



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΧΗΜΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗ
ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ DNA**

ΧΕΙΡΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:
Α. ΤΣΟΛΟΜΥΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί εκθετική ανάπτυξη του DNA ως υλικό γενικής χρήσης αντί ως γενετικό μόνο υλικό. Η βιολογική του λειτουργία, η γεωμετρία του στη νανοκλίμακα, η βιοσυμβατότητά του, η βιοαποδομησιμότητά του και η ικανότητα μοριακής αναγνώρισής του, καθιστούν το DNA έναν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για την κατασκευή καινοτόμων λειτουργικών νανοϋλικών. Το επιστημονικό πεδίο που ασχολείται με την κατασκευή DNA νανοδομών ονομάζεται «νανοτεχνολογία του DNA» και χωρίζεται σε δύο είδη: τη μεγάλης ακρίβειας δομική νανοτεχνολογία του DNA, στην οποία το DNA χρησιμοποιείται και ως δομικό στοιχείο και ως εκμαγείο και στη μικρής ακρίβειας συνθετική νανοτεχνολογία του DNA, στην οποία το DNA χρησιμοποιείται ως «έξυπνη κόλλα». Στη συνθετική νανοτεχνολογία του DNA, το DNA δεν χρησιμοποιείται ως ένα δομικό στοιχείο ακριβείας, επομένως, αξιοσημείωτες είναι οι εφαρμογές του τομέα της δομικής νανοτεχνολογίας του DNA και αυτός είναι και ο τομέας που αναλύεται διεξοδικότερα στην παρούσα εργασία. Η ραγδαία ανάπτυξη του τομέα αυτού οφείλεται στη δημιουργία σταθερών διακλαδούμενων μορίων DNA και στη συνένωση κολλωδών άκρων. Τα πρώτα αντικείμενα που κατασκευάστηκαν ήταν τοπολογικοί στόχοι, όπως δακτύλιοι Borromean, ένας κύβος και ένα κόλουρο οκτάεδρο. Ακολούθησε η κατασκευή εκπληκτικών νανοδομών, συμπεριλαμβανομένων πλεγμάτων, νανοσωλήνων, DNA οριγκάμι, δισδιάστατων δομών, περιοδικών συστοιχιών, μέχρι και τρισδιάστατων αντικειμένων. Πολλές είναι οι DNA νανοδομές που έχουν χρησιμοποιηθεί ως εκμαγεία και οδηγοί για να κατευθύνουν τη συναρμολόγηση άλλων νανοϋλικών, όπως νανοσυρμάτων και κρυστάλλων. Επιπροσθέτως, οι DNA κατασκευές έχουν βρει εφαρμογή και σε πολλούς τομείς στο βιοϊατρικό πεδίο, όπως, για παράδειγμα, στη διαγνωστική ιατρική. Εκτός, όμως, από τις στατικές κατασκευές, έχουν παραχθεί και DNA νανομηχανικές συσκευές, από τις οποίες η πιο πρόσφατη είναι ένα νανορομπότ που περπατάει. Επιπλέον, μόρια DNA έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη διεξαγωγή υπολογισμών (DNA-based computation). Αναμένεται ότι η νανοτεχνολογία του DNA θα είναι η επιστήμη του μέλλοντος.

Λέξεις-κλειδιά: Νανοτεχνολογία του DNA, διακλαδούμενο DNA, συνένωση κολλωδών άκρων, DNA νανοδομές, DNA νανομηχανικές συσκευές, υπολογισμοί με βάση το DNA

* Σημειώνεται ότι η σημασία των αγγλικών όρων έχει αποδοθεί κατά προσέγγιση.

ABSTRACT

The last two decades have witnessed the exponential development of DNA as a generic material instead of just a genetic material. The biological function, nanoscale geometry, biocompatibility, biodegradability, and molecular recognition capacity of DNA make it a promising candidate for the construction of novel functional nanomaterials. The scientific field that entails the construction of DNA nanostructures is called “DNA nanotechnology” and is divided into two categories: high resolution/structural DNA nanotechnology, where DNA is both the bricks and mortar of an assembly and low resolution/compositional DNA nanotechnology that uses DNA as “smart glue”. Compositional DNA nanotechnology doesn’t use DNA as a precise building block, thus, the applications that are remarkable belong to the field of structural DNA nanotechnology and this is the field which is more thoroughly described in this paper. The great development of this field is due to the combination of synthetic stable branched DNA and sticky-ended cohesion. The first objects that were produced were topological targets, such as Borromean rings, a cube and a truncated octahedron. These were followed by extraordinary nanostructures, including lattices, nanotubes, DNA origami, two-dimensional (2D) structures, periodic arrays and even three-dimensional (3D) objects. Many DNA nanostructures have been used as a template and guide to direct the assembly of other nanomaterials, including nanowires and crystals. Furthermore, these DNA materials have found applications in various areas in the biomedical field, such as medical diagnostics. In addition to the static objects, though, DNA nanomechanical devices have been produced, the most recent of which is a nano-robot that walks. Moreover, DNA molecules have been successfully used in DNA-based computation. It appears that DNA nanotechnology will be the science of the future.

Keywords: DNA nanotechnology, branched DNA, sticky-ended cohesion, DNA nanostructures, DNA nanomechanical devices, DNA-based computation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη Διπλωματική μου Εργασία στα πλαίσια των σπουδών μου στο τμήμα Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. υπό την επίβλεψη του καθηγητή του τομέα Χημικών Επιστημών κ. Τσολομύτη, στον οποίο οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες τόσο για την ανάθεση της εργασίας όσο και για την πολύτιμη βοήθειά του για την εκπόνηση της εργασίας αυτής. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους μου που με στήριζαν και με συμβούλευαν σε κάθε βήμα της φοιτητικής μου ζωής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. Εισαγωγή	7
1.1 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία του DNA	7
1.2 Η ιδέα που δημιούργησε το πεδίο της νανοτεχνολογίας του DNA	8
1.3 Λίγα λόγια για το DNA	9
1.4 Οι ιδιότητες του DNA που το καθιστούν ιδανικό για τη νανοτεχνολογία	17
1.5 Τα δύο είδη της νανοτεχνολογίας του DNA	20

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ DNA

2. Συνθετική νανοτεχνολογία του DNA	22
2.1 Ημισυνθετικά συζεύγματα DNA-πρωτεΐνης	22
2.2 Καθοδηγούμενη από το DNA σύνθεση δυαδικών νανοσωματιδιακών υλικών δικτύου	27
2.3 Συγκρότηση καινοτόμων DNA κύκλων με άκαμπτους τετραεδρικούς συνδέτες (linkers).....	28
2.4 Άλλες εφαρμογές της συνθετικής νανοτεχνολογίας του DNA.....	30

ΜΕΡΟΣ Β΄: ΔΟΜΙΚΗ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ DNA

3. Δομική νανοτεχνολογία του DNA – Κατασκευές	31
3.1 Διακλαδούμενο DNA και κολλώδη άκρα	31
3.2 Τα αρχικά βήματα για την κατασκευή DNA νανοδομών.....	39
3.2.1 Σχεδιασμός μοτίβων	39
3.2.2 Χαρακτηρισμός των μοτίβων	43
3.2.3 Σχεδιασμός αλληλουχιών και ελαχιστοποίηση της συμμετρίας	45
3.3 Τοπολογικές κατασκευές	47
3.3.1 Τοπολογικά χαρακτηριστικά των DNA κατασκευών	47
3.3.2 Οι πρώτες DNA κατασκευές	49
3.3.3 Κατενάνια και πολυκόμβοι	51
3.3.4 Δακτύλιοι Borromean από DNA	57

3.4 Μονοδιάστατες (1D) DNA κατασκευές	59
3.5 Δισδιάστατες (2D) DNA κατασκευές	64
3.6 Τρισδιάστατες (3D) DNA κατασκευές	71
4. Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας του DNA	75
4.1 Το DNA ως εκμαγείο για αυτοσυναρμολόγηση	75
4.2 Το DNA ως οδηγός για αυτοσυναρμολόγηση	77
4.3 Διαγνωστική ιατρική (medical diagnostics)	80
4.4 Πήκτωμα DNA (DNA gel) ως ικρίωμα για παραγωγή πρωτεϊνών χωρίς κύτταρα	84
4.5 Νανομηχανικές συσκευές	87
4.6 Χρήση των DNA νανοδομών για υπολογισμούς (computation)	101
5. Μελλοντικές προοπτικές	109
6. Βιβλιογραφία	110

1.1 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία του DNA

Το DNA είναι ευρέως γνωστό σε όλους ως το γενετικό υλικό των ζωντανών οργανισμών. Η γνώση της δομής της διπλής του έλικας (Watson και Crick, 1953) είχε τεράστια επίδραση στην κατανόηση των διεργασιών της ζωής. Η διπλή έλικα θα μπορούσε κάλλιστα να συμβολίζει τον πολιτισμό μας σε μελλοντικούς πολιτισμούς, με τον ίδιο τρόπο που οι πυραμίδες της Αιγύπτου, ο Παρθενώνας, οι καθεδρικοί ναοί της Μεσαιωνικής Ευρώπης και το Σινικό Τείχος είναι δομικά εμβλήματα των κοινωνιών που τα έχτισαν [12, 47]. Παρόλα αυτά, αυτά τα πολιτιστικά σύμβολα αντιπροσωπεύουν την αποθέωση των αντίστοιχων πολιτισμών, ενώ η διπλή έλικα του DNA αντιπροσωπεύει το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας. Στα 60 περίπου χρόνια από την ανακοίνωση της δομής του, έχουν διαμορφωθεί οι βάσεις της μοριακής γενετικής και της έκφρασης των γονιδίων, ο κλάδος της βιοτεχνολογίας έχει αναπτυχθεί, έχει σημειωθεί επανάσταση στη διαγνωστική και την εγκληματολογία, και έχουν καθοριστεί οι αλληλουχίες πολλών βακτηριακών γονιδιωμάτων, καθώς και ένα μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος [14, 47].

Το θαυμαστό μόριο του DNA, όμως, δεν είναι μόνο ο πρωταγωνιστής των βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με τη διατήρηση και έκφραση του γενετικού κώδικα. Μπορεί να έχει και άλλες χρήσεις. Χρήσεις, που του επιφυλάσσει όχι η φύση, αλλά η ανθρώπινη επινοητικότητα. Το 1982, ο Nadrian C. Seeman πρότεινε την κατασκευή νανοδομών από DNA, μία ιδέα που οδήγησε στη δημιουργία του κλάδου που τώρα ονομάζεται «*νανοτεχνολογία του DNA*» [36]. Ο Seeman, μάλιστα, συνήθιζε να λέει σε συναδέλφους του: «Αν δε δουλεύει, χρησιμοποίησε σφυρί. Αν εξακολουθεί να μη δουλεύει, χρησιμοποίησε μεγαλύτερο σφυρί» [6]. Μετά από περίπου 30 χρόνια σφυρηλάτησης, η νανοτεχνολογία του DNA έχει εξελιχθεί σε ένα μοναδικό διεπιστημονικό πεδίο, διασταυρώνοντας τα μονοπάτια της χημείας, της φυσικής, της πληροφορικής, της βιολογίας και της επιστήμης των υλικών. Το αναπτυσσόμενο αυτό πεδίο παράγει νέες πληροφορίες τόσο ευκάρπως όσο το μπαμπού δημιουργεί νέα βλαστάρια από το έδαφος.

1.2 Η ιδέα που δημιούργησε το πεδίο της νανοτεχνολογίας του DNA

Η σύλληψη της ιδέας που οδήγησε στη δημιουργία του κλάδου που φέρει την ονομασία «νανοτεχνολογία του DNA» έγινε από τον Nadrian Seeman, ο οποίος απεικονίζεται στο **σχήμα 1.1**. Ο διακεκριμένος αυτός επιστήμονας είχε διαπιστώσει ότι θα έπρεπε να είναι δυνατή η κατασκευή διακλαδούμενων



Σχήμα 1.1: Nadrian C. Seeman

συνδέσεων DNA (branched DNA junctions) με πολλές διακλαδώσεις, πάνω από τέσσερεις [1]. Συγκεκριμένα, σε μία από τις δημοσιεύσεις του [1] αναφέρει ότι μία μέρα, το φθινόπωρο του 1980, πήγε στο μπαρ της πανεπιστημιούπολης να σκεφτεί τις συνδέσεις με έξι διακλαδώσεις (six-arm junctions). Για κάποιο άγνωστο λόγο, του ήρθε στο μυαλό το ξυλόγλυπτο του Ολλανδού καλλιτέχνη M. C. Escher, *Depth*, το οποίο φαίνεται στο **σχήμα 1.2**. Συνειδητοποίησε ότι το κέντρο κάθε ψαριού σε εκείνη την εικόνα ήταν ακριβώς σαν μία εξιδανικευμένη εικόνα του σημείου διακλάδωσης μιας σύνδεσης με έξι διακλαδώσεις. Από αυτό το κεντρικό σημείο στο ψάρι εκτείνονται έξι στοιχεία: ένα κεφάλι και μία ουρά, ένα άνω πτερύγιο και ένα κάτω πτερύγιο, ένα αριστερό πτερύγιο και ένα δεξί πτερύγιο. Τα ψάρια είναι οργανωμένα με τον ίδιο τρόπο όπως τα μόρια σε έναν μοριακό κρύσταλλο, με περιοδικές επαναλήψεις μπροστά και πίσω, πάνω και κάτω, αριστερά και δεξιά. Έτσι, λοιπόν, σκέφτηκε ότι αν συγκρατούσε τις συνδέσεις μεταξύ τους χρησιμοποιώντας κολλώδη άκρα (sticky ends), ίσως να

μπορούσε να οργανώσει την ύλη στην κλίμακα των νανομέτρων με τον ίδιο τρόπο που ο Escher συγκράτησε μεταξύ τους το κοπάδι ψαριών χρησιμοποιώντας την φαντασία του.

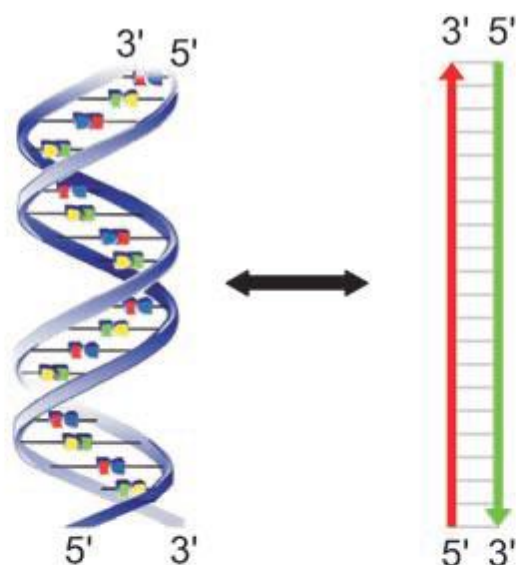


Σχήμα 1.2: Το ξυλόγλυπτο του Escher, *Depth* [1]

1.3 Λίγα λόγια για το DNA

Το DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) είναι το πιο θεμελιώδες μόριο της ζωής. Περιέχεται σχεδόν σε κάθε ζωντανό κύτταρο (υπάρχουν εξαιρέσεις, όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια) και η δομή του έχει παραμείνει πιθανότατα η ίδια για όσο υπάρχει η ζωή στη γη, δηλαδή για περίπου 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια. Αν και στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA περιέχεται σε έναν πυρήνα, δε συμβαίνει το ίδιο και στα προκαρυωτικά κύτταρα. Η λειτουργία του DNA, όμως, είναι η ίδια παντού [7]. Στη φύση, το DNA είναι η αποθηκευτική μονάδα του γενετικού υλικού και αποτελεί τη ραχοκοκαλιά της ζωής. Οι οδηγίες για οτιδήποτε χρειάζεται ένας οργανισμός για να αναπτυχθεί, να συντηρήσει τον

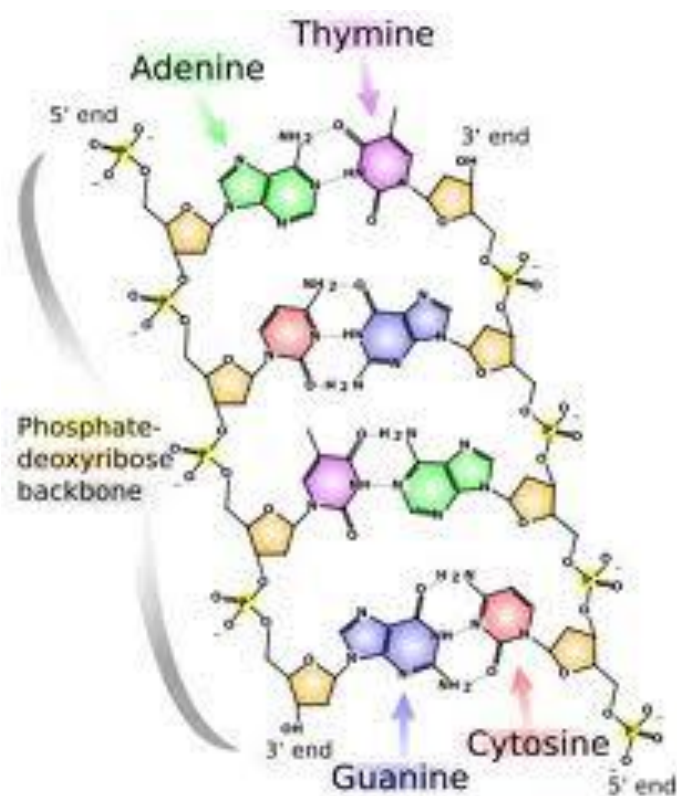
εαυτό του και να αναπαραχθεί παρέχονται από το DNA. Χημικά, είναι ένα πολυμερές νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι μόρια που έχουν ένα σάκχαρο ενωμένο και με μία αζωτούχο βάση και με μία φωσφορική [9]. Στην περίπτωση του DNA, το σάκχαρο είναι η δεοξυριβόζη και η βάση είναι μία από τις γουανίνη (G), κυτοσίνη (C), θυμίνη (T) ή αδενίνη (A). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ένζυμα όπως οι πολυμεράσες ενώνουν αυτά τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους σε μια αλυσίδα, προσδένοντας το σάκχαρο του ενός μορίου στη φωσφορική ομάδα ενός άλλου. Αυτό δημιουργεί ένα μονόκλωνο (single stranded) μόριο DNA, με μία ραχοκοκαλιά με εναλλαγές σακχάρου-φωσφορικής ομάδας και με προεξέχουσες αζωτούχες βάσεις. Επειδή το μονόκλωνο DNA (single stranded DNA, *ssDNA*) είναι σχετικά ασταθές, είναι σύνηθες το DNA να σχηματίζει ένα δίκλωνο (double-stranded) μόριο. Αυτό συμβαίνει όταν οι βάσεις του ενός κλώνου ενώνονται με τις βάσεις ενός άλλου, δημιουργώντας δομή που μοιάζει με σκάλα, η οποία συστρέφεται για να σχηματίσει μια έλικα, όπως φαίνεται στο **σχήμα 1.3** [9]. Το «μήκος κύματος» της συστροφής της έλικας είναι 3,4 nm και η διάμετρος του μορίου είναι 2 nm [7]. Ο προσανατολισμός των σακχάρων και των



Σχήμα 1.3: Η ευρέως γνωστή διπλή έλικα του DNA (αριστερά), που αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους κλώνους νουκλεοτιδίων που ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, η οποία αναπαρίσταται με δομή που μοιάζει με σκάλα (δεξιά).

φωσφορικών ομάδων σε κάθε ραχοκοκαλιά είναι αντίθετος, έτσι ώστε αν το DNA κρατηθεί κάθετα, ο ένας κλώνος να έχει τον 3' άνθρακα του σακχάρου προς τα κάτω ενώ ο άλλος να έχει τους 3' άνθρακες προς τα πάνω. Αυτό επιτρέπει τη διαφοροποίηση της κατεύθυνσης των κλώνων, οι οποίοι είναι αντιπαράλληλοι. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η αλληλουχία των κλώνων του DNA γράφεται από αριστερά προς τα δεξιά από το 5' προς το 3' [9].

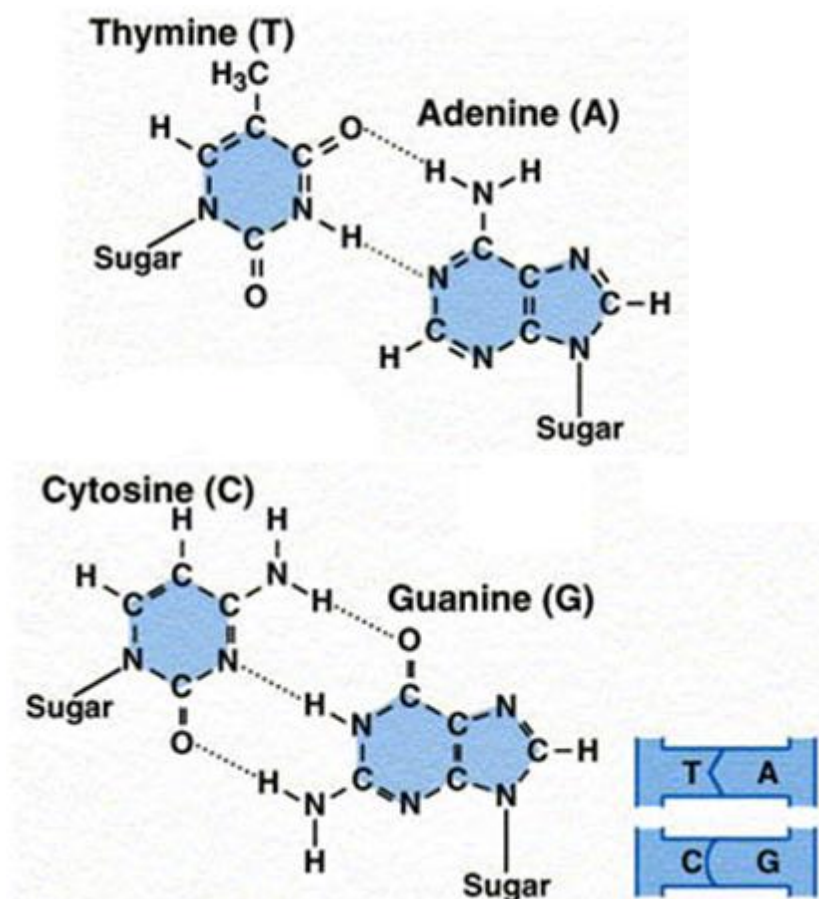
Όπως προαναφέρθηκε, η ραχοκοκαλιά του DNA σχηματίζεται από μόρια σακχάρου-φωσφορικής ομάδας. Στη θέση C1 της ριβόζης προσδέεται μία νουκλεϊκή βάση [4]. Η χημική δομή του DNA φαίνεται στο [σχήμα 1.4](#). Το δομικό μοντέλο Watson-Crick του DNA βασίστηκε στην ιδέα ότι η αδενίνη (A) ενώνεται



[Σχήμα 1.4](#): Η χημική δομή του DNA [45]

με τη θυμίνη (T) με δεσμούς υδρογόνου και η γουανίνη (G) με την κυτοσίνη (C) [4, 7, 45]. Έτσι, το περιεχόμενο σε γουανίνη ισούται πάντα με το περιεχόμενο σε κυτοσίνη, όπως και το περιεχόμενο σε θυμίνη ισούται με το περιεχόμενο σε αδενίνη (κανόνας του Chargaff). Η συμπληρωματικότητα των βάσεων

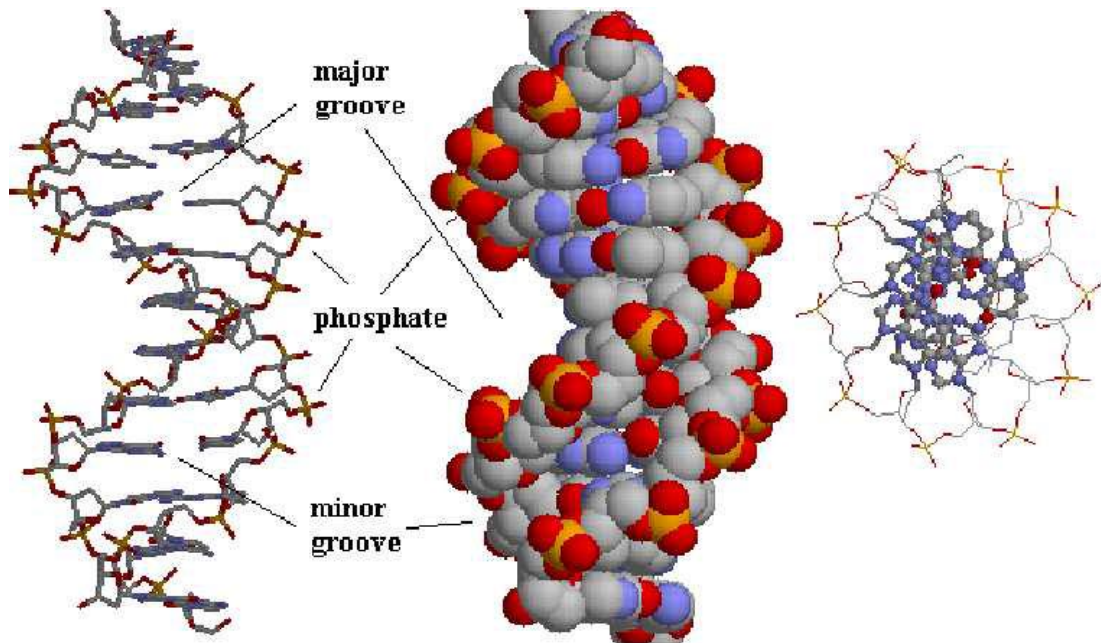
αποτυπώνεται στο **σχήμα 1.5**. Τα ζεύγη βάσεων G-C και A-T έχουν μια μοναδική γεωμετρία. Και τα δύο άτομα στη θέση C-1' απέχουν μεταξύ τους κατά 10,8 Å [4].



