopiske verden. Det kunne i fremtiden opnås ved at konstruere elektroniske kredsløb på origamioverfladerne og forbinde dem til traditionelle elektroniske kredsløb – noget der bl.a. arbejdes på ved Centre for DNA Nanotechnology. En sådan udvikling kan også muliggøre elektriske sensorer, der kan detektere enkelte molekyler.

E-mail-adresser

Niels V. Voigt: nvv@inano.au.dk

Thomas Tørring: thomast@inano.au.dk

Kurt V. Gothelf: kvg@chem.au.dk

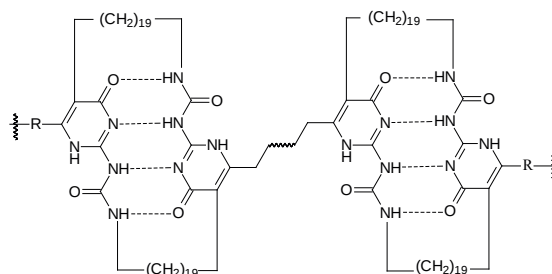
Referencer

1. Rothemund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440, 297–302 (2006).
2. Voigt, N.V. *et al.* Single-molecule chemical reactions on DNA origami. *Nature Nanotech.* 5, 200–203 (2010).
3. Steinhauer, C. *et al.* DNA origami as a nanoscopic ruler for super-resolution microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 8870–8873 (2009).
4. Endo, M.; Katsuda, Y.; Hidaka, K. & Sugiyama, H. Regulation of DNA Methylation using different tensions of double strands constructed in a defined DNA nanostructure. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1592–1597 (2010)
5. Gu, H.; Chao, J.; Xiao, S.-J. & Seeman, N.C. A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line. *Nature* 465, 202–205 (2010)
6. Lund, K. *et al.* Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature* 465, 206–210 (2010)
7. Andersen, E. S. *et al.* Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 459, 73–76 (2009).

Nyt om...

... En syntetisk "naturlig" polymer

Selvom moderne polymerer har mange værdifulde egenskaber, kan ingen hamle op med naturlige biopolymerers mekaniske egenskaber mht. modstandsdygtighed over for deformation, styrke og tilpasningsevne som f.eks. form-



hukommelse. En gruppe ved University of California har nu designet en polymer, der lever op til disse krav. Den ligner en perlekæde, som består af en kæde af makromolekylære ringe adskilt af en kæde af ester-alken linkere. Hver af ringene holdes sammen af 4 hydrogenbindinger, der kan brydes og finde sammen igen, når man trækker i polymeren.

Carl Th.

A Biomimetic Molecular Polymer with Tough and Adaptive Properties. *Journal of the American Chemical Society*. **131**, 2009, side 8766.

PÅ FORKANT MED UDVIKLINGEN

I 150 år har vi beskæftiget os med immaterialret. Som det første bureau i Skandinavien. Denne erfaring kommer vores kunder til gode hver eneste dag, når vi rådgiver om patenter, varemærker og design. Siden 1860 har vi holdt forspringet og er vokset til at være et af Europas største bureauer med 350 medarbejdere – heraf 70 i Danmark.

Vores første kunde udviklede en dieselmotor. Vi patenterer stadigvæk motorer, men i dag omfatter vores specialer selvfølgelig også cleantech, nano- og bioteknologi.

På www.awapatent.com kan du holde dig opdateret på IP-nyheder samt tilmelde dig vores nyhedsbreve.

AWAPATENT®

IPB Internationalt
Patent-Bureau

www.awapatent.com