Σχήμα 1.5: Τα ζεύγη βάσεων κατά Watson-Crick. Η αδενίνη (A) ενώνεται με τη θυμίνη (T) (πάνω μέρος του σχήματος) και η γουανίνη (G) με την κυτοσίνη (C) (κάτω μέρος).

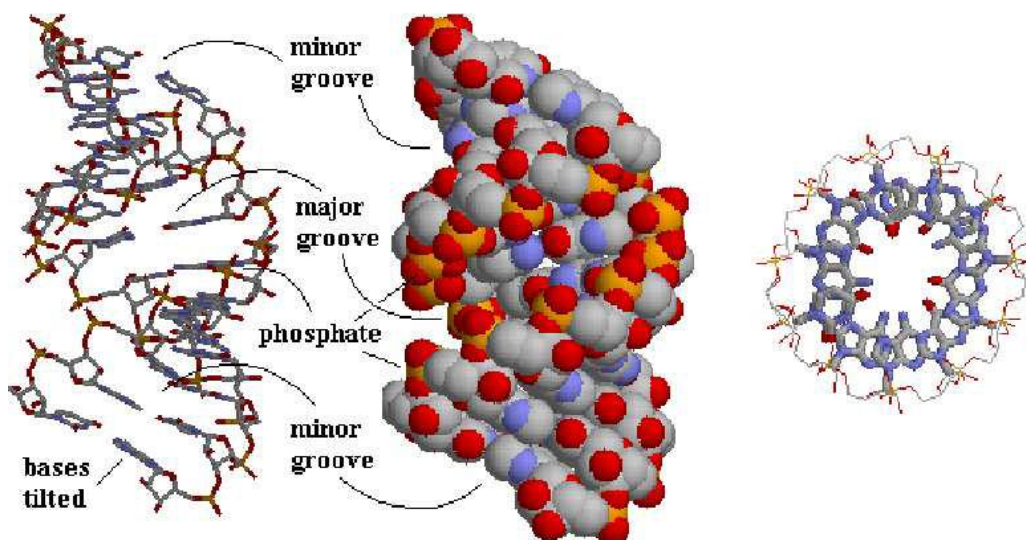
Αυτό επιτρέπει στις συμπληρωματικές (κατά Watson-Crick) αλληλουχίες να σχηματίζουν μια διπλή έλικα με το ελάχιστο ποσό διαταραχής της ραχοκοκαλιάς της έλικας.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πιο σταθερή ελικοειδής μορφή του DNA είναι το *B-DNA*. Στη B αυτή μορφή, μία πλήρης στροφή στη διπλή ελικοειδή δομή αντιστοιχεί σε 10,5 νουκλεοτίδια σε διάλυμα και σε 10,0 νουκλεοτίδια σε κρυσταλλική μορφή [4, 169]. Το B-DNA απεικονίζεται στο **σχήμα 1.6**.



Σχήμα 1.6: Η διπλή έλικα του B-DNA, που είναι η πιο σταθερή ελικοειδής μορφή του DNA [4]. Το δεξί μέρος του σχήματος δείχνει μία όψη κάτω από τον άξονα της έλικας.

Υπό συνθήκες έλλειψης νερού, το DNA μπορεί να σχηματίσει το *A-DNA*, το οποίο φαίνεται στο **σχήμα 1.7**. Στο A-DNA η έλικα έχει 11 νουκλεοτίδια ανά πλήρη στροφή του DNA.



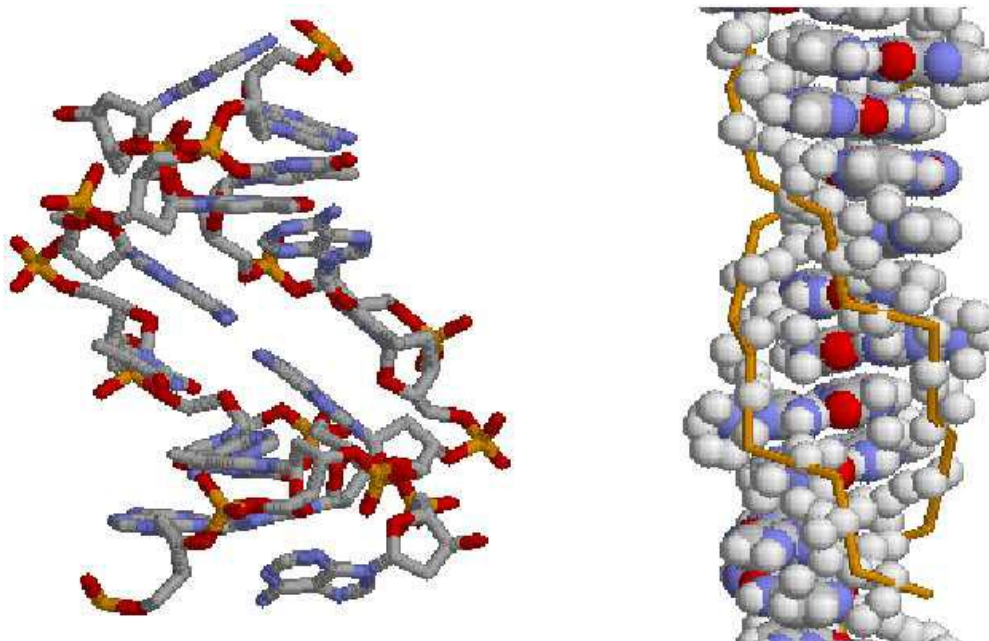
Σχήμα 1.7: Η έλικα του A-DNA, που μπορεί να σχηματιστεί υπό συνθήκες έλλειψης νερού [4]. Το δεξί μέρος του σχήματος δείχνει μία όψη κάτω από τον άξονα της έλικας.

Μια άλλη μορφή του DNA, το *C-DNA*, μπορεί να σχηματιστεί υπό συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας και απουσία περίσσειας άλατος και παρουσία ιόντων Li [4, 170]. Η έλικα του C-DNA έχει $9^{1/3}$ νουκλεοτίδια ανά πλήρη στροφή. Ένα δομικό μοντέλο του C-DNA παρουσιάζει τη μετατόπιση των βάσεων στο εξωτερικό της έλικας στη μεγάλη αύλακα (major groove) και την ανάπτυξη μιας πολύ βαθιάς μικρής αύλακας (minor groove).

Με εναλλαγή των αλληλουχιών T και A μπορεί να σχηματιστεί *D-DNA*. Τα γονίδια-υποκινητές είναι πλούσια σε AT και οι περιοχές που είναι πλούσιες σε AT είναι λιγότερο σταθερές συγκριτικά με αλληλουχίες που περιέχουν GC. Οι αλληλουχίες αυτές μπορούν να μετατραπούν από B-DNA σε D-DNA σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων ή υπό την επίρεια σταθεροποιητικών πρωτεϊνών [4]. Στο D-DNA μία πλήρης στροφή αντιστοιχεί σε 8 ζεύγη βάσεων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, σχηματίζεται *Z-DNA* από αλληλουχίες πλούσιες σε GC με αυστηρά εναλλασσόμενες αλληλουχίες πυριμιδίνης* πουρίνης**. Το Z-DNA έχει 12 ζεύγη βάσεων ανά πλήρη στροφή [171]. Σε αντίθεση με τις κανονικές διαμορφώσεις της ραχοκοκαλιάς του DNA, το Z-DNA είναι *αριστερόστροφο*. Το Z-DNA έχει μία ζιγκ-ζαγκ ραχοκοκαλιά, λόγω διαμόρφωσης C σακχάρου που αντισταθμίζει τη διαμόρφωση G γλυκοζιτικού*** δεσμού, και μία στενή μικρή αύλακα [171]. Οι δομές του D-DNA και του Z-DNA φαίνονται στο σχήμα της επόμενης σελίδας (*σχήμα 1.8*).

* Η *πυριμιδίνη* είναι μία από τους τρεις τύπους βάσεων, ετεροκυκλικής αρωματικής οργανικής ένωσης, που βρίσκονται στα νουκλεϊκά οξέα και έχουν δομή απλού δακτυλίου, όπως είναι η κυτοσίνη και η θυμίνη και η ουρακίλη. Οι πυριμιδίνες σχηματίζουν πάντα ζεύγη με τις πουρίνες στους δύο κλώνους του DNA, εξασφαλίζοντας έτσι ένα μόριο με παράλληλες πλευρές.

** Η *πουρίνη* είναι μία από τους δύο τύπους βάσεων, ετεροκυκλικής αρωματικής οργανικής ένωσης, που βρίσκονται στα νουκλεϊκά οξέα και έχουν δομή διπλού δακτυλίου, όπως είναι η αδενίνη και η γουανίνη. Οι πουρίνες προκύπτουν από τη συνένωση ενός πυριμιδινικού δακτυλίου και ενός ιμιδαζολικού δακτυλίου.

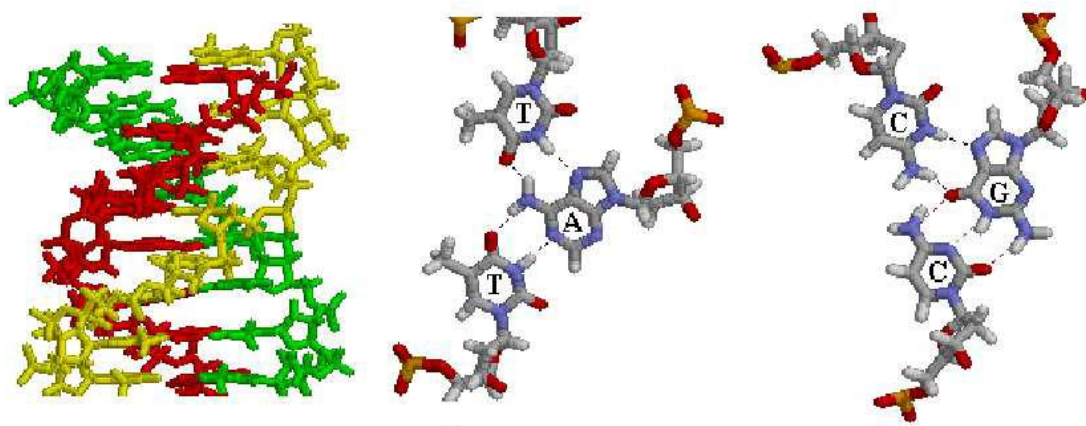


Σχήμα 1.8: Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται το *D-DNA*, το οποίο μπορεί να σχηματιστεί με εναλλασσόμενες αλληλουχίες A και T [4]. Το *Z-DNA* (δεξί μέρος του σχήματος) σχηματίζεται από αλληλουχίες πλούσιες σε GC υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Η ραχοκοκαλιά του Z-DNA είναι αριστερόστροφη.

Ένα παράδειγμα ενός νουκλεϊκού οξέος με ραχοκοκαλιά που δεν απαντάται στη φύση είναι το πεπτιδο-νουκλεϊκό οξύ (peptide nucleic acid, PNA). Το PNA μπορεί να συντεθεί και περιέχει πολυαμινοαιθυλο-γλυκίνη (polyaminoethyl-glycine), ένα πολυμερές με αμιδικούς δεσμούς [172]. Το PNA, καθώς και άλλα παράγωγα που είναι δυνατόν να συντεθούν, μπορούν να εφαρμοστούν στη νανοτεχνολογία του DNA, επειδή πλεονεκτούν στο ότι δε διασπώνται από κανένα γνωστό ένζυμο, η ραχοκοκαλιά τους είναι μη-ιονική και έχουν υδροφοβικές ιδιότητες [4].

*** Οι γλυκοζίτες είναι μία πολυπληθέστατη ομάδα ενώσεων εξαιρετικά διαδεδομένων στο φυτικό κόσμο, αποτελούμενες από μια ομάδα σακχάρου ενωμένη μέσω του ανωμερικού άνθρακά του με μια μη υδατανθρακική ομάδα (άγλυκο τμήμα) μέσω οξυγόνου ή αζώτου. Ο δεσμός αυτός ονομάζεται *γλυκοζιτικός* και διασπάται εύκολα με υδρόλυση.

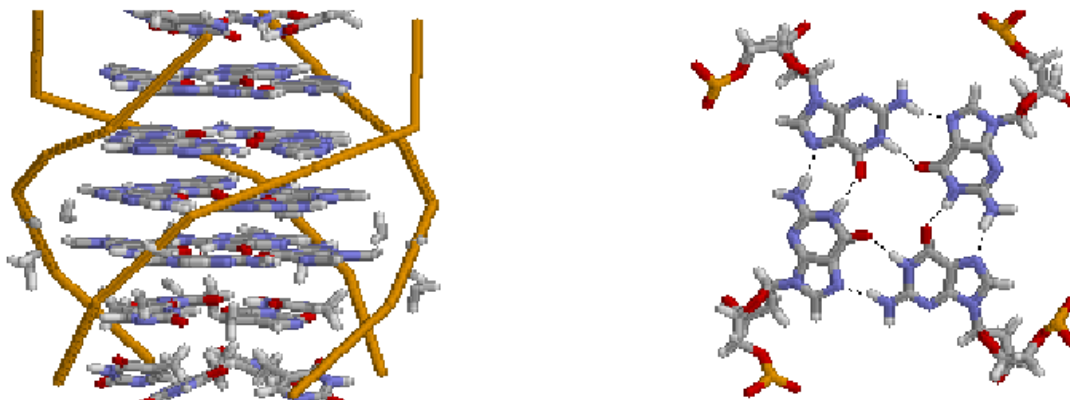
Λόγω της προσβάσιμης, ευρείας μεγάλης αύλακας του B-DNA, είναι δυνατόν να σχηματιστούν τριπλέτες βάσεων. Έτσι, μπορεί να σχηματιστεί το αποκαλούμενο «*τριπλό DNA*» (DNA triplex), το οποίο αποτελείται από τρεις κλώνους DNA και στη δομή του περιλαμβάνονται ζεύγη βάσεων τύπου Hoogsteen. Ένα ζεύγος βάσεων Hoogsteen είναι μία παραλλαγή των ζευγών βάσεων στα νουκλεϊκά οξέα. Σε αυτήν την περίπτωση, δύο νουκλεϊνικές βάσεις σε κάθε κλώνο συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου στη μεγάλη αύλακα. Ένα ζεύγος βάσεων Hoogsteen «εφαρμόζεται» στη N7 θέση της πουρίνης (ως δέκτης δεσμού υδρογόνου) και στη C6 αμινομάδα (ως δότης). Όπως φαίνεται στο [σχήμα 1.9](#), που απεικονίζει τη δομή του τριπλού DNA, ο τρίτος (κίτρινος) κλώνος κινείται παράλληλα στον κόκκινο πουρινικό κλώνο.



[Σχήμα 1.9:](#) Το «*τριπλό DNA*» (DNA triplex), το οποίο σχηματίζεται από τρεις κλώνους DNA και στη δομή του περιλαμβάνονται ζεύγη βάσεων τύπου Hoogsteen [4].

Ακόμα μία διαμόρφωση που μπορεί να έχει το DNA είναι αυτή του «*τετράκλινου DNA*» (DNA quadruplex). Τετράκλινα που αποτελούνται από γουανίνη απαντώνται ως αλληλουχίες τερματισμού στο τέλος ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων [173]. Τα τελομερή περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη (G) και συντίθενται από τελομεράσες, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA. Οι τέσσερις κλώνοι του τετράκλινου συνδέονται μεταξύ τους

μέσω τετραμερών γουανίνης (guanine quartets) [4]. Η δομή του τετράκλινου DNA φαίνεται στο **σχήμα 1.10**.



Σχήμα 1.10: Το «τετράκλινο DNA» (DNA quadruplex), το οποίο απαντάται στο τέλος ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων και περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη [4].

1.4 Οι ιδιότητες του DNA που το καθιστούν ιδανικό για τη νανοτεχνολογία

Οι ξεχωριστές ιδιότητες του DNA το καθιστούν εξαιρετική δομική μονάδα, εκμαγείο και οδηγό για τη συγκρότηση (assembly) νανοϋλικών. Η πρώτη και πιο σημαντική ιδιότητα είναι η ικανότητα μοριακής αναγνώρισης, την οποία διαθέτει το DNA λόγω της σύζευξης βάσεων κατά Watson-Crick [14, 74]. Η ιδιότητα αυτή καθιστά δυνατή την ακριβή δομική ευθυγράμμιση ποικίλων μορίων DNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ικριώματα για διάφορα μοριακά είδη [14]. Το DNA και τα ομοειδή του είναι τα μοναδικά μεταξύ των βιοπολυμερών που έχουν αυτήν την ικανότητα. Τα αντισώματα, για παράδειγμα, μπορούν να οδηγήσουν μεν σε ειδικές συνδέσεις, αλλά σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να μελετάται πειραματικά η ακριβής γεωμετρία των αλληλεπιδράσεων αντισώματος-αντιγόνου. Μόνο στην περίπτωση των νουκλεϊκών οξέων είναι δυνατόν να είναι γνωστή εκ των προτέρων η λεπτομερής γεωμετρία.

Η δεύτερη βασική ιδιότητα είναι ότι η διπλή έλικα του B-DNA είναι εκ φύσεως ένα αντικείμενο στη νανοκλίμακα. Πιο συγκεκριμένα, η διάμετρός της είναι

περίπου 2 nm και κάθε της στροφή είναι 3,4 nm και αντιστοιχεί σε 10,5 ζεύγη νουκλεοτιδίων [74]. Η διαμόρφωση του DNA είναι προβλέψιμη με ατομική ακρίβεια [6].

Εξίσου ελκυστική είναι και η τρίτη ιδιότητα του DNA. Αν και η διπλή έλικα του DNA είναι ουσιαστικά ένα εύκαμπτο πολυμερές, όπως υποδεικνύεται από την εξαιρετικά συμπαγή μορφή των χρωμοσωμάτων, η ευκαμψία αυτή είναι αμελητέα για βραχείς διπλούς κλώνους [19]. Ως πολυμερική αλυσίδα, λοιπόν, η ακαμψία και η ευκαμψία του DNA μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν, απλώς προσαρμόζοντας κατάλληλα τον αριθμό των ζευγών βάσεων [74]. Το χαρακτηριστικό μήκος ευκαμψίας (persistence length) του DNA είναι περίπου 50 nm (το οποίο αντιστοιχεί σε 150 ζεύγη βάσεων), και κάτω από αυτό το μήκος οι κλώνοι του DNA μπορούν να θεωρηθούν άκαμπτοι. Από την άλλη μεριά, το μονόκλωνο DNA (single stranded DNA, *ssDNA*) είναι πολύ πιο εύκαμπτο (το χαρακτηριστικό μήκος ευκαμψίας του μονόκλωνου DNA είναι περίπου 1 nm), και ως αποτέλεσμα, μπορεί εύκολα να σχηματίσει καμπύλες δομές και δομές με βρόχους. Συνεπώς, η ακαμψία και η ευκαμψία μπορούν να σχεδιαστούν και να ρυθμιστούν από έναν συνδυασμό μονόκλωνου DNA και δίκλωνου DNA (double stranded DNA, *dsDNA*): Η άκαμπτη διπλή έλικα του δίκλωνου DNA μπορεί να ενωθεί με σχετικά εύκαμπτους κλώνους μονόκλωνου DNA για να σχηματιστούν σταθερά μοτίβα με μια επιθυμητή τοπολογία. Η ακαμψία τεχνητών μοτίβων DNA (DNA motifs) μπορεί ακόμα και να υπερβεί εκείνη του δίκλωνου DNA [19, 74].

Η τέταρτη ιδιότητα του DNA είναι η πιο ξεχωριστή από όλες: η μοριακή βιολογία παρέχει άπλετα «εργαλεία» για τη σύνθεση, το χειρισμό και την τροποποίηση του DNA [74]. Για παράδειγμα, το φυσικό (bulk) DNA μπορεί να καθαριστεί από καλλιεργημένους οργανισμούς, όπως βακτήρια ή ζυμομύκητες. Μεμονωμένα γονίδια ή θραύσματα DNA με επιθυμητές αλληλουχίες μπορούν να διατηρηθούν σε ένα πλασμίδιο και μικρότερες αλληλουχίες DNA (ολιγονουκλεοτίδια) μπορούν να συντεθούν χημικά *de novo* (εκ νέου). Επιπλέον, η φύση μας παρέχει πάνω από 4000 διαφορετικά ένζυμα για το χειρισμό του DNA: παραδείγματος χάριν, οι ενδονουκλεάσες λειτουργούν ως «ψαλίδια» που κόβουν κλώνους DNA σε εσωτερικές περιοχές. Οι εξωνουκλεάσες λειτουργούν ως «λειαντήρες» που

κόβουν κλώνους DNA από τα άκρα. Τα περιοριστικά ένζυμα μπορούν να αναγνωρίσουν και να διασπάσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Οι λιγάσες λειτουργούν ως μόνιμη «κόλλα» για να συνδέσουν με ομοιοπολικούς δεσμούς το DNA. Οι πολυμεράσες μπορούν να επιμηκύνουν αλυσίδες DNA και οι νουκλεάσες μπορούν να αποσυνθέσουν το DNA [174]. Το DNA μπορεί, επίσης, να ενισχυθεί μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης* (polymerase chain reaction, *PCR*), μιας τεχνολογίας που πολλαπλασιάζει μια αλληλουχία DNA [74].

Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα της χρήσης του DNA ως υλικό κατασκευής είναι η σχετικά μεγάλη φυσικοχημική του σταθερότητα, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των πρωτεϊνών [19]. Ως αποτέλεσμα, υλικά νανομετρικής δομής που κατασκευάζονται από DNA μπορούν να συντεθούν, να επεξεργαστούν και να αποθηκευτούν υπό ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, χωρίς την ανάγκη ειδικών προφυλάξεων για την αποφυγή της αποσύνθεσης αυτού του βιολογικού υλικού.

Από σκοπιάς σχεδιασμού, η χρήση του DNA είναι προτιμότερη, αφού οι βασικές γεωμετρικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες του δίκλωνου DNA είναι καλά κατανοητές και μπορούν να μοντελοποιηθούν από διαθέσιμα συστήματα λογισμικού [10]. Η δομή ενός τεράστιου αριθμού περισσότερο πολύπλοκων DNA νανοδομών μπορεί να προβλεφθεί από αρκετά πρωτότυπα συστήματα λογισμικού, από λεπτομέρειες όπως η σύνθεση της αλληλουχίας, η θερμοκρασία και οι συνθήκες του ρυθμιστικού διαλύματος (που είναι παράμετροι-κλειδιά). Επίσης, υπάρχουν λογισμικά και για το σχεδιασμό DNA νανοδομών.

* Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, *PCR*) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA, χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες. Η *PCR* είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Με τη χρήση της, συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

Από τη σκοπιά των πειραμάτων, πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η χημική σύνθεση του μονόκλωνου DNA (ssDNA) είναι πλέον μια τυπική και οικονομική διαδικασία [10]. Ένας δοκιμαστικός σωλήνας με μονόκλωνο DNA που αποτελείται από οποιαδήποτε μικρή αλληλουχία βάσεων (<150) μπορεί να αποκτηθεί από εμπορικές πηγές με μέτριο κόστος (περίπου μισό αμερικάνικο δολάριο ανά βάση): θα περιέχει έναν πολύ μεγάλο αριθμό (συνήθως τουλάχιστον 10^{12}) πανομοιότυπων μορίων μονόκλωνου DNA. Το συνθετικό μονόκλωνο DNA μπορεί να έχει σφάλματα (ο πρόωρος τερματισμός της σύνθεσης είναι το πιο συχνό σφάλμα), αλλά μπορεί εύκολα να «καθαριστεί» με πολύ γνωστές τεχνικές.

Τέλος, τα μόρια του DNA είναι μη τοξικά και βιοσυμβατά, με αποτέλεσμα να είναι κατάλληλα για εφαρμογές και *in vitro* (σε δοκιμαστικό σωλήνα) και *in vivo* (σε ζωντανούς οργανισμούς) [74]. Πράγματι, κανένα άλλο υλικό δεν παρέχει όλα τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα, και έτσι, το DNA καθίσταται μία ελκυστική, πολλαπλών χρήσεων και εύκολα χειραγωγήσιμη δομική μονάδα για την κατασκευή καινοτόμων υλικών στη νανοκλίμακα.

1.5 Τα δύο είδη της νανοτεχνολογίας του DNA

Είναι σημαντικό να διακριθεί η *δομική* νανοτεχνολογία του DNA (*structural DNA nanotechnology*) από τον άλλο τύπο της νανοτεχνολογίας του DNA, που ονομάζεται *συνθετική* νανοτεχνολογία του DNA (*compositional DNA nanotechnology*) (**σχήμα 1.11**) [12, 14].

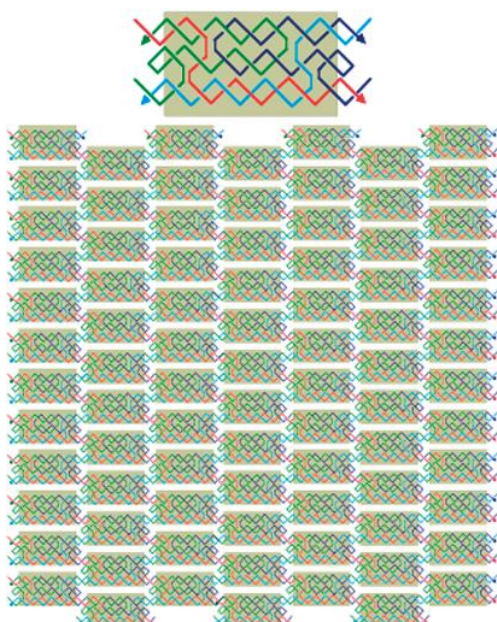
Η δομική νανοτεχνολογία του DNA χρησιμοποιεί καλά δομημένα δομικά στοιχεία, ενωμένα χρησιμοποιώντας *αμφότερες* τη χημική συγγένεια και τη δομή για να ρυθμιστεί η γεωμετρία ή, τουλάχιστον, η τοπολογία των κλώνων. Ο στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η πρόβλεψη της δομής των προϊόντων με ακρίβεια (ή διακριτική ικανότητα) 1 nm ή λιγότερο.

Αντιθέτως, στη συνθετική νανοτεχνολογία του DNA, οι προαναφερθείσες συνθήκες δεν ικανοποιούνται πλήρως. Τα δομικά στοιχεία μπορεί να είναι

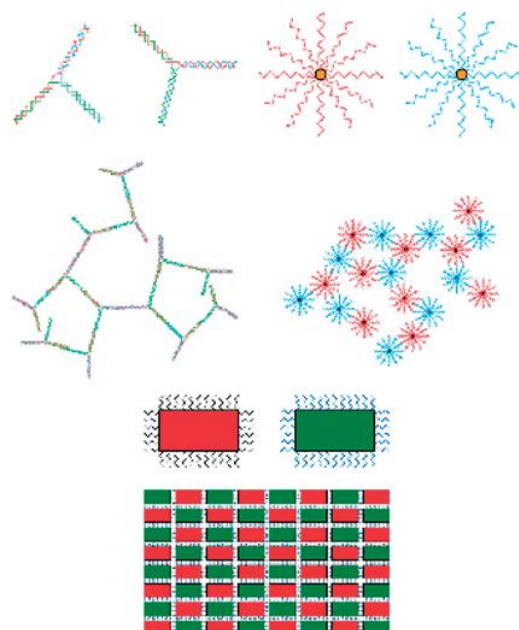
εύκαμπτα ή οι συνεκτικές αλληλεπιδράσεις που τα ενώνουν αχαρακτήριστες [12, 14]. Ως αποτέλεσμα, η σύνθεση του προϊόντος μπορεί να είναι γνωστή, αλλά η τρισδιάστατη δομή του δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί. Ατελώς χαρακτηρισμένες μορφές συνοχής, όπως η παρανεμική συνοχή (paranemic cohesion), μπορεί εν τέλει να χρησιμοποιηθούν στη δομική νανοτεχνολογία του DNA όταν χαρακτηριστούν επαρκώς.

DNA NANOTECHNOLOGY

**High Resolution/Structural:
DNA as Bricks and Mortar**



**Low Resolution/Compositional:
DNA as Mortar Only**



Σχήμα 1.11: Τα είδη της νανοτεχνολογίας του DNA. Η μεγάλης ακρίβειας δομική νανοτεχνολογία του DNA φαίνεται στα αριστερά, στην οποία το DNA χρησιμοποιείται και ως δομικό στοιχείο και ως εκμαγείο. Η μικρής ακρίβειας συνθετική νανοτεχνολογία του DNA φαίνεται στα δεξιά, στην οποία το DNA χρησιμοποιείται ως «έξυπνη κόλλα» [14].

2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ DNA

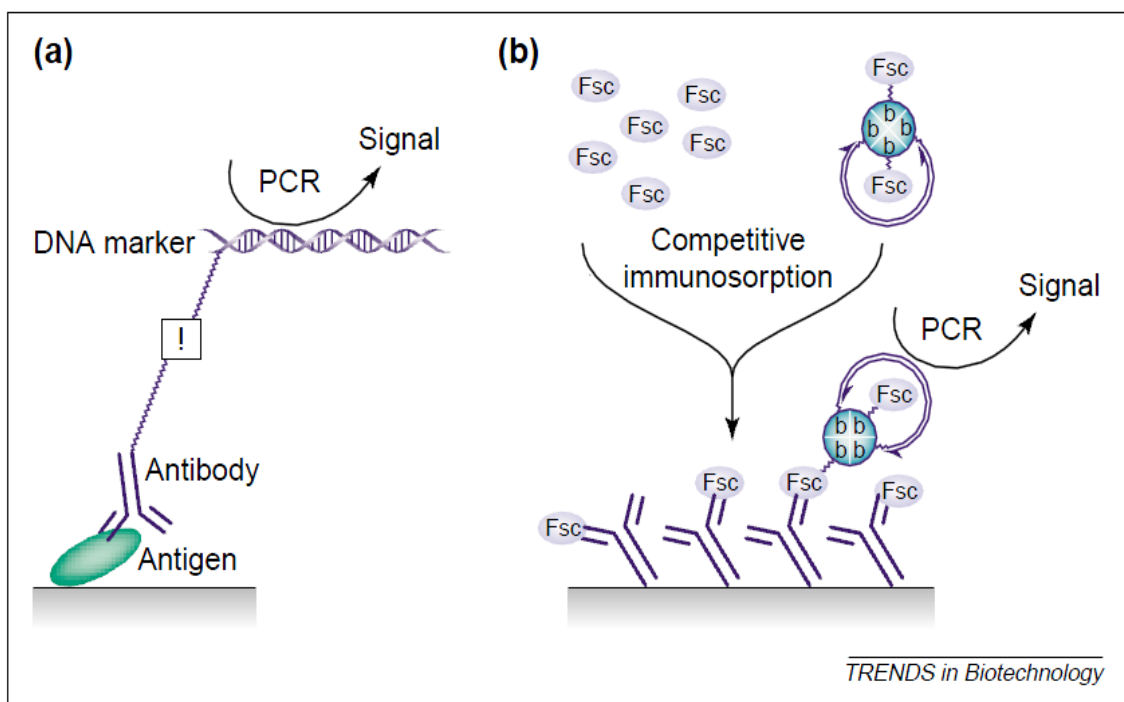
2.1 Ημισυνθετικά συζεύγματα DNA-πρωτεΐνης

Ένα παράδειγμα εφαρμογής της συνθετικής νανοτεχνολογίας του DNA (compositional DNA nanotechnology) είναι η παραγωγή ημισυνθετικών συζευγμάτων DNA-πρωτεΐνης [14]. Η δημιουργία των συζευγμάτων αυτών καθιστά δυνατό το συνδυασμό των ξεχωριστών ιδιοτήτων του DNA με τη σχεδόν απεριόριστη λειτουργικότητα των συστατικών των πρωτεϊνών [29].

Τα αντισώματα μπορούν να συζευχθούν με DNA ολιγομερή για εφαρμογές ανοσοπροσδιορισμού. Ομοιοπολικά συζεύγματα θραυσμάτων μονόκλωνου και δίκλωνου DNA και μορίων ανοσοσφαιρίνης G (immunoglobulin, IgG) χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές στην άνοσο-PCR (immuno-PCR, *IPCR*) [175], μία υπερευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση πρωτεϊνών και άλλων αντιγόνων. Η *IPCR*, η οποία αναπτύχθηκε αρχικά από τον Sano [176], είναι ένας συνδυασμός της τεχνικής ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (enzyme-linked immunosorbent assay, *ELISA*)* με τη δύναμη ενίσχυσης της PCR (*σχήμα 2.1α*). Η *IPCR* καθιστά συνήθως δυνατή τη χιλιαπλάσια ενίσχυση του ορίου ανίχνευσης του ανάλογου συστήματος *ELISA* [177].

* Η τεχνική ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (enzyme-linked immunosorbent assay, *ELISA*) χρησιμοποιείται κυρίως για μετρήσεις μεγαλομορίων (πρωτεΐνες, ανοσοσφαιρίνες), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μέτρηση απτενίων. Ο ανοσοπροσδιορισμός του αντιγόνου (*Ag*) βασίζεται σε ετερογενείς αντιδράσεις και ειδικότερα στην ακόλουθη αλληλουχία (*sandwich ELISA*): (i) σύνδεση του *Ag* σε επιφάνεια (συνήθως πολυστυρενίου) μέσω ήδη ακινητοποιημένου σε αυτήν αντισώματος *Ab* εξειδικευμένου στο *Ag*, (ii) προσθήκη περίσσειας εξειδικευμένου αντισώματος *Ab* κατάλληλα συζευγμένου με ένζυμο *E* (*Ab-E*), (iii) έκπλυση της επιφάνειας και (ετερογενής) κατάλυση της υποστρωματικής αντίδρασης από το ακινητοποιημένο ένζυμο, (iv) μέτρηση του προϊόντος *P* και συσχέτιση της ποσότητάς του με την ποσότητα του *Ag* του δείγματος.

Ο δείκτης DNA μπορεί να συζευχθεί με το αντίσωμα χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες σύντηξης [176], χημική δικτύωση [175], αλληλεπίδραση στρεπταβιδίνης-βιοτίνης [177] και αυτοσυναρμολογούμενα ολιγομερή συζεύγματα DNA-στρεπταβιδίνης [178].



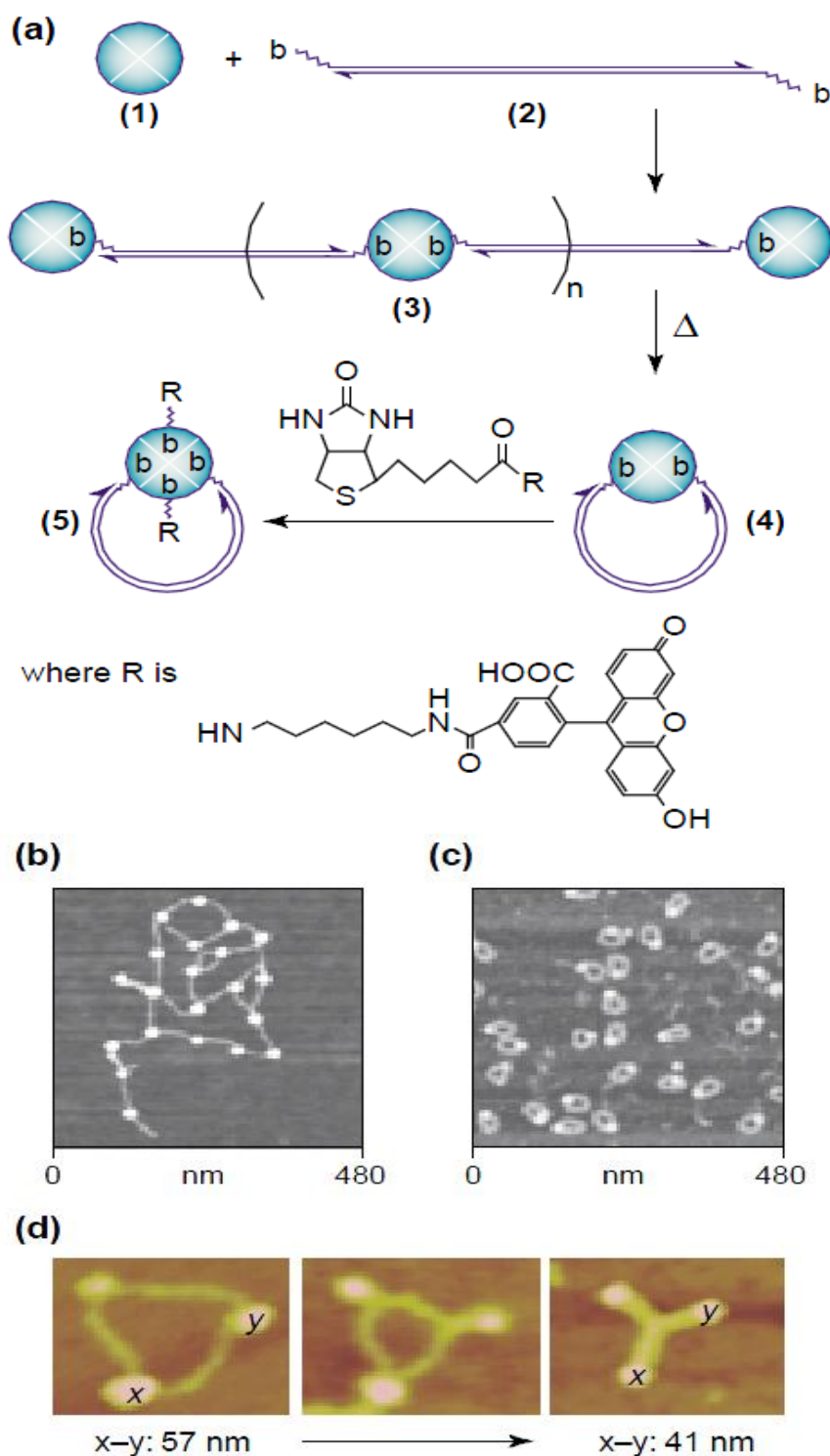
Σχήμα 2.1: (a) Εφαρμογή των συζευγμάτων DNA-πρωτεΐνης στην ανοσο-PCR (immuno-PCR, IPCR) [29]. Το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια αντιγόνο είναι συζευγμένο με ένα εξειδικευμένο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με ένα θραύσμα δείκτη DNA. Η ενίσχυση της PCR του δείκτη DNA και η μετέπειτα ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης καθιστά δυνατή την εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση του αντιγόνου. Το τετράγωνο που φαίνεται στο σχήμα μεταξύ του δείκτη και του αντισώματος υποδεικνύει την ανάγκη για μία αποδοτική στρατηγική χημικής σύζευξης. (b) Ανίχνευση αναλυτών μικρού μοριακού βάρους με ανταγωνιστική IPCR, εικονογραφημένη με πρότυπο αναλύτη την φθορισκίνη (fluorescein, Fsc) [179]. Ο ελεύθερος αναλύτης ανταγωνίζεται το σύζευγμα απτενίου-στρεπταβιδίνης για θέσεις πρόσδεσης σε μια επιφάνεια τροποποιημένη από το αντίσωμα. Μετά από ανταγωνιστική πρόσδεση και έκπλυση, το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια σύζευγμα απτενίου-DNA ανιχνεύεται με PCR.

Εκτός από την ομοιοπολική σύζευξη, άλλη μία κατάλληλη προσέγγιση για την παραγωγή ημισυνθετικών συζευγμάτων DNA-πρωτεΐνης βασίζεται στην αξιοσημείωτη βιομοριακή αναγνώριση της βιοτίνης (biotin) από την ομοτετραμερή πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη (streptavidin, STV) [29]. Λόγω της εξαιρετικής σταθεράς χημικής συγγένειας της αλληλεπίδρασης στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (STV-biotin) ($10^{14} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), της τρομερής χημικής και θερμικής σταθερότητας της στρεπταβιδίνης και της διαθεσιμότητας αναρίθμητων παραγώγων της βιοτίνης και ήπιων διεργασιών βιοτινυλίωσης*, τα συζεύγματα βιοτίνης-STV αποτελούν τη βάση πολλών διαγνωστικών και αναλυτικών ελέγχων.

Αντικείμενο μελέτης έχει αποτελέσει η αυτοσυναρμολόγηση** (self-assembly) της στρεπταβιδίνης (1) και 5',5'-διβιοτινυλιωμένων θραυσμάτων δίκλωνου DNA (2) (σχήμα 2.2) [178]. Τα δισθενή μόρια δίκλωνου DNA αλληλοσυνδέονται με την τετρασθενή στρεπταβιδίνη, δημιουργώντας, έτσι, τρισδιάστατα συνδεδεμένα δίκτυα. Η ηλεκτροφόρηση πήγματος και η μικροσκοπία σαρωτικής ισχύος (scanning force microscopy, SFM) υποδεικνύουν ότι τα ολιγομερή (3) περιέχουν κυρίως δισθενή μόρια στρεπταβιδίνης που γεφυρώνουν παρακείμενα θραύσματα DNA [29]. Παρόλο που η πρωτεΐνη STV είναι τετρασθενής, υπάρχουν και τρισθενή μόρια στρεπταβιδίνης ως σημεία διακλάδωσης και η παρουσία τετρασθενών μορίων στρεπταβιδίνης στα υπερμοριακά (supramolecular) δίκτυα είναι σπάνια (σχήμα 2.2). Ως συνέπεια του μικρού σθένους της στρεπταβιδίνης, τα ολιγομερή συζεύγματα έχουν μεγάλη υπολειπόμενη «χωρητικότητα» σύνδεσης με τη βιοτίνη. Αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόσθετες

* Η βιοτινυλίωση (biotinylation) είναι μια διαδικασία χημικής πρόσδεσης οργανικών μορίων και πρωτεϊνών με βιοτίνη. Βιοτινυλιωμένα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε ποικιλία βιοαναλυτικών και διαγνωστικών μεθόδων που βασίζονται στην ισχυρότατη μοριακή (μη ομοιοπολική) σύζευξη της βιοτίνης με τις πρωτεΐνες στρεπταβιδίνη και αβιδίνη.

** Η αυτοσυναρμολόγηση (self-assembly) είναι η αυθόρμητη οργάνωση μορίων ή αντικειμένων σε ευσταθείς συναθροίσεις κάτω από συνθήκες ισορροπίας.



Σχήμα 2.2: (a) Σχηματική αναπαράσταση της αυτοσυναρμολόγησης (self-assembly) ολιγομερών συζευγμάτων DNA-στρεπταβιδίνης (STV) (3) από 5',5'-δι-βιοτινυλιωμένο DNA (2) και STV (1) [178]. Πρέπει να επισημανθεί ότι η

σηματική δομή των συζευγμάτων (3) απλοποιείται, επειδή ένα μέρος των μορίων στρεπταβιδίνης λειτουργούν ως τρισθενή και τετρασθενή συνδετικά μόρια μεταξύ παρακείμενων θραυσμάτων DNA. Τα υπερμοριακά δίκτυα των συζευγμάτων DNA-STV (3) μπορούν να διασπαστούν με θερμική κατεργασία, οδηγώντας στον αποδοτικό σχηματισμό νανοκύκλων (4). Οι νανοκύκλοι (4) μπορούν να γίνουν λειτουργικοί μέσω της σύζευξης βιοτινυλιωμένων ομάδων απτενίων, όπως η φθορισκίνη (fluorescein, Fsc) (5). Χάρην απλοποίησης, οι κλώνοι του cDNA είναι σχεδιασμένοι ως παράλληλες γραμμές. Τα 3'-άκρα υποδεικνύονται από τις κεφαλές των βελών. (b) Εικόνες μικροσκοπίας σαρωτικής ισχύος (scanning force microscopy, SFM) των ολιγομερών συζευγμάτων DNA-στρεπταβιδίνης (3) και (c) των νανοκύκλων DNA-στρεπταβιδίνης (4). (d) Ιοντοεναλλαγή των ολιγομερών (3). Η σχετική απόσταση των μορίων στρεπταβιδίνης μεταβάλλεται από την αυξημένη υπερσπείρωση (supercoiling) των διασυνδεόμενων DNA συνδετών (DNA linkers). Οι εικόνες της SFM υποδεικνύουν δομικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν για αντιπροσωπευτικά στοιχεία DNA₃-STV₃, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα δίκτυα ολιγομερών (3). Ας σημειωθεί ότι η δομή της πρώτης από τα αριστερά εικόνας αντιπροσωπεύει τα διευρυμένα είδη, ενώ η δομή της πρώτης από τα δεξιά εικόνας περιέχει πλήρως υπερσπειρωμένα θραύσματα DNA. Η δομή στη μέση αντιπροσωπεύει μία ενδιάμεση, που σχηματίστηκε με μερική υπερσπείρωση των DNA συνδετών [29].

λειτουργίες των συμπλόκων. Για παράδειγμα, βιοτινυλιωμένα αντισώματα έχουν συζευχθεί με ολιγομερή (3), οδηγώντας σε λειτουργικά συζεύγματα που εφαρμόζονται ως ισχυρότατα αντιδραστήρια σε προσδιορισμούς IPCR [29, 178].

Τα ολιγομερή συζεύγματα DNA-στρεπταβιδίνης μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν ως ένας μοριακός σκελετός για τη δημιουργία νανοϋλικών βασισμένων στο DNA (DNA-based nanomaterials) [29]. Παραδείγματος χάριν, βιοτινυλιωμένα μακρομόρια, όπως ένζυμα, αντισώματα, πεπτίδια, ακόμη και ανόργανα μεταλλικά νανο-συσσωματώματα ή πολυμερή μπορούν να οργανωθούν στην κλίμακα των νανομέτρων. Λόγω του μεγέθους, της συνεκτικότητας και της τοπογραφίας τους, τα ολιγομερή (3) μπορούν, επιπλέον, να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα συστήματα για δίκτυα νανοσωματιδίων

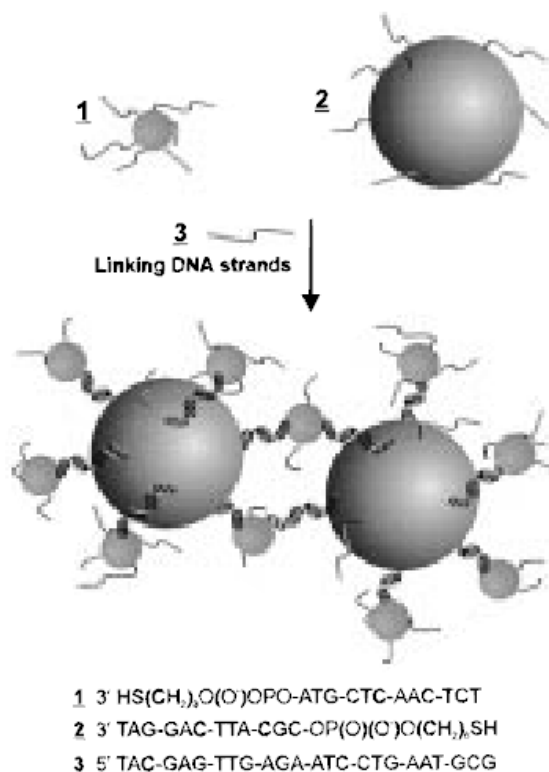
ενωμένων με DNA (DNA-linked nanoparticle networks). Επειδή τα θραύσματα του DNA μέσα στα δίκτυα επιδέχονται εξωτερικών ερεθισμάτων, είναι δυνατόν να κατασκευαστούν νανομηχανικές συσκευές (nanomechanical devices), όπως ιοντοεναλλασσόμενα συσσωματώματα νανοσωματιδίων (ion-switchable nanoparticle aggregates) (*σχήμα 2.2d*). Δυνητικές εφαρμογές περιλαμβάνουν την παρασκευή λειτουργικών υπερμοριακών νανοϋλικών, που χρησιμεύουν, για παράδειγμα, στον έλεγχο των οπτικών και ηλεκτρονικών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων και στη ρύθμιση της προσβασιμότητας του DNA σε ένζυμα [29].

Άλλη μία δυνατότητα των ολιγομερών (**3**) είναι ο αποδοτικός μετασχηματισμός τους σε σαφώς καθορισμένους υπερμοριακούς νανοκύκλους (nanocircles) DNA-STV (**4**) με θερμική κατεργασία (*σχήμα 2.2*). Λόγω της διαθεσιμότητάς τους και της σαφώς καθορισμένης στοιχειομετρίας και δομής τους, οι νανοκύκλοι αποτελούν βασικό εργαλείο για τη δημιουργία συζευγμάτων απτενίου-DNA. Για παράδειγμα, η χρήση των νανοκύκλων (**4**) με βιοτινυλιωμένα απτένια καθιστά δυνατή τη δημιουργία συζευγμάτων απτενίων (**5**), που μπορούν να βρουν εφαρμογή ως αντιδραστήρια σε έναν καινοτόμο ανταγωνιστικό ανοσο-PCR (cIPCR) προσδιορισμό για υπερευαίσθητη ανίχνευση αναλυτών μικρού μοριακού βάρους (*σχήμα 2.1b*). Πρότυπες μελέτες δείχνουν ότι η cIPCR καθιστά δυνατή τη χιλιαπλάσια βελτίωση του ορίου ανίχνευσης των συμβατικών προσδιορισμών που βασίζονται σε αντισώματα, όπως της ανταγωνιστικής ELISA [29].

2.2 Καθοδηγούμενη από το DNA σύνθεση δυαδικών νανοσωματιδιακών υλικών δικτύου (binary nanoparticle network materials)

Μία ακόμη μέθοδος που εντάσσεται στη συνθετική νανοτεχνολογία του DNA είναι η μη ομοιοπολική, πολλαπλών χρήσεων μέθοδος για τη συγκρότηση νανοσωματιδίων σε δίκτυα υλικών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί νανοσωματιδιακές δομικές μονάδες, οι οποίες καθίστανται λειτουργικές με ολιγονουκλεοτίδια και έναν συνδέτη (linker) που είναι συμπληρωματικός στα τροποποιημένα νανοσωματίδια [24]. Η στρατηγική της καθοδηγούμενης από το DNA (DNA-directed) συγκρότησης έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή

δυσδιάδικων (με δύο δομικά στοιχεία) υλικών δικτύου που αποτελούνται από νανοσωματίδια δύο διαφορετικών μεγεθών (*σχήμα 2.3*).



Σχήμα 2.3: Δυσδιάδικα (με δύο δομικά στοιχεία) υλικά δικτύου που αποτελούνται από νανοσωματίδια δύο διαφορετικών μεγεθών [24]

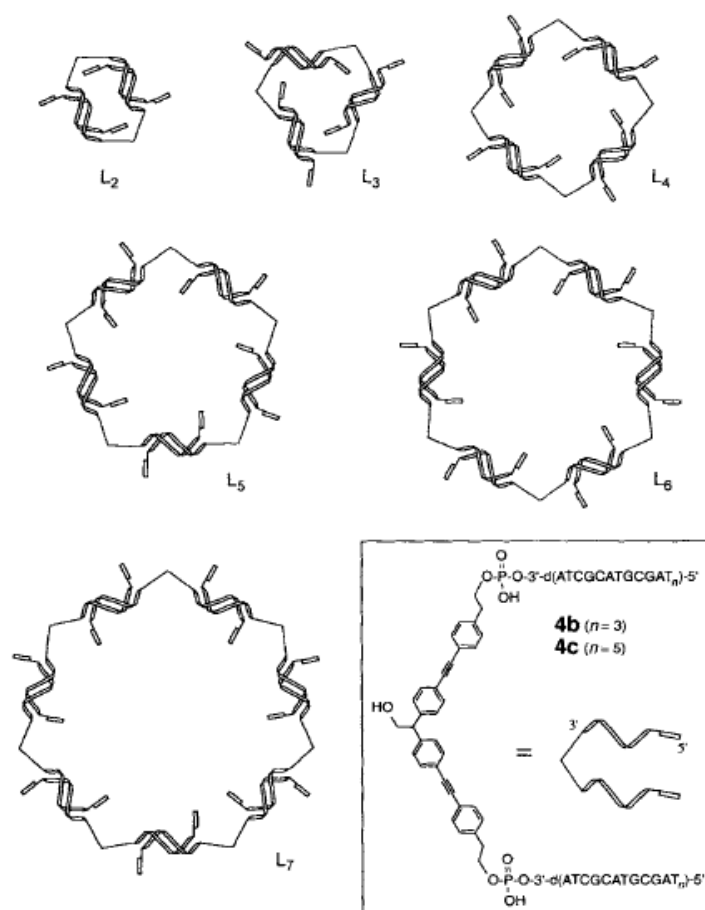
Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται οι ιδιότητες μοριακής αναγνώρισης των ολιγονουκλεοτιδίων για να κατευθύνουν την τοποθέτηση δύο διαφορετικών ειδών σωματιδίων σε διευρυμένα συγκροτήματα σωματιδίων. Τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται ως δομικές μονάδες δεν είναι απαραίτητο να διαφέρουν μόνο σε μέγεθος· η μεθοδολογία αυτή μπορεί να επεκταθεί σε δομικές μονάδες που διαφέρουν σε χημική σύνθεση (όπως, για παράδειγμα, τα CdS, CdSe, Pt και Ag) [24].

2.3 Συγκρότηση καινοτόμων DNA κύκλων με άκαμπτους τετραεδρικούς συνδέτες (linkers)

Μία ακόμη μέθοδος που εντάσσεται στη συνθετική νανοτεχνολογία του DNA είναι αυτή με την οποία κατασκευάστηκαν υπομονάδες που περιέχουν DNA, στις

οποίες το DNA λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ άκαμπτων κορυφών (κόμβων). Οι κορυφές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε μέχρι τέσσερις διακλαδώσεις ολιγονουκλεοτιδίων να είναι προσκολλημένες μέσω άκαμπτων διαχωριστών σε έναν μοναδικό τετραεδρικό κόμβο [25]. Οι κόμβοι θα μπορούσαν να κατασκευαστούν με διαφορετικό αριθμό διακλαδώσεων, η καθεμία από τις οποίες να περιέχει διαφορετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, προκειμένου να κατευθυνθεί η κατασκευή ξεχωριστών υπερμοριακών συγκροτημάτων.

Για την απόδειξη αυτής της ιδέας, το 1997, κατασκευάστηκε μία απλή κορυφή με δύο διακλαδώσεις, που αποτελείται από δύο *p*-(2-υδροξυαιθυλο)φαινυλεθυλοφαινυλικούς [*p*-(2-hydroxyethyl)phenylethynylphenyl] διαχωριστές και είναι προσδεμένη σε ένα μοναδικό τετραεδρικό άτομο άνθρακα (**σχήμα 2.4**). Οι



Σχήμα 2.4: Αυτοσυναρμολόγηση DNA κύκλων βασισμένων σε άκαμπτες κορυφές που είναι προσδεμένες σε δύο αυτο-συμπληρωματικά (self-complementary)

ολιγονουκλεοτίδια. Οι μη υβριδισμένες μονάδες θυμίνης στα 5'-άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων συμβολίζονται με μικρά ορθογώνια [25].

συζευγμένες με ολιγονουκλεοτίδια κορυφές αυτοσυναρμολογούνται μέσω υβριδοποίησης σε μια σειρά ξεχωριστών κυκλικών υπερμοριακών δομών, οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση πήγματος (gel electrophoresis). Κι άλλοι συνθετικοί DNA κύκλοι έχουν κατασκευαστεί, αλλά διαφέρουν αξιολογικά και στη δομή και στην αρχή της εφαρμοζόμενης μεθόδου [180-182]. Οι κύκλοι, αφού πρώτα σταθεροποιηθούν κατάλληλα με ομοιοπολική δικτύωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικά στοιχεία για τη συγκρότηση δομών με μεγαλύτερη τάξη [25].

2.4 Άλλες εφαρμογές της συνθετικής νανοτεχνολογίας του DNA

Δεν είναι λίγα τα εργαστήρια που μέσω της συνθετικής νανοτεχνολογίας του DNA έχουν κατασκευάσει χρήσιμα και πολύτιμα υλικά [14]. Για παράδειγμα, αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί στη διαγνωστική [22], στην οργάνωση DNA νανοσωματιδίων σε μικρή [23] και μεγάλη [24] κλίμακα, σε συνδυασμό με οργανικά δομικά στοιχεία διάφορα του DNA [25, 26], και στην παραγωγή συσσωματωμάτων DNA-πρωτεϊνών [27]. Παρόλο που η συνθετική νανοτεχνολογία του DNA, σε αντίθεση με τη δομική, δεν οδηγεί σε προϊόντα με δομικά χαρακτηριστικά υψηλής «ευκρίνειας», μπορεί να εφαρμοστεί στην οργάνωση νανοσωματιδίων και να οδηγήσει σε οργανωμένα προϊόντα, αλλά μικρότερης ακρίβειας [14]. Επιπλέον, οι αγωγοί γουανίνης (G-wires) [28, 29] αποτελούν παραδείγματα καλά δομημένων συστημάτων νουκλεϊκών οξέων που στερούνται της ποικιλίας αλληλουχιών που υπάρχει στα προϊόντα της δομικής νανοτεχνολογίας του DNA.

Στη συνθετική νανοτεχνολογία του DNA, το DNA χρησιμοποιείται απλώς μόνο ως «έξυπνη κόλλα» και όχι ως ένα δομικό στοιχείο ακριβείας. Ως αποτέλεσμα, η χρησιμότητα των προϊόντων της είναι πολύ μικρότερη από αυτή των προϊόντων της υψηλής ακρίβειας δομικής νανοτεχνολογίας του DNA. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία αναλύεται διεξοδικότερα η δομική νανοτεχνολογία του DNA.

3. ΔΟΜΙΚΗ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ DNA - ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

3.1 Διακλαδούμενο DNA και κολλώδη άκρα

Εκ πρώτης όψεως, φαίνεται ότι το DNA δεν μπορεί να οδηγήσει σε ενδιαφέρουσες δομές. Το φυσικά απαντώμενο DNA σχηματίζει μία γραμμική αλυσίδα, σαν ένα μεγάλο κομμάτι νήματος. Οπότε, το περισσότερο που μπορεί κανείς να φανταστεί ότι είναι δυνατόν να σχηματιστεί από αυτό είναι γραμμές ή κύκλοι [1]. Αλλά η γραμμική αλυσίδα δεν είναι η μοναδική μορφή που παίρνει το DNA. Κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων κυτταρικών διεργασιών, το DNA απαντάται βραχέως ως *διακλαδούμενο* (branched) μόριο. Αυτή η διακλάδωση συμβαίνει όταν το DNA αντιγράφεται (ως προετοιμασία για κυτταρική διαίρεση) και κατά τη διάρκεια του ανασυνδυασμού (όταν γενετικό υλικό ανταλλάσσεται μεταξύ ζευγών χρωμοσωμάτων, όπως συμβαίνει όταν παράγονται το σπέρμα και τα ωάρια) [1].

Οι διακλαδώσεις σχηματίζονται όταν η διπλή έλικα ξετυλίγεται μερικώς σε δύο κλώνους. Στην αντιγραφή, από τον κάθε κλώνο σχηματίζεται μία νέα διπλή έλικα με την προσθήκη συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων σε όλο το μήκος του. (Νουκλεοτίδιο είναι ο συνδυασμός μιας βάσης και του αντίστοιχου τμήματος της ραχοκοκαλιάς της έλικας). Πιο ενδιαφέρουσα είναι η διασταύρωση (crossover) που λαμβάνει χώρα στον ανασυνδυασμό, κατά τον οποίο δύο κομμάτια DNA σπάνε και ξετυλίγονται μερικώς και οι τέσσερις κλώνοι που προκύπτουν συνδέονται με μία διασταύρωση που μοιάζει με εκείνη όπου συναντώνται δύο λεωφόροι.

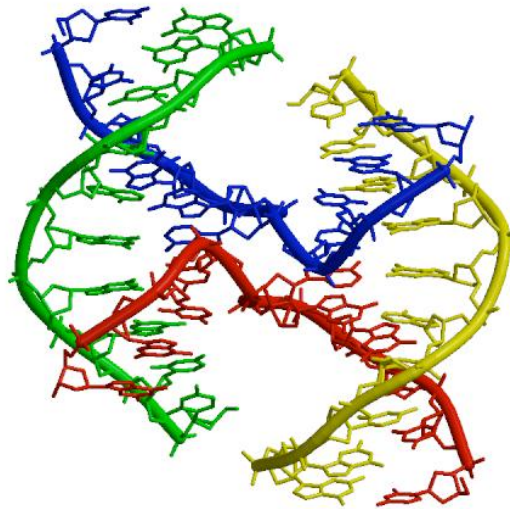
Στο ανασυνδυαζόμενο DNA, το σημείο διακλάδωσης μετακινείται λόγω διπλής συμμετρίας (όπως αυτή του αριθμού "69") της αλληλουχίας βάσεων [1]. Λόγω της συμμετρίας αυτής, ο κάθε κλώνος μπορεί να «ζευγαρώσει» με οποιουδήποτε άλλους δύο κλώνους. Ο Nadrian Seeman, κατά τη διάρκεια της συνεργασίας του με τον Bruce H. Robinson, το 1979, στο πανεπιστήμιο της Ουάσιγκτον, αναγνώρισε ότι συνθετικά μόρια DNA στα οποία λείπει αυτή η

συμμετρία μπορούσαν να σχηματίσουν διακλαδούμενα μόρια των οποίων τα σημεία διακλάδωσης δεν κινούνται. Για να σχεδιάσει κανείς ένα τέτοιο σύνδεσμο (junction), θα πρέπει να φτιάξει τέσσερις κλώνους από DNA. Για κάθε κλώνο, η αλληλουχία κατά μήκος του μισού κλώνου θα ταίριαζε με το μισό ενός άλλου κλώνου και το υπόλοιπο μισό θα ταίριαζε με το μισό ενός τρίτου κλώνου [1].

Η αγαπημένη δομή του DNA είναι η συμβατική δομή της διπλής έλικας που ταυτοποιήθηκε από τους Watson και Crick. Μία ποσότητα που καλείται ελεύθερη ενέργεια καθορίζει ποια δομή είναι προτιμότερη. Γενικότερα, η ελεύθερη ενέργεια καθορίζει αν μια χημική αντίδραση πραγματοποιείται κατά την ορθή ή κατά την αντίθετη κατεύθυνση. Καθορίζει, επίσης, τη στερεοδομή μεγάλων μορίων όπως του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών. Ένα χημικό σύστημα έχει πάντα την τάση να μεταβάλλεται πλησιάζοντας προς την κατάσταση που έχει τη μικρότερη ελεύθερη ενέργεια. Στην περίπτωση δύο συμπληρωματικών κλώνων ή νουκλεοτιδίων, η ελεύθερη ενέργεια ελαχιστοποιείται όταν αυτά «ζευγαρώνονται» για να σχηματίσουν μία διπλή έλικα [1].

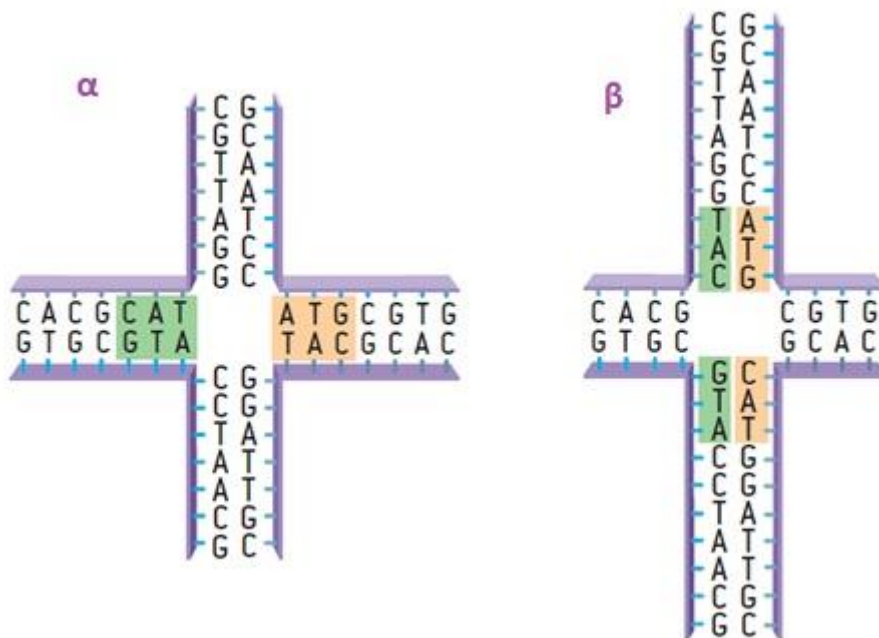
Οι τέσσερις κλώνοι του σχεδιαζόμενου ακίνητου συνδέσμου μπορούν να ενωθούν και να σχηματίσουν τη μέγιστη ποσότητα συμβατικών διπλών ελίκων DNA μόνο σχηματίζοντας ένα διακλαδούμενο μόριο. Εν γένει, ένα σημείο διακλάδωσης δεν ευνοείται, αφού αυξάνει την ελεύθερη ενέργεια του μορίου, αλλά η αύξηση αυτή αντισταθμίζεται από την πολύ μεγαλύτερη εξοικονόμηση ενέργειας στις τέσσερις διακλαδώσεις που αποτελούνται από DNA στην τυπική μορφή της διπλής έλικας.

Ένα ενδιάμεσο στον γενετικό ανασυνδυασμό που αποτελείται από τέσσερις κλώνους καθένας από τους οποίους αποτελεί μία διακλάδωση είναι ο σύνδεσμος Holliday (*Holliday junction*) [183], που φαίνεται στο σχήμα της επόμενης σελίδας (**σχήμα 3.1**). Η ύπαρξη συμμετρίας στους φυσικά απαντώμενους συνδέσμους Holliday επιτρέπει την πραγματοποίηση μιας ισομερείωσης γνωστής ως μετακίνηση διακλάδωσης (branch migration),



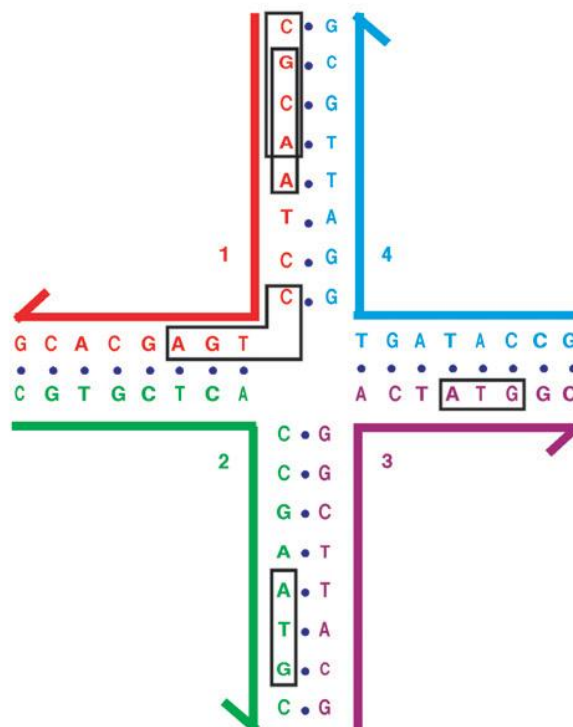
Σχήμα 3.1: Ένας σύνδεσμος Holliday [10]

μέσω της οποίας το σημείο διακλάδωσης κινείται [2]. Η κίνηση αυτή αποτυπώνεται στο **σχήμα 3.2**, στο οποίο φαίνεται ένα φυσικά απαντώμενο διακλαδούμενο DNA και το ίδιο DNA μετά από κίνησή του [1].



Σχήμα 3.2: (α) Ένα φυσικά απαντώμενο διακλαδούμενο DNA, στο οποίο τέσσερις διπλές έλικες ενώνονται σε ένα σημείο διακλάδωσης και (β) το ίδιο DNA μετά από μετακίνηση του σημείου διακλάδωσης, η οποία είναι δυνατή λόγω συμμετρίας των αλληλουχιών βάσεων στις τέσσερις διακλαδώσεις [1].

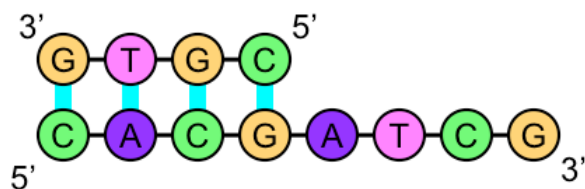
Όπως ήδη προαναφέρθηκε, είναι δυνατόν να κατασκευαστεί διακλαδούμενο DNA του οποίου το σημείο διακλάδωσης δεν κινείται, μέσω εξάλειψης της φυσιολογικά υπάρχουσας συμμετρίας. Ένα τέτοιο παράδειγμα απεικονίζεται στο [σχήμα 3.3](#).



Σχήμα 3.3: Ένας σταθερός διακλαδούμενος σύνδεσμος. Δεν υπάρχει δυαδική συμμετρία γύρω από το σημείο διακλάδωσης. Τετραμερή όπως οι αλληλουχίες στα κουτιά CGCA και GCAA είναι μοναδικά και δεν υπάρχει TCAG να συμπληρώσει την αλληλουχία CTGA που βρίσκεται στη γωνία [14].

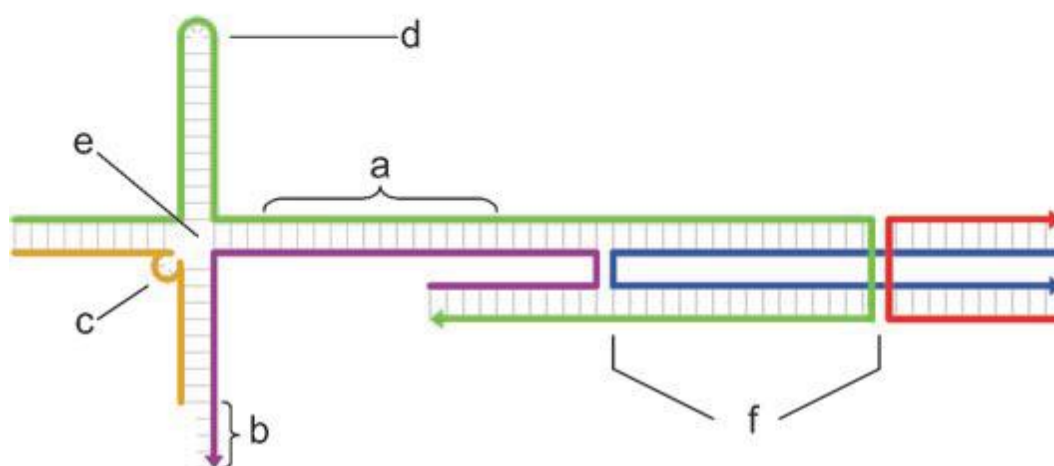
Η νανοτεχνολογία του DNA οφείλει σε μεγάλο μέρος την ανάπτυξή της στην ύπαρξη των αποκαλούμενων κολλωδών άκρων (sticky ends). Στο [σχήμα 3.4](#) απεικονίζεται ένα κολλώδες άκρο, στο οποίο μη υβριδοποιημένο μονόκλωνο DNA προεξέχει από το τέλος μιας διπλής έλικας [10]. Το κολλώδες αυτό άκρο (ATCG) προεξέχει από δίκλωνο DNA (CACG στον κάτω κλώνο).

Η δημιουργία πολύπλοκων μοτίβων DNA μπορεί να περιλαμβάνει τη χρήση όχι μόνο κολλωδών άκρων, αλλά και περιοχών διπλής έλικας (double-helical



Σχήμα 3.4: Ένα κολλώδες άκρο (sticky end)

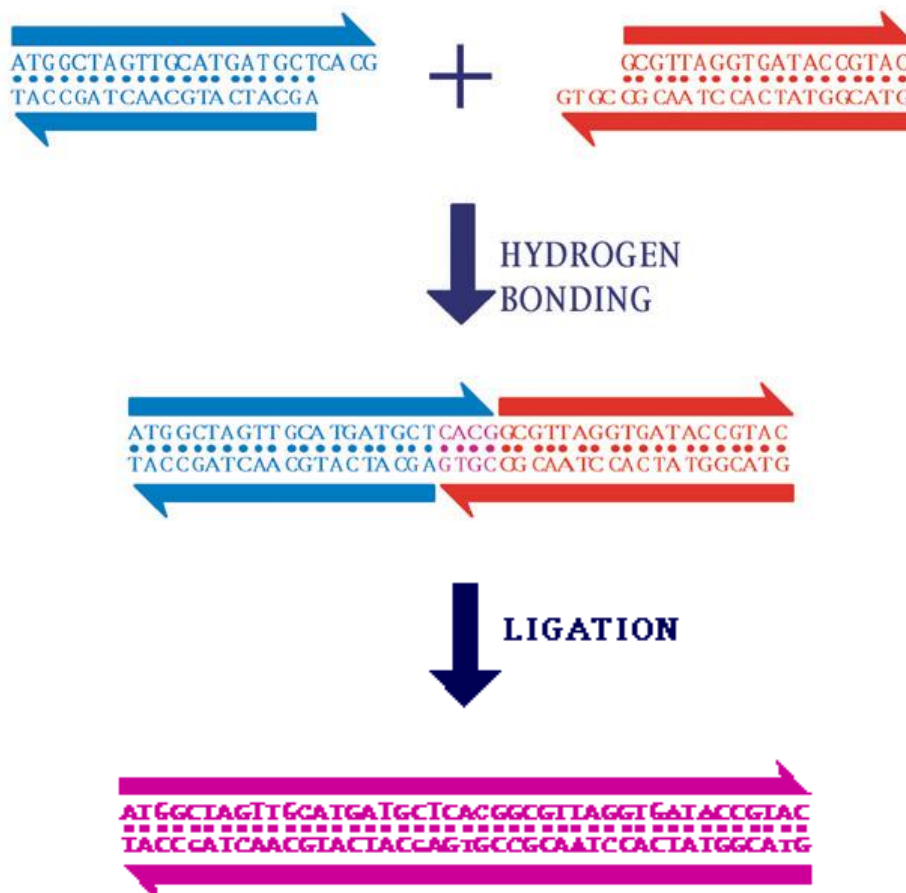
regions), προεξόντων βρόχων (bulge loops), βρόχων σχήματος φουρκέτας (hairpin loops), κόμβων (junctions) και διασταυρώσεων (crossovers) (σχήμα 3.5) [19].



Σχήμα 3.5: Η επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών DNA επιτρέπει τη δημιουργία πολύπλοκων μοτίβων που περιέχουν a) περιοχές διπλής έλικας (double-helical regions), b) κολλώδη άκρα (sticky ends), c) προεξόντες βρόχους (bulge loops), d) βρόχους σχήματος φουρκέτας (hairpin loops), e) κόμβους (junctions) και f) διασταυρώσεις (crossovers) [19].

Η σύνδεση γραμμικών μορίων DNA με κολλώδη άκρα [184] είναι αναμφισβήτητα η θεμελιώδης αντίδραση της γενετικής μηχανικής εδώ και τουλάχιστον 35 χρόνια. Η συνένωση κολλωδών άκρων (sticky-ended cohesion)

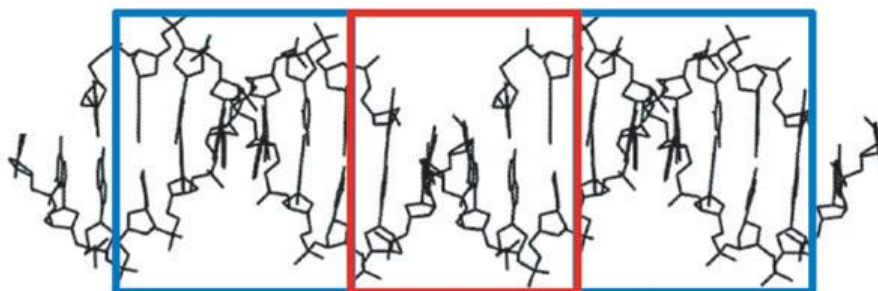
απεικονίζεται στο **σχήμα 3.6**, στο οποίο δύο διπλής έλικας μόρια φαίνονται να ενώνονται με δεσμό υδρογόνου (hydrogen bonding). Μεταξύ των διαφόρων γνωστών ειδών συνοχής μεταξύ βιολογικών μορίων, η συνοχή των κολλωδών



Σχήμα 3.6: Συνένωση κολλωδών άκρων (*sticky-ended cohesion*). Συνένωση δύο μοριακών προεξοχών. Απεικονίζονται δύο διπλά μόρια, ένα κόκκινο και ένα μπλε, καθένα από τα οποία έχει μία μονόκλωνη μοριακή προεξοχή που είναι συμπληρωματική στην προεξοχή του άλλου μορίου. Όταν αναμιγνύονται, τα δύο μόρια μπορούν να συνενωθούν σε διάλυμα, όπως φαίνεται στο σχήμα [15]. Το κάτω μέρος του σχήματος δείχνει ότι τα δύο αυτά μόρια μπορούν, τελικά, να συνδεθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς με τη βοήθεια κατάλληλων ενζύμων και συμπαραγόντων [33].

άκρων είναι πολύ ξεχωριστή: όχι μόνο γνωρίζουμε ότι δύο κολλώδη άκρα θα ενωθούν μεταξύ τους κατά έναν ειδικό και προγραμματιζόμενο τρόπο

(συγγένεια), αλλά γνωρίζουμε, επίσης, και τη δομή που αυτά σχηματίζουν όταν ενώνονται, μία διπλή έλικα κατά Watson-Crick [185]. Αυτό το χαρακτηριστικό-κλειδί απεικονίζεται στο [σχήμα 3.7](#). Συνεπώς, σε αντίθεση με άλλες βιολογικά

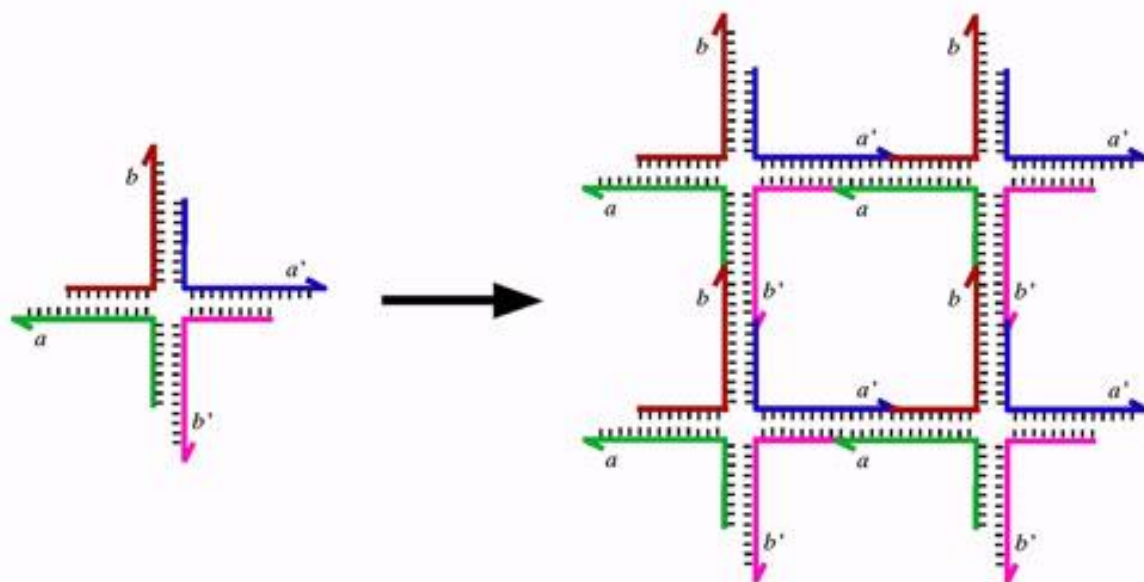


Σχήμα 3.7: Δομικά χαρακτηριστικά της συνένωσης κολλωδών άκρων (*sticky-ended cohesion*) [15]. Απεικονίζεται μία κρυσταλλική δομή [185] που περιέχει δεκαμερή DNA των οποίων η συνένωση κατά την κατεύθυνση του άξονα της έλικας κατευθύνεται από κολλώδη άκρα δινουκλεοτιδίων. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι εμφανής στο κόκκινο κουτί, όπου η συνέχεια των αλυσίδων διακόπτεται από κενά. Τα δύο μπλε κουτιά περιέχουν διπλό DNA Β-μορφής. Το τελευταίο είναι ανεστραμμένο σε σχέση με το DNA στο κόκκινο κουτί, αλλά κατά τα άλλα η δομή τους είναι η ίδια. Συνεπώς, κολλώδη άκρα συνενώνονται για να σχηματίσουν Β-DNA, και μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει την πληροφορία αυτή για να προβλέψει τις δομές κατασκευασμάτων από DNA που συγκρατούνται μεταξύ τους από κολλώδη άκρα [15].

βασισμένες αλληλεπιδράσεις συγγένειας (όπως, για παράδειγμα, ενός αντιγόνου και ενός αντισώματος), όταν συνενώνονται κολλώδη άκρα είναι δυνατόν να προβλεφθεί η δομή του προϊόντος, χωρίς την ανάγκη να προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή πρώτα για να καθοριστεί ο σχετικός προσανατολισμός των δύο συστατικών [15].

Το 1982, ο Seeman παρουσίασε την ιδέα να συνδυαστούν η συνένωση των κολλωδών άκρων και το διακλαδούμενο DNA για να κατασκευαστούν αντικείμενα και πλέγματα (*lattices*) [16]. Η ιδέα αυτή αποτυπώνεται στο [σχήμα](#)

3.8 [6], το οποίο δείχνει τη συνένωση τεσσάρων αντιγράφων ενός μορίου DNA με τέσσερις διακλαδώσεις, των οποίων τα κολλώδη άκρα συνδέονται για να



Σχήμα 3.8: Αυτοσυναρμολόγηση (*self-assembly*) διακλαδούμενων μορίων DNA για να σχηματιστούν μεγαλύτερες διατάξεις [6]. Η εικόνα στα αριστερά δείχνει έναν σύνδεσμο με τέσσερις διακλαδώσεις, που φτιάχτηκε από τέσσερις διαφορετικά χρωματισμένους κλώνους. Στο σύνδεσμο αυτό, οι περιοχές διπλής έλικας έχουν στο 5' άκρο τους κολλώδη άκρα, τα a , b , a' και b' (ξεκινώντας από αριστερά και συνεχίζοντας κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού), τα οποία υποδεικνύονται με μικρές προεκτάσεις από τον κύριο κλώνο (τα 3' άκρα συμβολίζονται, κατά σύμβαση, με μισά βέλη). Τα κολλώδη άκρα που αντιστοιχούν σε γράμμα με τόνο είναι συμπληρωματικά των κολλωδών άκρων που αντιστοιχούν σε γράμμα χωρίς τόνο. Η εικόνα στα δεξιά δείχνει πώς τέσσερις τέτοιοι σύνδεσμοι μπορούν να αυτοσυναρμολογηθούν μέσω αυτής της συμπληρωματικότητας για να αποδώσουν ένα τετραμερές. Τα κολλώδη άκρα έχουν συνδεθεί με έναν συμπληρωματικό τρόπο [15].

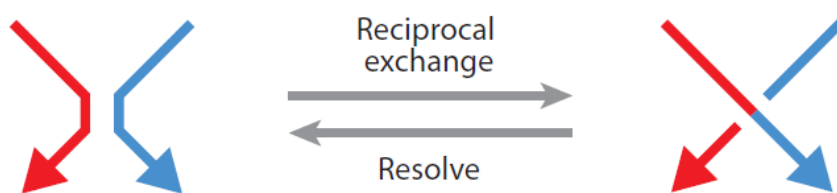
σχηματίσουν ένα τετραμερές. Στο παράδειγμα αυτό, στο σχηματισμό του τετραμερούς συμμετέχουν μόνο τα εσωτερικά κολλώδη άκρα. Συνεπώς, η δομή μπορεί να επεκταθεί για να σχηματιστεί ένα πλέγμα απείρου εκτάσεως [15].

3.2 Τα αρχικά βήματα για την κατασκευή DNA νανοδομών

Για την εκτέλεση εργασιών στη δομική νανοτεχνολογία του DNA, είναι απαραίτητα δύο θεμελιώδη βήματα: ο σχεδιασμός μοτίβων και ο σχεδιασμός αλληλουχιών [15]. Για τη δημιουργία ειδών περισσότερο πολύπλοκων από το γραμμικό διπλό μόριο του DNA, είναι χρήσιμο να υπάρχει ένα πρωτόκολλο που να οδηγεί σε νέα μοτίβα DNA με τον κατάλληλο τρόπο. Φυσικά, όποιο μοτίβο κι αν σχεδιάζεται, πρέπει να αυτοσυναρμολογηθεί από μεμονωμένους κλώνους. Τέλος, είναι απαραίτητο να τοποθετηθούν αλληλουχίες στους κλώνους, αλληλουχίες που θα συναρμολογηθούν έτσι ώστε να σχηματιστεί το σχεδιασμένο μοτίβο, παρά κάποια άλλη δομή.

3.2.1 Σχεδιασμός μοτίβων

Ο σχεδιασμός των μοτίβων βασίζεται στην πραγματοποίηση της *αμοιβαίας ανταλλαγής* (reciprocal exchange), της ανταλλαγής, δηλαδή, των συνδέσεων μεταξύ κλώνων DNA σε δύο διαφορετικές διπλές έλικες για να δημιουργηθεί μία νέα διασύνδεση [15]. Η διαδικασία αυτή απεικονίζεται στο *σχήμα 3.9*, όπου ένας κόκκινος κλώνος και ένας μπλε κλώνος υπόκεινται σε αμοιβαία ανταλλαγή



Σχήμα 3.9: Η διεργασία της αμοιβαίας ανταλλαγής (reciprocal exchange):

Ένας κόκκινος κλώνος και ένας μπλε κλώνος γίνονται ένας κόκκινος-μπλε και ένας μπλε-κόκκινος κλώνος [15].

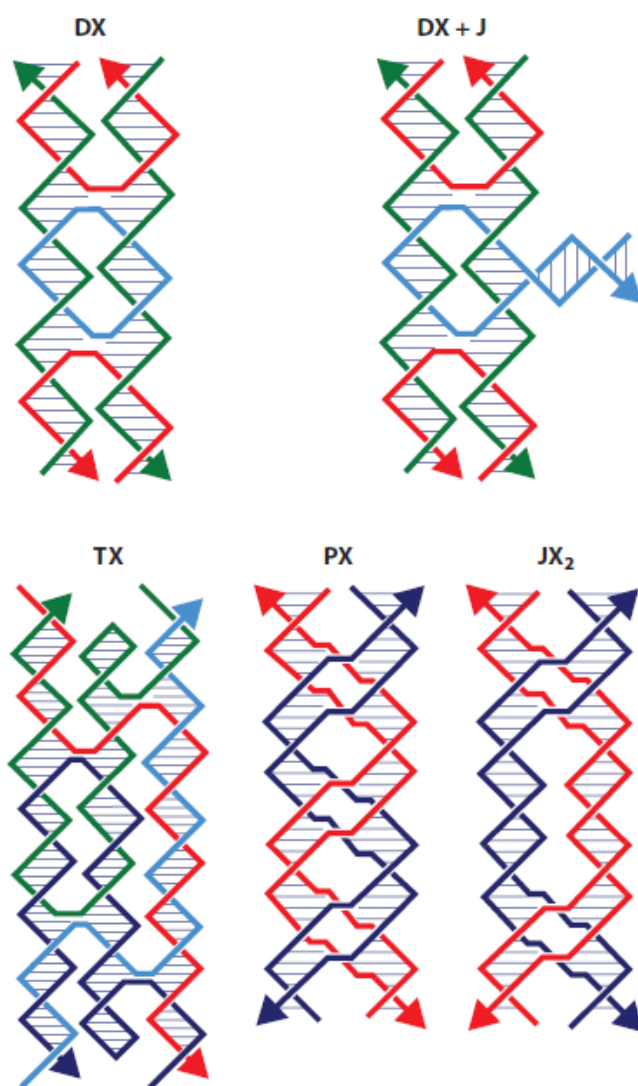
για να παραγάγουν κόκκινους-μπλε και μπλε-κόκκινους κλώνους. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι αυτή δεν είναι μία διεργασία που διεκπεραιώνεται στο εργαστήριο· γίνεται σε χαρτί ή στον υπολογιστή, και μετά συντίθενται οι κλώνοι που αντιστοιχούν στα «προϊόντα» της διεργασίας. Λόγω

της πολικής φύσης των ραχοκοκαλιών του DNA, η διεργασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ κλώνων της ίδιας πολικότητας ή μεταξύ κλώνων αντίθετης πολικότητας. Εάν λάβει χώρα μόνο μία αμοιβαία ανταλλαγή, δε θα υπάρχει διαφορά, επειδή το ένα προϊόν θα είναι απλώς διαμορφομερές (διαμορφώσεις ονομάζονται οι διαφορετικές διευθετήσεις-διατάξεις των ατόμων που μπορούν να μετατραπούν από τη μια μορφή στην άλλη με περιστροφή γύρω από απλούς δεσμούς) του άλλου προϊόντος και αντίστροφα. Όμως, αν πραγματοποιηθούν δύο ή περισσότερες αμοιβαίες ανταλλαγές, θα προκύψουν διαφορετικές τοπολογίες. Πολλές φορές, οι διαφορετικές τοπολογίες δε σχηματίζονται με την ίδια ευχέρεια. Εμπειρικά, τα μόρια που συμπεριφέρονται καλύτερα είναι εκείνα στα οποία η ανταλλαγή λαμβάνει χώρα μεταξύ κλώνων αντίθετης πολικότητας.

Μερικά σημαντικά μοτίβα που δημιουργήθηκαν με τον τρόπο αυτό απεικονίζονται στο [σχήμα 3.10](#). Το μοτίβο DX [75-79] με ανταλλαγές μεταξύ κλώνων αντίθετης πολικότητας φαίνεται στο πάνω αριστερό μέρος του σχήματος. Το μοτίβο αυτό είναι καλά χαρακτηρισμένο και είναι γνωστό ότι το χαρακτηριστικό μήκος ευκαμψίας του (persistence length) είναι περίπου διπλάσιο από αυτό ενός τυπικού γραμμικού διπλού DNA [15]. Το μοτίβο DX+J φαίνεται στο πάνω δεξί μέρος του σχήματος 3.10. Σε αυτό το μοτίβο, η επιπρόσθετη περιοχή είναι, συνήθως, προσανατολισμένη έτσι ώστε να είναι σχεδόν κάθετη στο επίπεδο των δύο αξόνων των ελίκων. Ο προσανατολισμός αυτός καθιστά την περιοχή δυνατή να δρα ως τοπογραφικός δείκτης στο μικροσκοπιο ατομικής δύναμης (atomic force microscope, AFM). Το μοτίβο που φαίνεται στο κάτω αριστερό μέρος του σχήματος 3.10 είναι το μόριο TX [80-82], που έχει τρεις περιοχές. Ενώνοντας τα μοτίβα αυτά με έναν «τρόπο 1-3» (η επάνω ελικοειδής περιοχή ενός μορίου ενώνεται με την κάτω περιοχή ενός άλλου μορίου), μπορούν να παραχθούν δισδιάστατες συστοιχίες (arrays) που περιέχουν χρήσιμες κοιλότητες. Σε αντίθεση με τα μοτίβα DX και TX, το μοτίβο PX και το τοποϊσομερές* του, το μοτίβο JX₂ (στο κάτω δεξί μέρος του σχήματος

* Τοποϊσομερή λέγονται τα μόρια που έχουν διαφορετικό αριθμό συνδέσεων. Ο αριθμός συνδέσεων (L) ορίζει το πόσες φορές η μία αλυσίδα DNA στρέφεται γύρω από την άλλη (προς την δεξιόστροφη κατεύθυνση) [186].

3.10), προκύπτουν από αμοιβαία ανταλλαγή μεταξύ κλώνων της ίδιας πολικότητας. Στην περίπτωση του μορίου PX, αυτό συμβαίνει οπουδήποτε δύο διπλές έλικες μπορούν να αντιπαρατεθούν. Από το μόριο JX₂ λείπουν δύο ανταλλαγές.

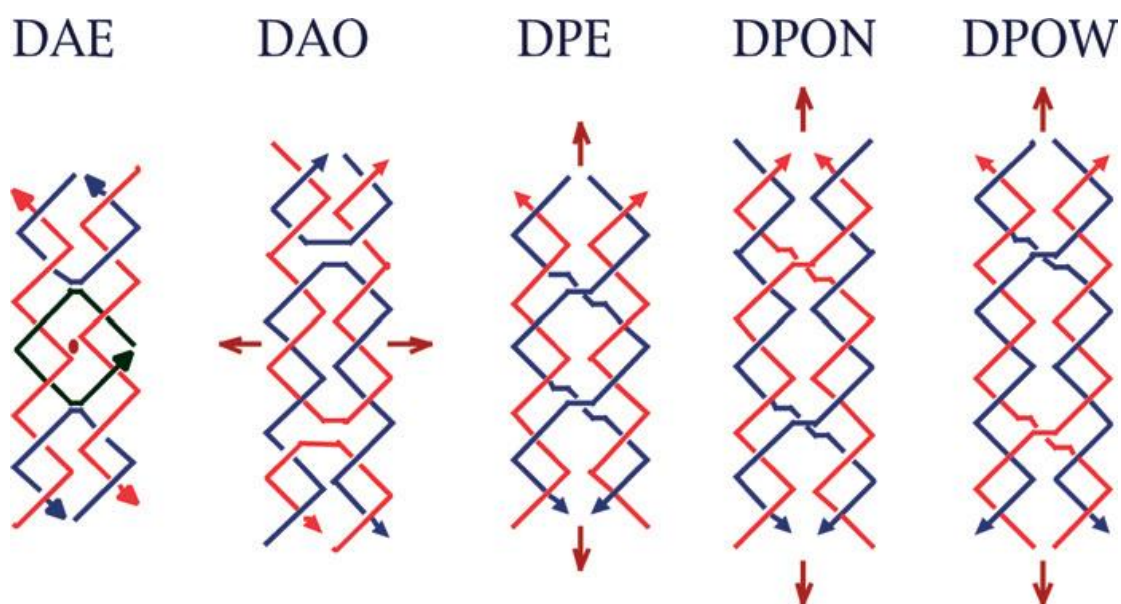


Σχήμα 3.10: Δημιουργία μοτίβων μέσω αμοιβαίας ανταλλαγής μορίων DNA [15].

Στο πάνω μέρος του σχήματος φαίνονται το μοτίβο DX και το μοτίβο DX+J. Το μοτίβο DX προκύπτει από δύο αμοιβαίες ανταλλαγές μεταξύ μοτίβων διπλής έλικας. Το μοτίβο DX+J περιέχει άλλη μία περιοχή DNA. Συνήθως, η περιοχή αυτή είναι προσανατολισμένη κάθετα στο επίπεδο των δύο αξόνων των ελίκων στο τμήμα DX του μοτίβου. Όταν υφίσταται αυτός ο προσανατολισμός, η επιπρόσθετη περιοχή μπορεί να συμπεριφερθεί ως τοπογραφικός δείκτης για

δισδιάστατες συστοιχίες που περιέχουν το μοτίβο DX+J. Το κάτω μέρος του σχήματος δείχνει το μοτίβο TX στα αριστερά, στο οποίο έχει προστεθεί μία τρίτη περιοχή. Και σε αυτήν την περίπτωση, οι ανταλλαγές λαμβάνουν χώρα μεταξύ κλώνων αντίθετης πολικότητας. Στο κέντρο και στα δεξιά απεικονίζονται το μοτίβο PX και το τοποϊσομερές του, το μοτίβο JX₂, αντίστοιχα. Το μόριο PX σχηματίζεται με ανταλλαγές μεταξύ κλώνων ταυτόσημης πολικότητας σε κάθε δυνατή θέση. Από το μόριο JX₂ λείπουν δύο από αυτές τις ανταλλαγές.

Όσον αφορά στο μόριο DX, πρέπει να επισημανθεί ότι υπάρχουν πέντε διαφορετικά ισομερή του, ανάλογα με τις πολικότητες των ανταλλασσόμενων κλώνων και με τις μεταξύ τους αποστάσεις [14]. Στο **σχήμα 3.11** απεικονίζονται όλα τα μόρια DX.



Σχήμα 3.11: Τα διαμορφομερή του DX [14]. Τα (σκούρα) κόκκινα βέλη υποδεικνύουν δυαδικούς άξονες και τα βέλη στους κλώνους υποδεικνύουν 3' άκρα. Ο δεύτερος χαρακτήρας του ονόματος κάθε ισομερούς δείχνει αν αυτό είναι αντιπαράλληλο (A-antiparallel) (DAE και DAO), με τους δυαδικούς άξονες να είναι κάθετοι στο επίπεδο των αξόνων των ελίκων, ή παράλληλο (P-parallel) (DPE, DPON, DPOW), με το δυαδικό άξονα να είναι ομοεπίπεδος με τους άξονες των ελίκων. Ο τρίτος χαρακτήρας δείχνει εάν υπάρχει ζυγός (even) αριθμός «ημιστροφών» (half-turns) μεταξύ των διασταυρώσεων (DAE ή DPE), ή μονός

(odd) αριθμός (DAO, DPON, DPOW). Τα μονά παράλληλα μόρια διαφοροποιούνται περαιτέρω με ένα τέταρτο χαρακτήρα, N ή W, που υποδεικνύει εάν η επιπρόσθετη ημιστροφή αποτελεί διαχωρισμό μικρής (N-narrow) αύλακας ή διαχωρισμό μεγάλης (W-wide) αύλακας.

3.2.2 Χαρακτηρισμός των μοτίβων

Ακόμη και αν φαίνεται ότι κάποιο μοτίβο θα μπορέσει να αυτοσυναρμολογηθεί επιτυχώς, αυτό δε σημαίνει ότι όντως θα αυτοσυναρμολογηθεί. Είναι απαραίτητο, λοιπόν, να υπάρχουν κάποιες τεχνικές που να μπορούν να το χαρακτηρίσουν. Η πρώτη ερώτηση που πρέπει κάποιος να κάνει είναι εάν καθένας από τους κλώνους συμμετέχει στο σχεδιασμένο σύμπλεγμα με την αναμενόμενη στοιχειομετρία [14]. Αυτό μπορεί να καθοριστεί άμεσα μέσω της *μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου* (non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) [187]. Το υλικό τοποθετείται στο ένα άκρο μιας πλάκας πολυακρυλαμιδίου με ρυθμισμένο pH και οδηγείται στο άλλο άκρο από ένα ηλεκτρικό πεδίο που δρα στην αρνητικά φορτισμένη ραχοκοκαλιά. Η κινητικότητα σε μία τέτοια πηκτή είναι συνάρτηση του μοριακού βάρους και των επιφανειακών ιδιοτήτων. Στην ίδια πηκτή μπορούν να τοποθετηθούν το σύμπλεγμα-στόχος, οι μεμονωμένοι κλώνοι και διάφορα ημιτελή συμπλέγματα, υπό την παρουσία διαφόρων δεικτών [14]. Μία και μόνο ζώνη κοντά (αλλά σπάνια ακριβώς) στο μοριακό βάρος που έχει προβλεφθεί αποτελεί μια καλή ένδειξη επιτυχούς σχηματισμού. Κάποιες φορές, φαίνονται ζώνες με μικρότερη κινητικότητα που αντιστοιχούν σε διμερή, τριμερή ή μεγαλύτερα συμπλέγματα, οι οποίες υποδεικνύουν ότι η δομή του μοτίβου έχει εσωτερικές τάσεις, που είναι πιθανό να προκλήθηκαν από ηλεκτροστατική άπωση [188]. Ομοίως, προϊόντα που μετακινούνται με τις κινητικότητες διαφόρων ενδιάμεσων προϊόντων (partial products) υποδεικνύουν ότι για κάποιο λόγο το σύμπλεγμα απομακρύνεται από τη σύνθεση-στόχο. Μερικές φορές, ο λόγος που μια πηκτή δεν ανταπεξέρχεται στις προσδοκίες είναι η ημιτελής στοιχειομετρία. Η απομάκρυνση της ζώνης-στόχο και η επανα-υβριδοποίησή της θα αποδώσει ένα προϊόν με σωστή στοιχειομετρία και θα δείξει αν η ζώνη έχει επανα-ισορροπήσει σε ένα πολλαπλό προϊόν.

Το ποιοτικό σχήμα ενός μοτίβου DNA μπορεί να συγκριθεί με πρότυπα εύκολα και αποτελεσματικά μέσω του *γραφήματος Ferguson* [14]. Αυτό είναι ένα γράφημα του λογαρίθμου της κινητικότητας [$\log(\text{κινητικότητα})$] συναρτήσει της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου και η κλίση του είναι ανάλογη με τη σταθερά τριβής του μορίου. Η ανάλυση κατά Ferguson χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό του «περιπλεγμένου» χαρακτήρα των συνδέσμων με τέσσερις διακλαδώσεις, σε σύγκριση με τους συνδέσμους με τρεις, τέσσερις και έξι διακλαδώσεις και για να επιδείξει ότι η προσθήκη ελίκων σε διπλά γραμμικά μόρια και σε μόρια DX συντελεί σε παρόμοιες μεταβολές της σταθεράς τριβής [189].

Η μεγαλύτερης ανάλυσης τεχνική που χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τις δομές ασυνήθιστων μοτίβων DNA είναι η αυτόματη αποτύπωση ριζών υδροξυλίου (*hydroxyl radical autofootprinting*) [14]. Η τεχνική αυτή είναι μια παραλλαγή της αποτύπωσης ριζών υδροξυλίου (*hydroxyl radical footprinting*), που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των θέσεων πρόσδεσης των πρωτεϊνών στο DNA. Με τη μέθοδο αυτή έχουν αναλυθεί όχι μόνο διακλαδούμενοι σύνδεσμοι, αλλά και τα μόρια DX, TX και PX. Η ανάλυση πραγματοποιείται ιχνηθετώντας ραδιενεργά έναν κλώνο του συμπλέγματος και εκθέτοντάς τον σε ρίζες υδροξυλίου. Τα προϊόντα οδηγούνται διαμέσου μιας αποδιατακτικής πηκτής (που είναι ευαίσθητη μόνο στο μέγεθος για μια δεδομένη τοπολογία) και οι εντάσεις των ζωνών που αντιστοιχούν σε κάθε μεμονωμένο νουκλεοτίδιο ποσοτικοποιούνται. Το χαρακτηριστικό-κλειδί που διακρίνεται στις περιοχές διασταύρωσης (*crossover sites*) στις αναλύσεις αυτές είναι η μειωμένη επιδεκτικότητα σε προσβολή όταν συγκρίνεται η διάταξη του κλώνου ως μέρος του συμπλέγματος, σχετικά με τη διάταξη του κλώνου που προέρχεται από διπλό γραμμικό DNA. Μειωμένη επιδεκτικότητα σημαίνει ότι η πρόσβαση της ρίζας υδροξυλίου μπορεί να παρεμποδίζεται λόγω στερεοδομής στις περιοχές που αυτή εντοπίζεται. Ομοίως, η ομοιότητα με τη διάταξη της διπλής έλικας σε σημεία πιθανής κάμψης θεωρείται ότι υποδεικνύει ότι ο κλώνος έχει υιοθετήσει μια τυπική ελικοειδή δομή στο σύμπλεγμα, είτε αυτό επιβάλλεται από τη δευτεροταγή δομή είτε όχι. Η εν λόγω τεχνική είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στο να καθορίζει εάν πραγματοποιούνται διασταυρώσεις στα σημεία που αυτές αναμένεται να πραγματοποιηθούν.

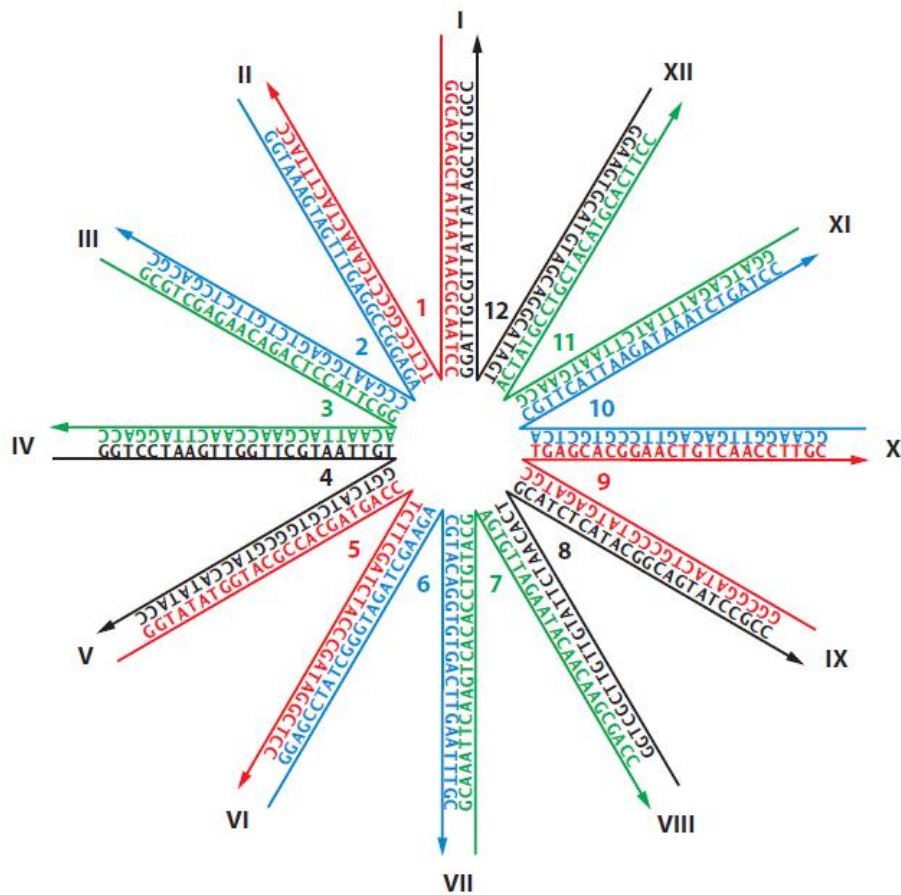
3.2.3 Σχεδιασμός αλληλουχιών και ελαχιστοποίηση της συμμετρίας

Ο σχεδιασμός αλληλουχιών DNA (sequence design) που δεν ακολουθούν το αυστηρό πρότυπο του γραμμικού διπλού DNA είναι πιθανόν να οδηγήσει σε μόρια που αντιστοιχούν σε κάποιου είδους διεγερμένες καταστάσεις. Φυσικά, ο τεράστιος όγκος της γνώσης μας για τη δομή και θερμοδυναμική του DNA βασίζεται σε ένα γραμμικό διπλό μόριο στη «θεμελιώδη κατάσταση», παρά σε διάφορες διεγερμένες καταστάσεις [15]. Είναι εμφανές ότι ο στόχος του σχεδιασμού των αλληλουχιών κανονικά θα ήταν να κάνουμε τα μόρια να σχηματίσουν τις διεγερμένες καταστάσεις που επιθυμούμε να φτιάξουμε. Το κόστος σε ελεύθερη ενέργεια της εισαγωγής τεσσάρων διακλαδώσεων σε ένα μόριο DNA δεν είναι πολύ υψηλό [$+ 1,1 (\pm 0,4) \text{ kcal mol}^{-1}$ στους 18°C παρουσία 10 mM Mg^{2+}]. Παρόλα αυτά, προτού αυτό καθοριστεί, για το σχεδιασμό διακλαδούμενων μορίων χρησιμοποιούταν μια αποτελεσματική μέθοδος που βασίζεται στην *ελαχιστοποίηση της συμμετρίας των αλληλουχιών* (sequence symmetry minimization) [16]. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε πολλά εργαστήρια για την ανάθεση μικρών αλληλουχιών μοτίβων DNA.

Η βασική προσέγγιση για την ελαχιστοποίηση της συμμετρίας των αλληλουχιών αποτυπώνεται στο **σχήμα 3.3** στη σελίδα 34 της παρούσας εργασίας, στο οποίο φαίνεται ένας σύνδεσμος με τέσσερις διακλαδώσεις κατασκευασμένος από τέσσερις κλώνους, ο καθένας από τους οποίους έχει 16 nt (νουκλεοτίδια) [15]. Ο κάθε κλώνος έχει διασπαστεί σε μια σειρά από 13 αλληλεπικαλυπτόμενα τετραμερή, οπότε σε ολόκληρο το μόριο υπάρχουν 52 τετραμερή. Τα δύο πρώτα τετραμερή στον «κλώνο ένα», CGCA και GCAA, βρίσκονται σε κουτιά. Η ελαχιστοποίηση της συμμετρίας των αλληλουχιών επιβάλλει κάθε τετραμερές να είναι μοναδικό. Επιπροσθέτως, για να διασφαλιστεί ότι το μόριο δεν μπορεί να σχηματίσει γραμμικό διπλό DNA σε κανένα σημείο γύρω από το σχεδιασμένο σημείο διακλάδωσης, οι γραμμικές συμπληρωματικές σε καθένα από τα 12 τετραμερή αλληλουχίες που βρίσκονται γύρω από το σημείο διακλάδωσης, επίσης, απαγορεύονται. Για παράδειγμα, η συμπληρωματική αλληλουχία σε αυτήν (την αλληλουχία) που βρίσκεται σε κουτί, δηλαδή στην CTGA (που είναι η TCAG), δεν υπάρχει πουθενά στο μόριο αυτό. Χρησιμοποιώντας τα κριτήρια αυτά, το μοναδικό πιθανό εμπόδιο στο σχηματισμό της επιθυμητής δομής (των

τεσσάρων διπλών οκταμερών) είναι τα τριμερή. Οπότε, τα τμήματα ATG που βρίσκονται σε κουτί θα μπορούσαν, θεωρητικά, να βρίσκονται σε λάθος σημείο, αλλά η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ οκταμερών και τριμερών υπερνικά και έτσι, ο στόχος επιτυγχάνεται χωρίς ανιχνεύσιμες ατέλειες. Στην περίπτωση των μορίων με τέσσερις διακλαδώσεις, η μετακίνηση διακλάδωσης (branch migration) μπορεί να αποτελέσει, επίσης, πρόβλημα. Επομένως, τα νουκλεοτίδια γύρω από τον κόμβο απαγορεύεται να έχουν δυαδική συμμετρία μεταξύ τους. Άλλες ενέργειες για την αποφυγή πραγματοποίησης λαθεμένων συζεύξεων περιλαμβάνουν [15]: (α) την αποτροπή μακρών τμημάτων με βάσεις γουανίνης που θα μπορούσαν να σχηματίσουν άλλες δομές (ειδικά κοντά σε σημεία διασταύρωσης) και (β) την αποφυγή σχηματισμού ομοπολυμερών, πολυπουρίνης ή πολυπυριμιδίνης, εναλλασσόμενης πουρίνης-πυριμιδίνης και οτιδήποτε άλλου που θα μπορούσε να είναι συμμετρικό στην ευρύτερη έννοια του όρου. Τέτοια προληπτικά μέτρα είναι, προφανώς, λιγότερο σημαντικά στη μέση ενός εκτεταμένου γραμμικού τμήματος αλληλουχίας βάσεων από ό,τι κοντά σε σημεία διακλάδωσης.

Τα πιο πρόσφατα χρόνια, τέθηκαν κάποια ζητήματα σχετικά με την ελαχιστοποίηση της συμμετρίας, είτε άμεσα είτε έμμεσα [15]. Για παράδειγμα, σε έναν σύνδεσμο με δώδεκα διακλαδώσεις (που φαίνεται στο **σχήμα 3.12**) δεν είναι δυνατόν να τοποθετηθούν γύρω από το σημείο διακλάδωσης διαφορετικά ζεύγη βάσεων, όπως ήταν εφικτό στο σύνδεσμο με τέσσερις διακλαδώσεις. Για το σχεδιασμό του συνδέσμου του σχήματος 3.12, χρησιμοποιήθηκε μία εντροπική μέθοδος, η οποία φάνηκε να είναι επιτυχής. Ο Mao και συνάδελφοί του έχουν χρησιμοποιήσει φυσικούς περιορισμούς (όπως το μήκος του κλώνου) και τη συγκέντρωση, ενώ μεγιστοποιούσαν τη συμμετρία, για να επιτύχουν το σχηματισμό τεράστιων διευθετήσεων μορίων που να έχουν όσο λιγότερους κλώνους γίνεται, ακόμα και μόνο έναν. Και οι δύο αυτές προσεγγίσεις αντιμετωπίζουν τα νουκλεϊκά οξέα ως φυσικές οντότητες των οποίων οι ιδιότητες μπορούν να αξιοποιηθούν. Αποτελούν εξέλιξη των αρχικών θεωρήσεων κατά τις οποίες οι αλληλουχίες των νουκλεϊκών οξέων είναι αυθαίρετες κατασκευές. Αναμφισβήτητα, το πιο δραματικό παράδειγμα αγνόησης της συμμετρίας των αλληλουχιών είναι το αποκαλούμενο «DNA origami» του Rothemund [190], το οποίο αναλύεται εκτενώς παρακάτω.



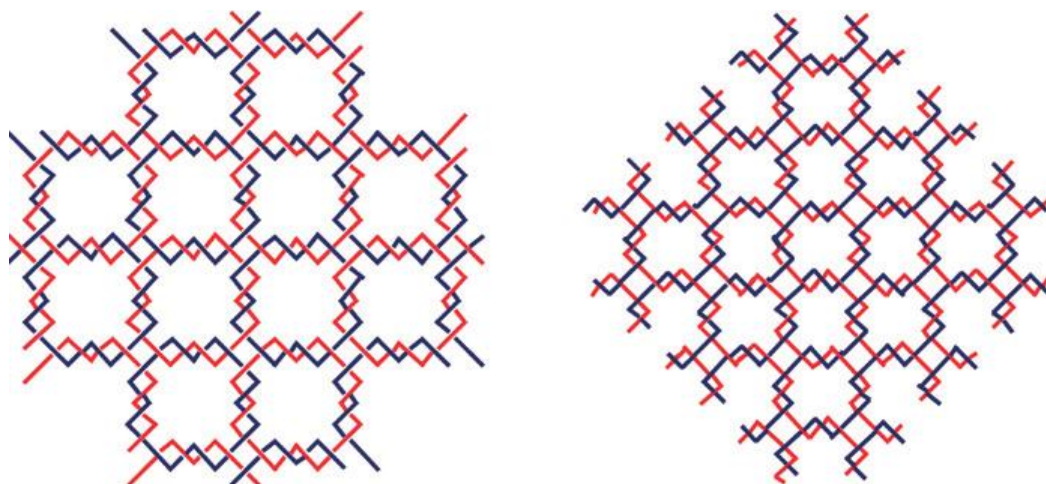
Σχήμα 3.12: Σύνδεσμος με δώδεκα διακλαδώσεις (12-arm junction). Δεν είναι δυνατόν να εξαλειφθεί η συμμετρία γύρω από το κέντρο αυτού του συνδέσμου, οπότε τα ταυτόσημα ζεύγη νουκλεοτιδίων διαχωρίστηκαν κατά διαστήματα τεσσάρων βημάτων γύρω από τον σύνδεσμο.

3.3 Τοπολογικές κατασκευές

3.3.1 Τοπολογικά χαρακτηριστικά των DNA κατασκευών

Είναι πολλές φορές βολικό να αναπαριστούμε τη διπλή έλικα του DNA ως ένα ζεύγος αντιπαράλληλων γραμμών, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.8 στη σελίδα 38 της παρούσας εργασίας. Στην πραγματικότητα, όμως, αυτή είναι μία απλοποίηση που αποκρύπτει σημαντικά χαρακτηριστικά των DNA κατασκευών, καθώς και χρήσιμες ιδιότητες [14, 47]. Οι κλώνοι της διπλής έλικας τυλίγονται ο ένας γύρω από τον άλλον και το γεγονός αυτό έχει σημαντικές συνέπειες στην

κατασκευή DNA νανοδομών. Στο σχήμα 3.13 απεικονίζονται δύο παραλλαγές εκτεταμένων εκδοχών του πλέγματος του σχήματος 3.8. Στην αριστερή εικόνα,



Σχήμα 3.13: Η επίδραση της τοπολογίας σε διακλαδούμενα δίκτυα [14]. Και οι δύο διατάξεις είναι εκτεταμένες εκδοχές της διάταξης που απεικονίζεται στο σχήμα 3.8 (στη σελίδα 38 της παρούσας εργασίας), αλλά τώρα λαμβάνεται υπόψη και η τοπολογία. Η διάταξη στα αριστερά περιέχει ζυγό αριθμό ημιστροφών (half-turns) μεταξύ των κορυφών, οδηγώντας σε μία διάταξη που αποτελείται από μια σειρά από συνδεδεμένα κυκλικά μόρια (οι κόκκινοι κύκλοι είναι συνδεδεμένοι με τους μπλε κύκλους). Η διάταξη στα δεξιά περιέχει μονό αριθμό ημιστροφών μεταξύ των κορυφών, οδηγώντας σε μία συνυφασμένη δομή όπου οι μπλε αλυσίδες πηγαίνουν από κάτω δεξιά προς τα πάνω αριστερά και οι κόκκινες αλυσίδες από κάτω αριστερά προς τα πάνω δεξιά.

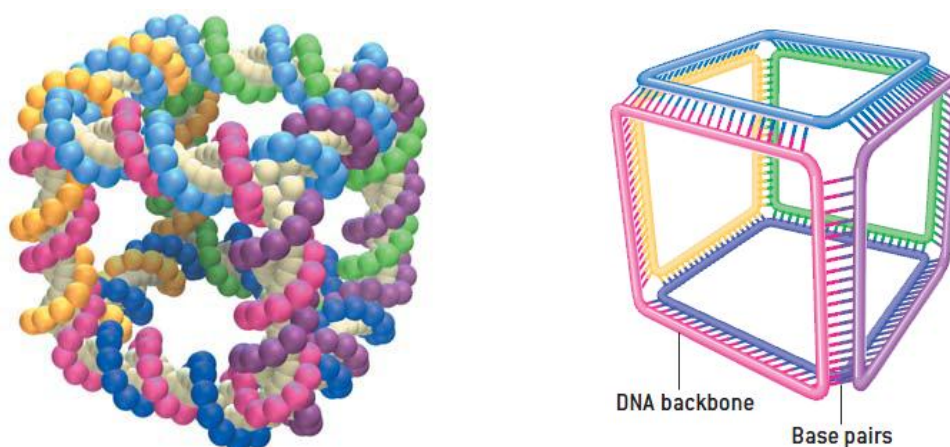
τα σημεία διακλάδωσης έχουν διαχωριστεί από 2 στροφές του DNA. Το προϊόν είναι μια σειρά από συνδεδεμένα κυκλικά μόρια. Στα δεξιά, είναι σχεδιασμένο το ίδιο μοτίβο, αλλά τώρα οι κορυφές είναι διαχωρισμένες από 1,5 στροφή του DNA. Αυτό το προϊόν αποτελείται από γραμμικούς κλώνους DNA που είναι συνυφασμένοι όπως οι κλωστές ενός υφάσματος που παράγεται σε έναν αργαλειό [47].

Η διαφορά μεταξύ των ακέραιων και των ημι-ακέραιων αποστάσεων των σημείων διακλάδωσης παρουσιάζεται επανειλημμένως στο σχεδιασμό των DNA

αντικειμένων. Κατά μία έννοια, η ημιστροφή διπλής έλικας είναι το κβάντο της τοπολογίας του μονόκλωνου DNA [47]. Αντιστοιχεί σε μία διασταύρωση (crossing) ή σε έναν κόμβο (*node*) σε ένα DNA κατενάριο (*catenane*) ή σε έναν πολυκόμβο (*knot*). Κάποιες φορές, το χαρακτηριστικό αυτό καλείται «unit tangle». Θα δούμε παρακάτω ότι η ισοδυναμία μεταξύ μιας ημιστροφής διπλής έλικας και ενός «unit tangle» μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη στην κατασκευή τοπολογικών στόχων (topological targets).

3.3.2 Οι πρώτες DNA κατασκευές

Το πρώτο βήμα σε οποιοδήποτε νέο επιστημονικό ερευνητικό πρόγραμμα είναι να εξακριβωθεί η δυνατότητα υλοποίησης του έργου. Στην περίπτωση της νανοτεχνολογίας του DNA, αυτό επετεύχθη το 1991, όταν ο Junghuei Chen, που είναι τώρα στο Πανεπιστήμιο του Delaware, και ο Nadrian Seeman κατασκεύασαν ένα μόριο DNA με σχήμα σαν αυτό του κύβου [1], που απεικονίζεται στο **σχήμα 3.14**. Οι πλευρές του αποτελούνται από διπλές έλικες DNA και οι κορυφές του αντιστοιχούν στα σημεία διακλάδωσης συνδέσμων με



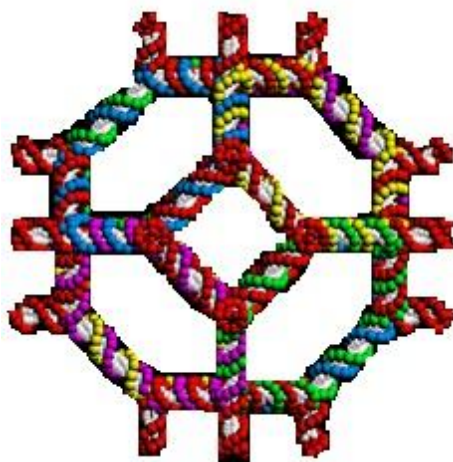
Σχήμα 3.14: Κύβος αποτελούμενος από έξι βρόχους DNA [1]. Η ραχοκοκαλιά (backbone) κάθε κλώνου DNA (στην αριστερή εικόνα) αναπαρίσταται ως χρωματιστές σφαίρες (διαφορετικό χρώμα για κάθε κλώνο) και οι βάσεις ως άσπρες σφαίρες. Κάθε πλευρά του κύβου απαρτίζεται από 20 ζεύγη

νουκλεοτιδίων ή περίπου δύο πλήρεις στροφές της διπλής έλικας. Κάθε γωνία είναι ένας σύνδεσμος με τρεις διακλαδώσεις. Το απλοποιημένο σχήμα (στα δεξιά) αναπαριστά πώς είναι συνδεδεμένοι οι κλώνοι DNA, αλλά παραλείπει τις ελικοειδείς συστροφές.

τρεις διακλαδώσεις [72]. Κάθε κορυφή είναι συνδεδεμένη με άλλες τρεις κορυφές. Οπότε, η συνδετικότητα (connectivity) του κύβου αυτού είναι 3. Οι γενετιστές είχαν φτιάξει πολλές γραμμικές DNA κατασκευές, αλλά αυτό ήταν το πρώτο μόριο DNA με συνδετικότητα μεγαλύτερη από 2 [1]. Στο μόριο αυτό, υπάρχουν δύο στροφές ανά πλευρά, οπότε κάθε πλευρά αποτελείται από έναν κυκλικό μονό κλώνο συνδεδεμένο από δύο φορές με καθέναν από τους τέσσερις γείτονές του, σχηματίζοντας ένα εξακατενάριο (hexacatenane). Κάθε πλευρά του μορίου αυτού περιέχει μία μοναδική θέση περιορισμού (restriction site) [2, 72]. Κατασκευάστηκε σε διάλυμα, με μεθόδους που δεν εξασφάλιζαν τον απόλυτο έλεγχο των προϊόντων της σύνθεσης. Η απόδειξη της σύνθεσης έγινε διασπώντας το τελικό προϊόν σε υπο-κατενάια που θα μπορούσαν να κατασκευαστούν και να χαρακτηριστούν ανεξάρτητα [14, 72].

Πολλά από τα προβλήματα της σύνθεσης του κύβου εξαλείφθηκαν μέσω της ανάπτυξης μιας νέας μεθοδολογίας (solid-support-based methodology) [14], η οποία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Yuwen Zhang και Nadrian Seeman για τη δημιουργία της επόμενης κατασκευής DNA, ενός *κόλουρου οκταέδρου* (truncated octahedron) (σχήμα 3.15) [1]. Αν και σύνδεσμοι με τρεις διακλαδώσεις θα επαρκούσαν για την κατασκευή ανεξάρτητων κόλουρων οκταέδρων, τα τελευταία κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας συνδέσμους με τέσσερις διακλαδώσεις. Οι Zhang και Seeman είχαν την πρόθεση να χρησιμοποιήσουν τις επιπρόσθετες διακλαδώσεις που εξείχαν από κάθε γωνία για να συνδέσουν κόλουρα οκτάεδρα μεταξύ τους προς σχηματισμό μιας μεγαλύτερης δομής, αλλά στο τέλος δε συνέχισαν προς αυτήν την κατεύθυνση. Είχαν παραγάγει μόνο μια ελάχιστη ποσότητα κόλουρων οκταέδρων, αρκετής για να χαρακτηριστεί η δομή τους, αλλά όχι για να επιχειρήσει κανείς να τα ενώσει μεταξύ τους.

Στο μόριο αυτό, όπως και στον κύβο, υπάρχουν δύο στροφές ανά πλευρά [14]. Συνεπώς, το πολύεδρο αυτό είναι ένα 14-κατενάριο (14-catene). Έξι από τις πλευρές του αντιστοιχούν σε τετράγωνα και οχτώ από τις πλευρές του αντιστοιχούν σε εξάγωνα. Οι πλευρές που αντιστοιχούν σε τετράγωνα περιέχουν μία επιπρόσθετη διακλάδωση σε κάθε σύνδεσμο. Στο σημείο αυτό, είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι το κόλouro οκτάεδρο, αλλά και ο κύβος, είναι τοπολογικά είδη, όχι γεωμετρικά [15].

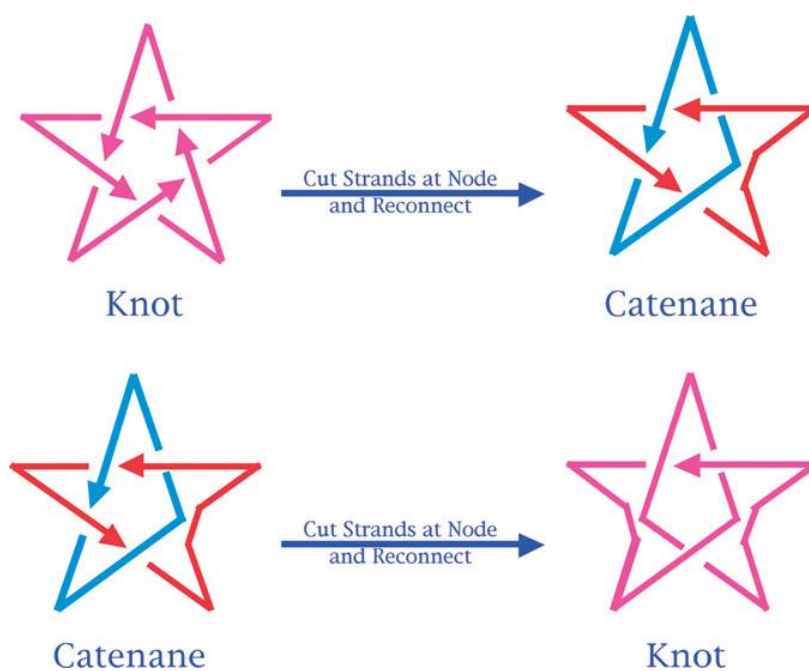


Σχήμα 3.15: Κόλouro οκτάεδρο [14]. Υπάρχουν δύο στροφές DNA μεταξύ των κορυφών του πολύεδρου, καθιστώντας το ένα 14-κατενάριο.

3.3.3 Κατενάκια και πολυκόμβοι (knots)

Αμφότερα τα πολύεδρα που περιγράφηκαν παραπάνω έχουν χαρακτηριστεί επειδή είναι κατενάκια μονών κλώνων DNA [47]. Είναι ευρέως γνωστό ότι υπάρχει μία στενή σχέση μεταξύ κατενακίων και πολυκόμβων (*knots*). Η σχέση αυτή αποτυπώνεται στο **σχήμα 3.16**. Στο πάνω αριστερό μέρος του σχήματος, απεικονίζεται ένας πολυκόμβος με πέντε κόμβους (5-noded knot), με βέλη που υποδεικνύουν μία αυθαίρετη πολικότητα στον κλώνο [14]. Αν φανταστεί κανείς ότι ένας κόμβος αποτελείται από τέσσερις κλώνους, έναν πριν και έναν μετά τον κόμβο στο πάνω μέρος και στο κάτω μέρος, τότε μπορεί να καταστρέψει τον κόμβο αποσυνδέοντας τους «ανέπαφους» κλώνους και επανασυνδέοντάς τους,

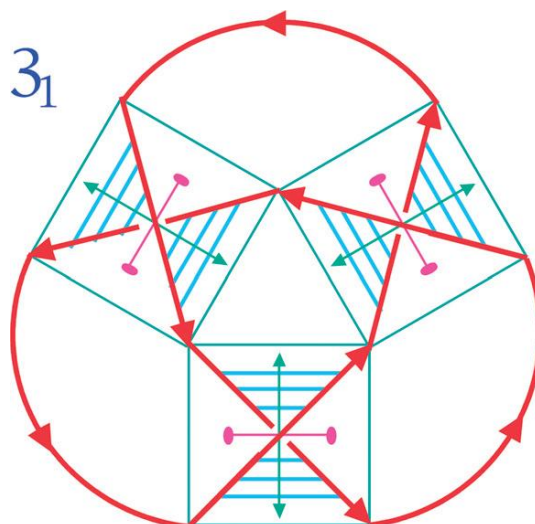
διατηρώντας παράλληλα την τοπική πολικότητα. Η διαδικασία αυτή μετατρέπει τον πολυκόμβο σε κατενάριο. Το κατενάριο μπορεί μετά να μετατραπεί σε πολυκόμβο με τον ίδιο τρόπο. Συνεπώς, ένα σύστημα που μπορεί να φτιάχνει κατενάκια μπορεί, επίσης, να φτιάχνει πολυκόμβους και άλλους τοπολογικούς στόχους.



Σχήμα 3.16: Η σχέση μεταξύ πολυκόμβων και κατενανίων [14]. Πάνω αριστερά φαίνεται ένας πολυκόμβος με πέντε κόμβους (5-noded knot) με αυθαίρετη πολικότητα. Η μετάβαση από τον πολυκόμβο αυτό στο κατενάριο που φαίνεται πάνω δεξιά γίνεται μέσω καταστροφής του κόμβου κόβοντας και τους δύο κλώνους και ξαναενώνοντάς τους, διατηρώντας παράλληλα την τοπική πολικότητα. Το ίδιο κατενάριο απεικονίζεται και κάτω αριστερά. Το τελευταίο, εφαρμόζοντας την ίδια διαδικασία σε διαφορετικό κόμβο, μετατρέπεται σε πολυκόμβο.

Στο **σχήμα 3.17** αποτυπώνεται η σχέση μεταξύ του DNA και ενός κόμβου σε έναν πολυκόμβο. Ο τρίφυλλος πολυκόμβος (trefoil knot) είναι σχεδιασμένος ως παχύς κλώνος [14]. Γύρω από καθέναν από τους τρεις του κόμβους έχει σχεδιαστεί ένα κουτί και οι κλώνοι του πολυκόμβου δρουν ως διαγώνιοι του κουτιού, χωρίζοντάς το σε τέσσερις ζώνες, δύο μεταξύ παράλληλων κλώνων και δύο μεταξύ αντιπαράλληλων κλώνων. Επειδή η ραχοκοκαλιά του DNA είναι

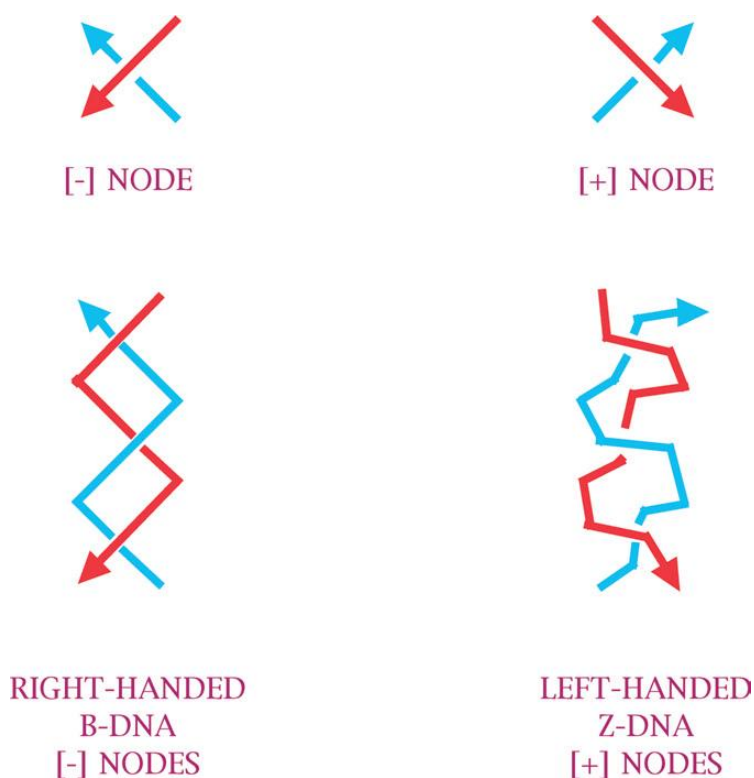
αντιπαράλληλη, μπορεί κανείς να κάνει τη μετάβαση από τοπολογία σε δομή νουκλεϊκού οξέος τοποθετώντας (περίπου) μια ημιστροφή διπλής έλικας (έξι ζεύγη βάσεων) ανάμεσα στις αντιπαράλληλες ραχοκοκαλιές.



Σχήμα 3.17: Η σχέση μεταξύ κόμβων και ημιστροφών DNA [14]. Στο σχήμα φαίνεται ο απλούστερος πολυκόμβος, ο τρίφυλλος πολυκόμβος (trefoil knot, 3_1), με παχιά γραμμή και αυθαίρετη πολικότητα. Γύρω από τους κόμβους του έχουν σχεδιαστεί κουτιά και οι κλώνοι που δημιουργούν τους κόμβους δρουν ως διαγώνιοι των κουτιών, οι οποίες χωρίζουν τα κουτιά σε τέσσερις περιοχές, δύο μεταξύ παράλληλων κλώνων και δύο μεταξύ αντιπαράλληλων κλώνων. Ο σχεδιασμός μιας ημιστροφής DNA (περίπου 6 ζεύγη νουκλεοτιδίων) ανάμεσα στους αντιπαράλληλους κλώνους προκαλεί τη μετάβαση από τοπολογία κλώνων σε δομή νουκλεϊκού οξέος.

Οι κόμβοι που απεικονίζονται στο σχήμα 3.17 έχουν όλοι το ίδιο πρόσημο και αντιστοιχούν στους αρνητικούς κόμβους που παράγονται από το δεξιόστροφο B-DNA [14]. Παρόλα αυτά, οι πολυκόμβοι και άλλες τοπολογικές κατασκευές δεν περιορίζονται σε αρνητικούς κόμβους. Ευτυχώς, υπάρχει μία αριστερόστροφη μορφή του DNA, το Z-DNA [4], το οποίο μπορεί να παρέχει θετικούς κόμβους. Οι διαφορές μεταξύ του B-DNA και του Z-DNA αποτυπώνονται στο [σχήμα 3.18](#). Όπως έχει ήδη αναφερθεί (στη σελίδα 14 της παρούσας εργασίας), το Z-DNA σχηματίζεται από αλληλουχίες πλούσιες σε GC και υπό συγκεκριμένες συνθήκες,

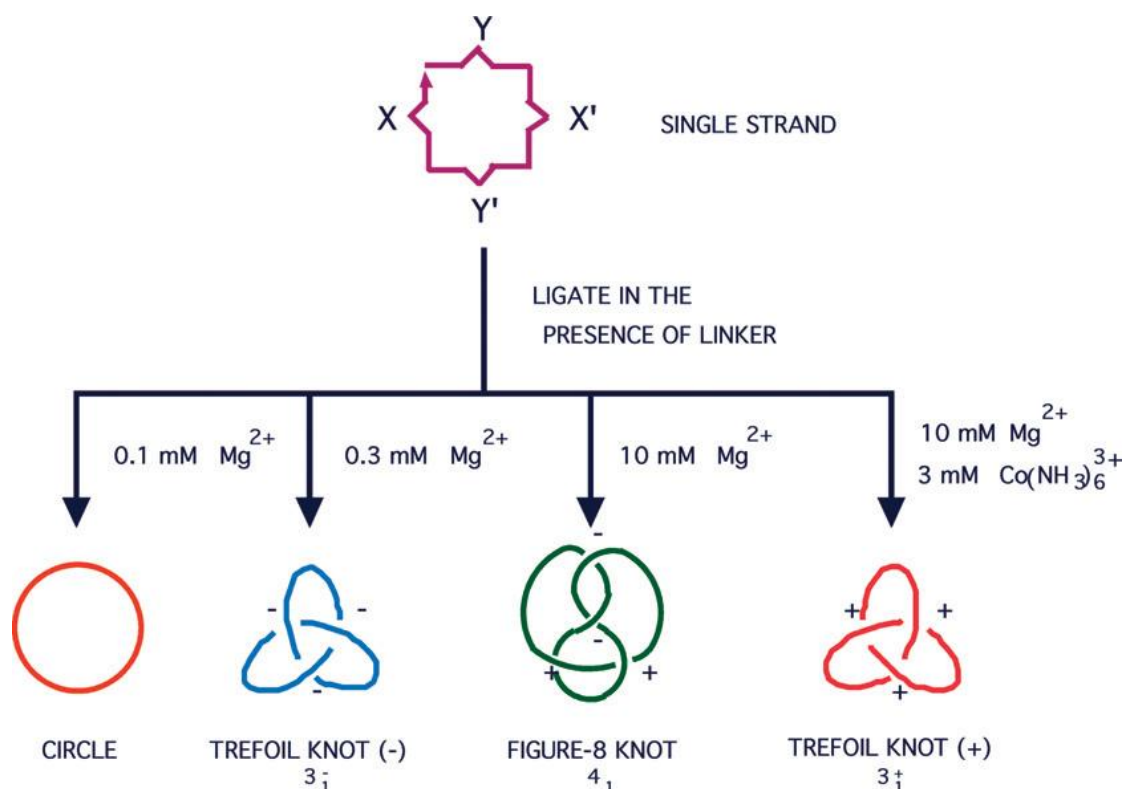
συνήθως υπό υψηλή συγκέντρωση άλατος. Χρησιμοποιώντας κατάλληλες αλληλουχίες και συνθήκες, είναι δυνατόν να παραχθεί μια ποικιλία τοπολογικών στόχων που να περιέχουν θετικούς κόμβους, αρνητικούς κόμβους ή και θετικούς και αρνητικούς κόμβους μαζί.



Σχήμα 3.18: B-DNA και Z-DNA [14]. Εδώ απεικονίζονται δύο είδη DNA. Το B-DNA έχει μία απλή ελικοειδή δομή και είναι δεξιόστροφο, οδηγώντας σε αρνητικούς κόμβους. Το Z-DNA είναι μία έλικα με μία ζιγκ-ζαγκ ραχοκοκαλιά. Είναι αριστερόστροφο, οδηγώντας σε θετικούς κόμβους.

Στο **σχήμα 3.19** απεικονίζεται μια σειρά από τοπολογικούς στόχους. Μεταβάλλοντας τις συνθήκες, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν αλληλουχίες με διαφορετική ροπή προς σχηματισμό Z-DNA για να κατασκευαστούν ένας κύκλος, ένας τρίφυλλος πολυκόμβος με αρνητικούς κόμβους, ένας πολυκόμβος σχήματος 8 (figure-8 knot) και ένας τρίφυλλος πολυκόμβος με θετικούς κόμβους, όλα από τον ίδιο κλώνο DNA [191]. Οι τοποϊσομεράσες είναι μόρια που μετασχηματίζουν τις μοριακές τοπολογίες του DNA [14, 47]. Είναι δυνατόν να

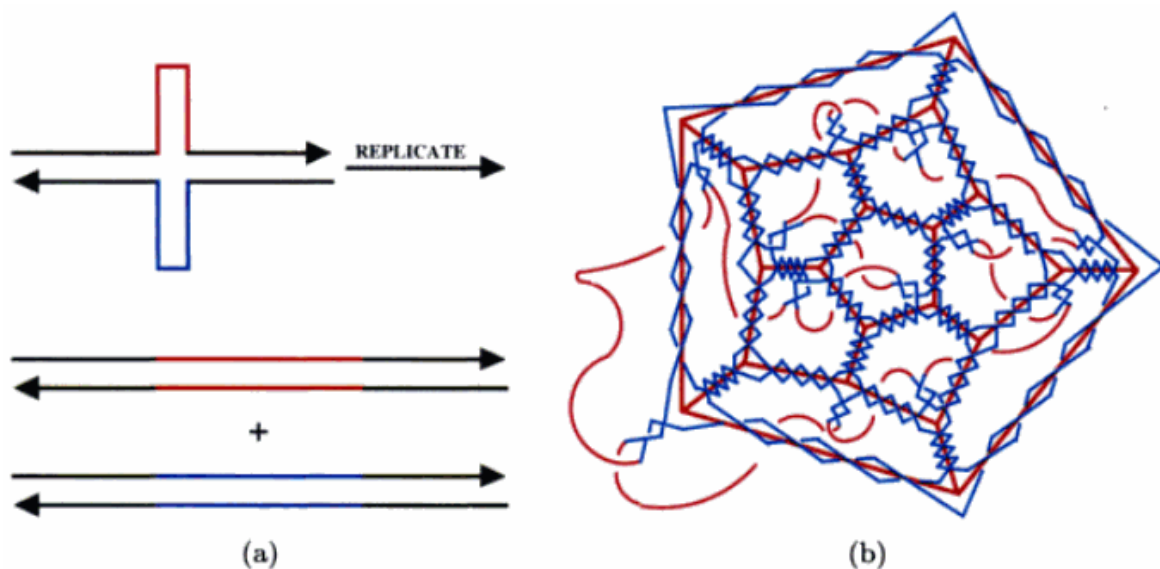
κατασκευαστεί ένας από τους πολυκόμβους του σχήματος 3.19 και μετά να μεταβληθούν οι συνθήκες του διαλύματος, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί αλλαγή της ταυτότητας του πολυκόμβου εάν είναι παρούσα μια τοποϊσομεράση για να καταλύσει τη μετάβαση. Η προσέγγιση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ενεργότητας μιας RNA τοποϊσομεράσης [192].



Σχήμα 3.19: Σύνθεση τεσσάρων τοπολογιών από έναν μονό κλώνο (single strand) DNA [14]. Τα X και X' αναπαριστούν μία στροφή του DNA και του συμπληρωματικού του, όπως και τα Y και Y'. Αμφότερα έχουν ροπή προς σχηματισμό Z-DNA, αλλά η ροπή του Y-Y' είναι μεγαλύτερη. Καθώς η τάση του διαλύματος προς σχηματισμό Z-DNA αυξάνεται, το κύριο προϊόν της σύνδεσης αλλάζει από κύκλο (πολύ χαμηλή ιοντική ισχύς) σε έναν τρίφυλλο πολυκόμβο με αρνητικούς κόμβους (και οι δύο στροφές είναι B-DNA), σε έναν πολυκόμβο σχήματος 8 (η Y στροφή είναι Z-DNA), σε έναν τρίφυλλο πολυκόμβο με θετικούς κόμβους (και οι δύο στροφές είναι Z-DNA).

Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφερθεί ένας από τους λόγους που οι πολυκόμβοι είναι αναπόσπαστο κομμάτι της νανοτεχνολογίας του DNA. Όταν

κάποιος επιθυμεί να φτιάξει αντικείμενα από DNA, του έρχεται αμέσως στο μυαλό η ιδέα της κυτταρικής αντιγραφής ή της αντιγραφής μέσω PCR [2]. Δυστυχώς, όμως, οι DNA πολυμεράσες δεν αναπαράγουν διακλαδώσεις. Το **σχήμα 3.20(a)** δείχνει ότι η αντιγραφή ενός διακλαδούμενου μορίου οδηγεί σε



Σχήμα 3.20: Η βιολογική δημιουργία διακλαδούμενου DNA [47]. **(a)** Το πρόβλημα με την αντιγραφή των διακλαδώσεων. Η αντιγραφή από την DNA πολυμεράση οδηγεί σε δύο διαφορετικά διπλά μόρια, παρά στην αναπαραγωγή του διακλαδούμενου μορίου. **(b)** Μία στρατηγική (που περιλαμβάνει έναν μονό κλώνο) για την παραγωγή διακλαδούμενων δομών μέσω βιολογικής αντιγραφής. Απεικονίζεται ένα διάγραμμα Schlegel ενός πενταγωνικού δωδεκαέδρου, με δύο στροφές DNA ανά πλευρά. Κάθε κυκλική πλευρά περιέχει μία εξωκυκλική έλικα και οι εξωκυκλικές αυτές έλικες έχουν ενωθεί μεταξύ τους προς σχηματισμό ενός μονού μακρύ κλώνου που θα μπορούσε να αντιγραφεί.

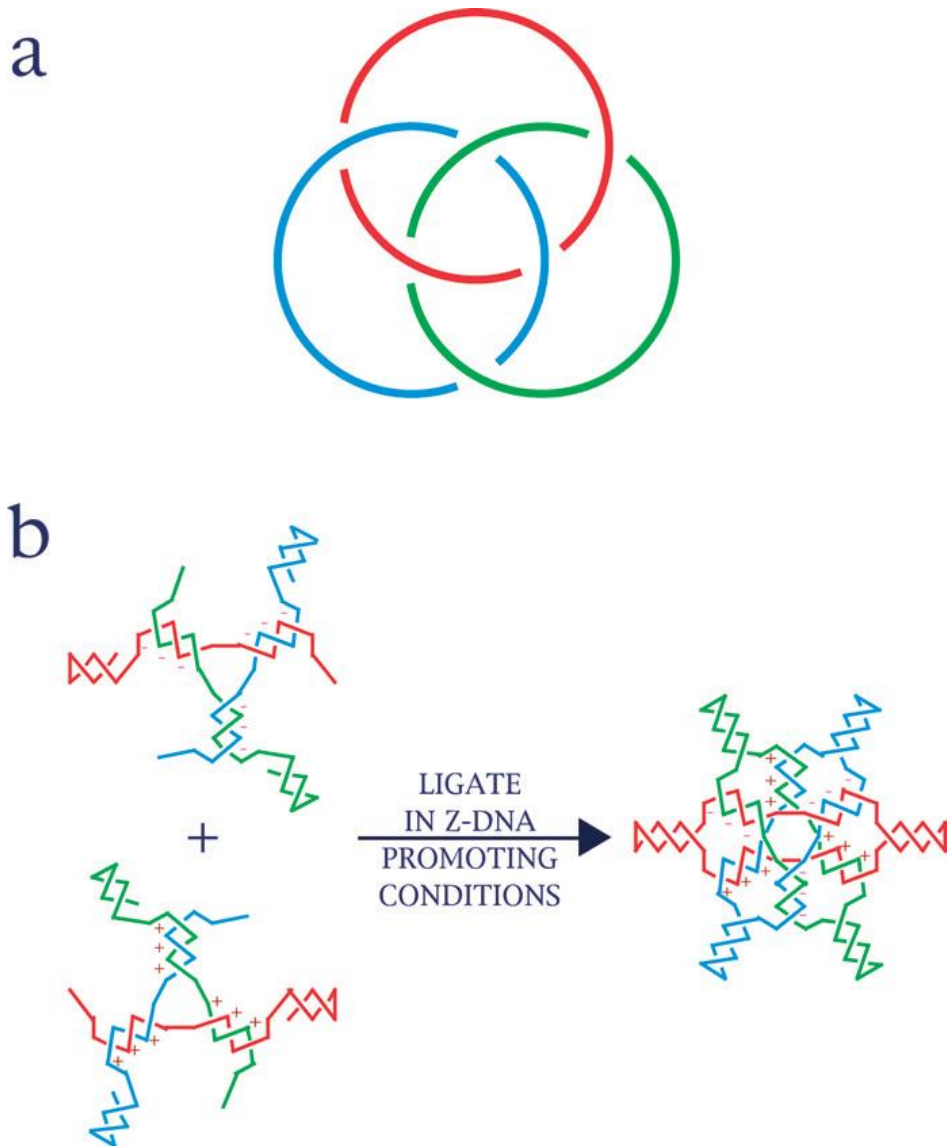
δύο διαφορετικά διπλά μόρια, παρά σε δύο διακλαδούμενα μόρια [47]. Στο **σχήμα 3.20(b)** απεικονίζεται μία πιθανή λύση στο πρόβλημα αυτό, που περιλαμβάνει τη μετατροπή ενός DNA κατενανίου σε έναν DNA πολυκόμβο. Αναπαρίσταται ένα πενταγωνικό δωδεκάεδρο (μέσω του διαγράμματος Schlegel) και κάθε πλευρά έχει διακοσμηθεί με δύο στροφές DNA, που θα οδηγούσαν σε ένα 12-κατενάριο. Όμως, σε κάθε κυκλικό κλώνο έχει προστεθεί

μία εξωκυκλική (exocyclic) έλικα και έπειτα αυτές οι εξωκυκλικές έλικες ενώθηκαν μεταξύ τους (με τις καμπύλες γραμμές). Συνεπώς, το μόριο είναι ένας μονός, μακρύς κλώνος DNA με πολλούς κόμβους (knotted), του οποίου η αλληλουχία θα μπορούσε να αναπαραχθεί από την DNA πολυμεράση.

3.3.4 Δακτύλιοι Borromean από DNA (DNA Borromean rings)

Τα συμβατικά κατενάγια είναι τοπολογικά συνδεδεμένα μεταξύ τους σαν τους συνδέσμους μιας αλυσίδας. Είναι γνωστό ότι μια αλυσίδα είναι τόσο γερή όσο ο πιο αδύναμος κρίκος της, το οποίο σημαίνει ότι εάν ένας σύνδεσμος σπάσει, μένουμε με τα δύο κομμάτια που βρίσκονταν δίπλα στο σπασμένο δακτύλιο. Οι δακτύλιοι Borromean (Borromean rings), που πήραν το όνομά τους από την παρουσία τριών δακτυλίων στο έμβλημα της ιταλικής οικογένειας Borromeo, είναι συνδεδεμένοι διαφορετικά [2]: εάν ένας από τους δακτυλίους σπάσει, διαχωρίζονται όλοι οι δακτύλιοι και το προϊόν είναι ένας σπασμένος κύκλος και κάποιος ανέπαφος, αλλά μη συνδεδεμένοι μεταξύ τους κύκλοι. Η τοπολογία αυτή είναι δυνατή, επειδή τα πρόσημα των τριών εσωτερικών κόμβων είναι αντίθετα από τα πρόσημα των τριών εξωτερικών κόμβων [14].

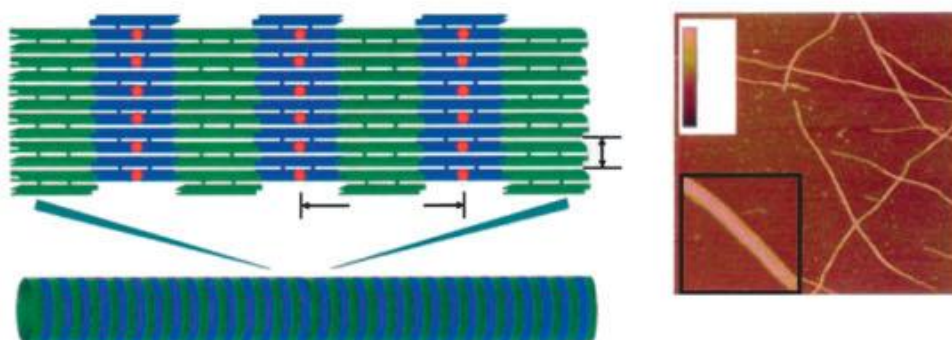
Στο **σχήμα 3.21(a)** φαίνεται ότι οι δακτύλιοι Borromean αποτελούνται από τρεις δακτυλίους, δύο από τους οποίους δεν είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους. Η διαχείριση τμημάτων διπλής έλικας μακρύτερων από μία μόνο ημιστροφή είναι πιο εύκολη. Για το λόγο αυτό, οι συμβατικοί κόμβοι στους δακτυλίους Borromean έχουν αντικατασταθεί από 1,5 στροφές DNA [2]. Όπως φαίνεται στο **σχήμα 3.21(b)**, η τοπολογία του συνδέσμου αυτού μπορεί να επιτευχθεί συνδέοντας έναν σύνδεσμο από B-DNA με τρεις διακλαδώσεις με έναν σύνδεσμο από Z-DNA με τρεις διακλαδώσεις. Η σύνδεση πραγματοποιείται διαμέσου βρόχων σχήματος φουρκέτας στο μεταξύ τους επίπεδο. Οι βρόχοι σχήματος φουρκέτας περιέχουν, επίσης, θέσεις περιορισμού (restriction sites) που διευκολύνουν την πιστοποίηση της σύνθεσης: Όταν ένας δακτύλιος κόβεται, τα προϊόντα είναι ένα γραμμικό μόριο και δύο δακτύλιοι, αλλά όχι κατενάγια. Δεν υπάρχει όριο στον αριθμό των δακτυλίων που μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν την προαναφερθείσα τοπολογία.



Σχήμα 3.21: Δακτύλιοι Borromean (*Borromean rings*) [14]. **(a)** Η τοπολογία των δακτυλίων Borromean. Αποτέλεσμα της διάσπασης ενός δακτυλίου είναι ένας σπασμένος δακτύλιος και άλλοι δύο δακτύλιοι μη συνδεδεμένοι μεταξύ τους. Το κλειδί για την επίτευξη αυτής της τοπολογίας είναι ότι οι εσωτερικοί κόμβοι έχουν αντίθετο πρόσημο από τους εξωτερικούς κόμβους. **(b)** Σχηματισμός δακτυλίων Borromean από DNA. Ένας σύνδεσμος από B-DNA με τρεις διακλαδώσεις (που φαίνεται στο επάνω μέρος του σχήματος) συνδέεται με έναν σύνδεσμο από Z-DNA με τρεις διακλαδώσεις (που φαίνεται στο κάτω μέρος του σχήματος) διαμέσου βρόχων σχήματος φουρκέτας.

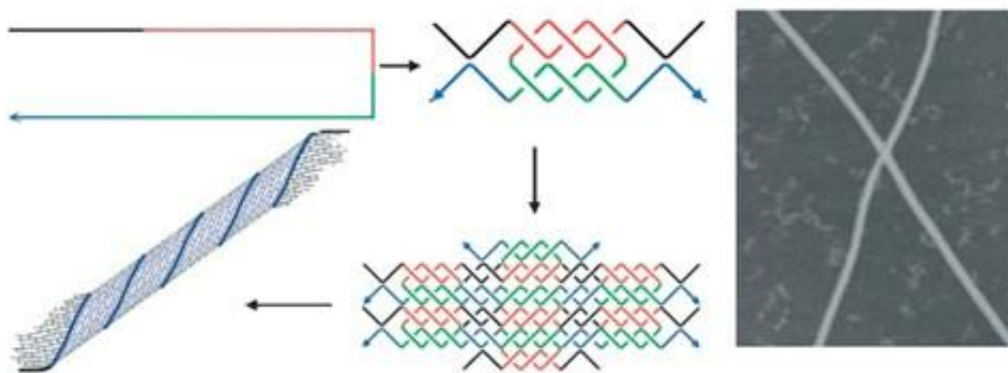
3.4 Μονοδιάστατες (1D) DNA κατασκευές

Μονοδιάστατα (1D) DNA υλικά, συμπεριλαμβανομένων νανοσωλήνων (nanotubes) και νανοσυρμάτων (nanowires), μπορούν να κατασκευαστούν μέσω της προγραμματιζόμενης αυτοσυναρμολόγησης πλακιδίων DNA (DNA tiles), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως εκμαγεία για την ανάπτυξη νανοσυρμάτων [82, 90, 91]. Ο Endo και οι συνεργάτες του [89] παρουσίασαν μια μέθοδο για την κατασκευή δομικά ελεγχόμενων DNA νανοσωλήνων, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα πλακιδίων DNA, με τη βοήθεια ενός συνδέτη DNA (DNA connector) με τέσσερις διακλαδώσεις. Ο συνδέτης ήταν ένα σύζευγμα DNA-πορφυρίνης (η πορφυρίνη είναι ένα μακροκυκλικό μόριο που αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους, ενωμένους ανά δύο μέσω ενός ατόμου άνθρακα), $\text{Porph}-(\text{Tc})_4$, στο οποίο δεκαμερείς (10-mer) κλώνοι DNA ήταν συνδεδεμένοι με τέσσερις ενδιάμεσους δακτυλίους (spacers) ενός παραγώγου της τετραφαινυλοπορφυρίνης (tetraphenylporphyrin). Οι συνδέτες αυτοί έκαναν δυνατή τη συναρμολόγηση επίπεδων πλακιδίων DNA σε δισδιάστατες συστοιχίες (2D arrays), εκμεταλλευόμενοι τη γεωμετρία των 2,5 ελικοειδών στροφών μεταξύ δύο πλακιδίων DNA (**σχήμα 3.22, αριστερά**) [74]. Οι δισδιάστατες συστοιχίες συναρμολογήθηκαν σε σωληνοειδείς δομές υπό την παρουσία της $\text{Porph}-(\text{Tc})_4$, όπως έδειξε ο χαρακτηρισμός με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (**σχήμα 3.22, δεξιά**). Αυτές οι δομές που έμοιαζαν με ίνες μπορούσαν να φτάσουν σε μήκος πάνω από 2 μm .



Σχήμα 3.22: Μία μονοδιάστατη (1D) DNA νανοδομή [74]: Νανοσωλήνες που συναρμολογήθηκαν από πλακίδια DNA (DNA tiles) με τη βοήθεια ενός συνδέτη DNA με τέσσερις διακλαδώσεις.

Παρουσιάστηκε, επίσης, μία απλοποιημένη προσέγγιση για την κατασκευή μονοδιάστατων δομών, στην οποία για την αυτοσυναρμολόγηση DNA νανοσωλήνων, που έμοιαζε με την αυτοσυναρμολόγηση νανοημάτων φυσικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε ένας μονός κλώνος DNA [74]. Στη μέθοδο αυτή, σχηματίστηκε αρχικά μία δομή παρόμοια με αυτή του μοτίβου DX από δύο ταυτόσημους κλώνους με μήκος 52 νουκλεοτιδίων με παλινδρομικά τμήματα. Περιοχές με μονόκλωνες προεξοχές έκαναν δυνατή την περαιτέρω συναρμολόγηση των συμπλεγμάτων σε δισδιάστατα πλέγματα, τα οποία ύστερα αναδιπλώθηκαν σε δισδιάστατα φύλλα και τελικά σε DNA νανοσωλήνες ([σχήμα 3.23](#)).

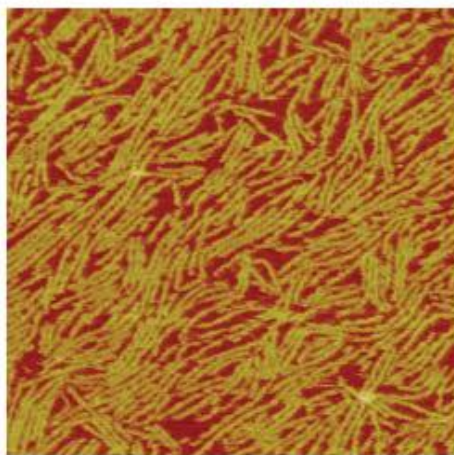


Σχήμα 3.23: Μονοδιάστατοι DNA νανοσωλήνες που συναρμολογήθηκαν από έναν μονό κλώνο που περιείχε τέσσερα παλινδρομικά τμήματα [74].

Ομοίως, ο Kuzuya και οι συνεργάτες του έφτιαξαν DNA νανοσωλήνες συναρμολογούμενους από δομικά στοιχεία ημισωλήνων (half-tube components) [74]. Έτσι, παρήχθησαν δύο διαφορετικά είδη: μία δέσμη έξι ελίκων (six-helix bundle) και μία δέσμη οχτώ ελίκων (eight-helix bundle). Η ανάλυση με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (atomic force microscope, AFM) έδειξε ότι οι μακροί ημισωλήνες αυτοσυναρμολογήθηκαν εύκολα σε ολόκληρους σωλήνες ([σχήμα 3.24](#)).

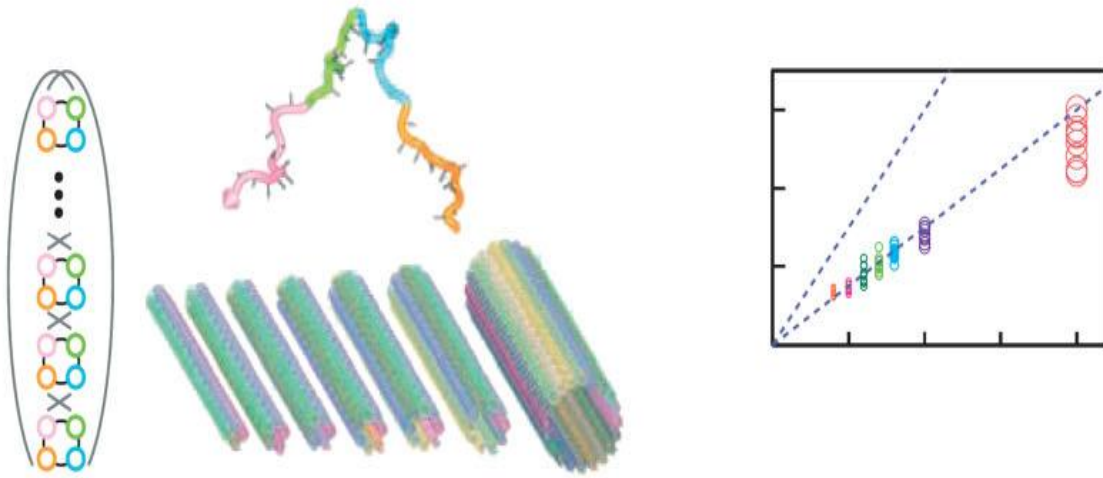
Ο Yin και οι συνεργάτες του [193] κατασκεύασαν DNA σωλήνες με μονοδιεσπαρμένες (monodisperse) και προγραμματιζόμενες περιμέτρους.

Ρύθμισαν κατάλληλα τις περιμέτρους DNA σωλήνων καθορίζοντας τη σχέση συμπληρωματικότητας μεταξύ συναρμολογούμενων περιοχών σε ένα μοτίβο μονόκλωνου DNA με 42 βάσεις. Προκειμένου να καταστεί δυνατός ο σε μεγάλο βαθμό έλεγχος των διαστάσεων του τελικού προϊόντος, κατασκευάστηκαν



Σχήμα 3.24: Μονοδιάστατοι DNA νανοσωλήνες που συναρμολογήθηκαν από τέσσερις ημισωλήνες (*half-tubes*) [74]. Η εικόνα από το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης δείχνει δέσμες τεσσάρων ελίκων (*four-helix bundles*).

πλέγματα DNA χρησιμοποιώντας εύκαμπτα μοτίβα μονόκλωνου DNA. Η μέθοδος αυτή ήταν πολύ πιο απλή από προηγούμενες μεθόδους που βασίζονταν σε άκαμπτα πλακίδια με πολλούς κλώνους. Ταιριάζοντας μεταξύ τους συγκεκριμένες περιοχές στο μοτίβο, μπόρεσαν να σχηματιστούν πλέγματα DNA από παράλληλες έλικες DNA συνδεδεμένες με ημι-διασταυρώσεις (*half-crossovers*) και από τα πλέγματα αυτά παρήχθησαν ολόκληροι DNA σωλήνες με μια ποικιλία προκαθορισμένων περιμέτρων (**σχήμα 3.25, αριστερά**). Γενικότερα, η συναρμολόγηση και η προτυποποίηση του μοτίβου μονόκλωνου DNA καθιστά δυνατή την εύκολη κωδικοποίηση του σχεδιασμού πλεγμάτων, η οποία επέτρεψε να αγνοείται η μοριακή δομή και ο σχεδιασμός των πλεγμάτων να ερμηνεύεται σε απλές αφηρημένες μορφές. Ανοιχτοί σωλήνες με 4, 5, 6, 7, 8, 10 και 20 έλικες μπόρεσαν να κατασκευαστούν ελεγχόμενα, με πλάτος ανάλογο του αριθμού των ελίκων (**σχήμα 3.25, δεξιά**).

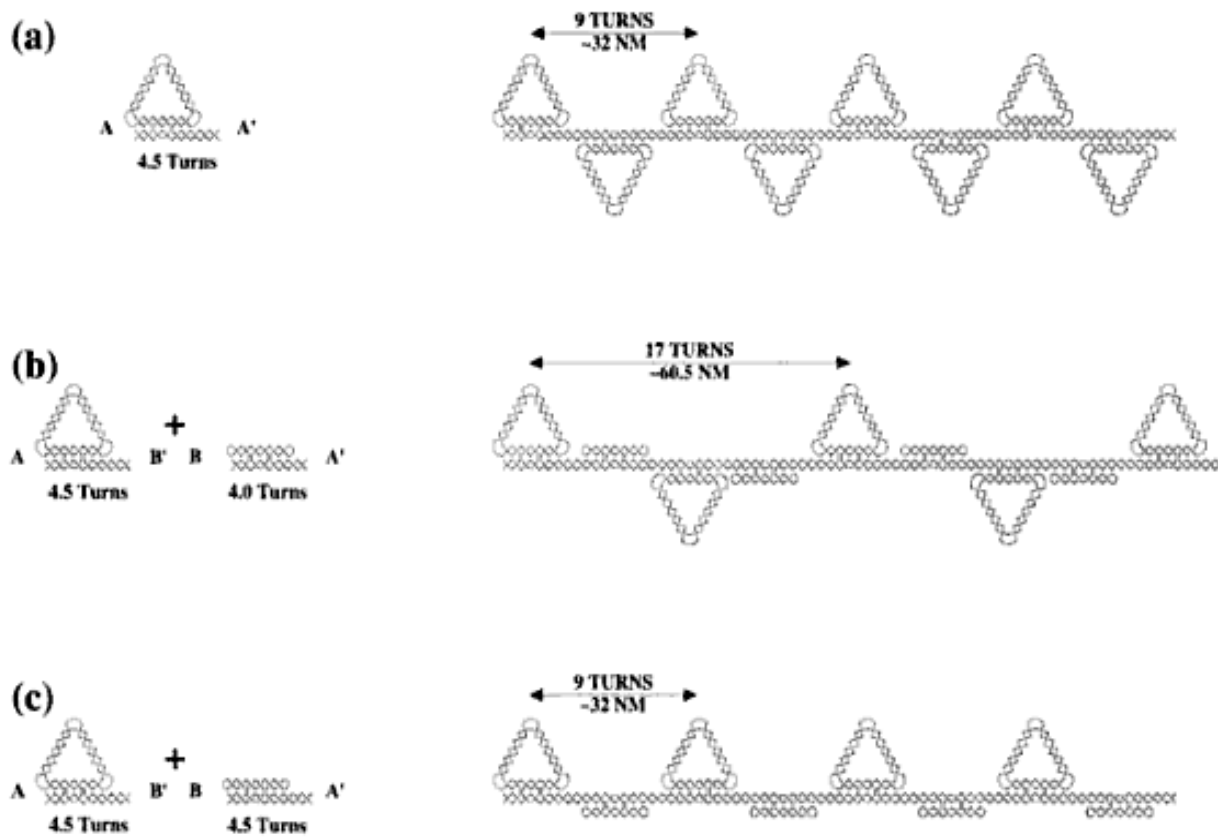


Σχήμα 3.25: Μονοδιάστατοι DNA σωλήνες με ρυθμιζόμενες περιμέτρους: το μοριακό πρόγραμμα (αριστερά) και το διάγραμμα του πλάτους των ανοιχτών σωλήνων (δεξιά).

Ένας από τους στόχους-κλειδιά της νανοτεχνολογίας του DNA είναι η κατασκευή περιοδικών διατάξεων. Για τη συναρμολόγηση τέτοιων διατάξεων, τα δομικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται είναι απαραίτητο να είναι άκαμπτα, επειδή εύκαμπτα δομικά στοιχεία μπορεί να οδηγήσουν σε κυκλοποίηση και σε διατάξεις μη επιθυμητές. Οι πρώτες περιοδικές διατάξεις που δημιουργήθηκαν ήταν μονοδιάστατες (1D) και περιελάμβαναν μόρια DX [47]. Ένα τέτοιο μονοδιάστατο σύστημα, που περιλαμβάνει την ένταξη ενός μορίου DX κατά μήκος μίας πλευράς ενός τριγώνου, φαίνεται στο [σχήμα 3.26\(α\)](#). Το τρίγωνο επιλέχθηκε επειδή είναι από τη φύση του ένα άκαμπτο δομικό στοιχείο. Η περιοχή DX διαμέσου της οποίας λαμβάνει χώρα η σύνδεση έχει μήκος 4,5 ελικοειδών στροφών. Ο μονός αριθμός των ημιστροφών σημαίνει ότι τα προϊόντα της σύνδεσης θα έχουν τρίγωνα με εναλλασσόμενες κατευθύνσεις ξεκινώντας από τον ίδιο κεντρικό άξονα. Όταν παρατηρεί κανείς το συνδεδεμένο μόριο με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης, βλέπει μία μακριά γραμμή με μικρά εξογκώματα σε κάθε πλευρά. Η απόσταση μεταξύ των τριγωνικών κορυφών είναι περίπου η αναμενόμενη, δηλαδή 32 nm. Είναι πάντα συνετό να εξετάζεται περαιτέρω κάθε εικόνα που προέρχεται από κάποιο μικροσκόπιο. Για το λόγο

Υποστρώματα

Αναμενόμενα προϊόντα σύνδεσης



Σχήμα 3.26: Πειράματα σύνδεσης χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο ατομικής δύναμης [47]. Στο σχήμα αυτό αποτυπώνονται τρία πειράματα. Στο αριστερό μέρος του σχήματος φαίνονται τα υποστρώματα και στο δεξί μέρος τα αναμενόμενα προϊόντα της σύνδεσης. (a) Τα τρίγωνα κατασκευάζονται με συμπληρωματικά κολλώδη άκρα και συνδέονται έτσι ώστε να σχηματιστεί μία γραμμική συστοιχία, στην οποία οι κορυφές των τριγώνων δείχνουν εκ περιτροπής προς αντίθετες κατευθύνσεις, επειδή το μήκος της συνδεδεμένης έλικας είναι 4,5 στροφές DNA. Οι διαδοχικές κορυφές στην ίδια πλευρά του κεντρικού άξονα βρίσκονται σε απόσταση περίπου 32 νανομέτρων. Το πείραμα στο σχήμα (b) απεικονίζει τη σύνδεση των ίδιων τριγώνων, αλλά αυτή τη φορά παρεμβάλλοντας ανάμεσα στα τρίγωνα ένα μόριο DX, του οποίου η περιοχή σύνδεσης είναι 4,0 στροφές. Τα κολλώδη άκρα στα τρίγωνα (που αναπαρίστανται ως A και B') και στα μόρια DX (που αναπαρίστανται ως B και A') εξασφαλίζουν αυτήν την αυστηρή εναλλαγή. Η δομή αυτή αυξάνει την απόσταση μεταξύ των διαδοχικών κορυφών στην ίδια πλευρά της κεντρικής έλικας σε περίπου 60,5 nm. Το πείραμα στο σχήμα (c) είναι παρόμοιο με το

μεσαίο πείραμα, με τη διαφορά ότι η περιοχή σύνδεσης του μορίου DX είναι 4,5 στροφές. Η σύνδεση αυτή παράγει ένα προϊόν στο οποίο όλα τα τρίγωνα βρίσκονται στην ίδια πλευρά της κεντρικής έλικας.

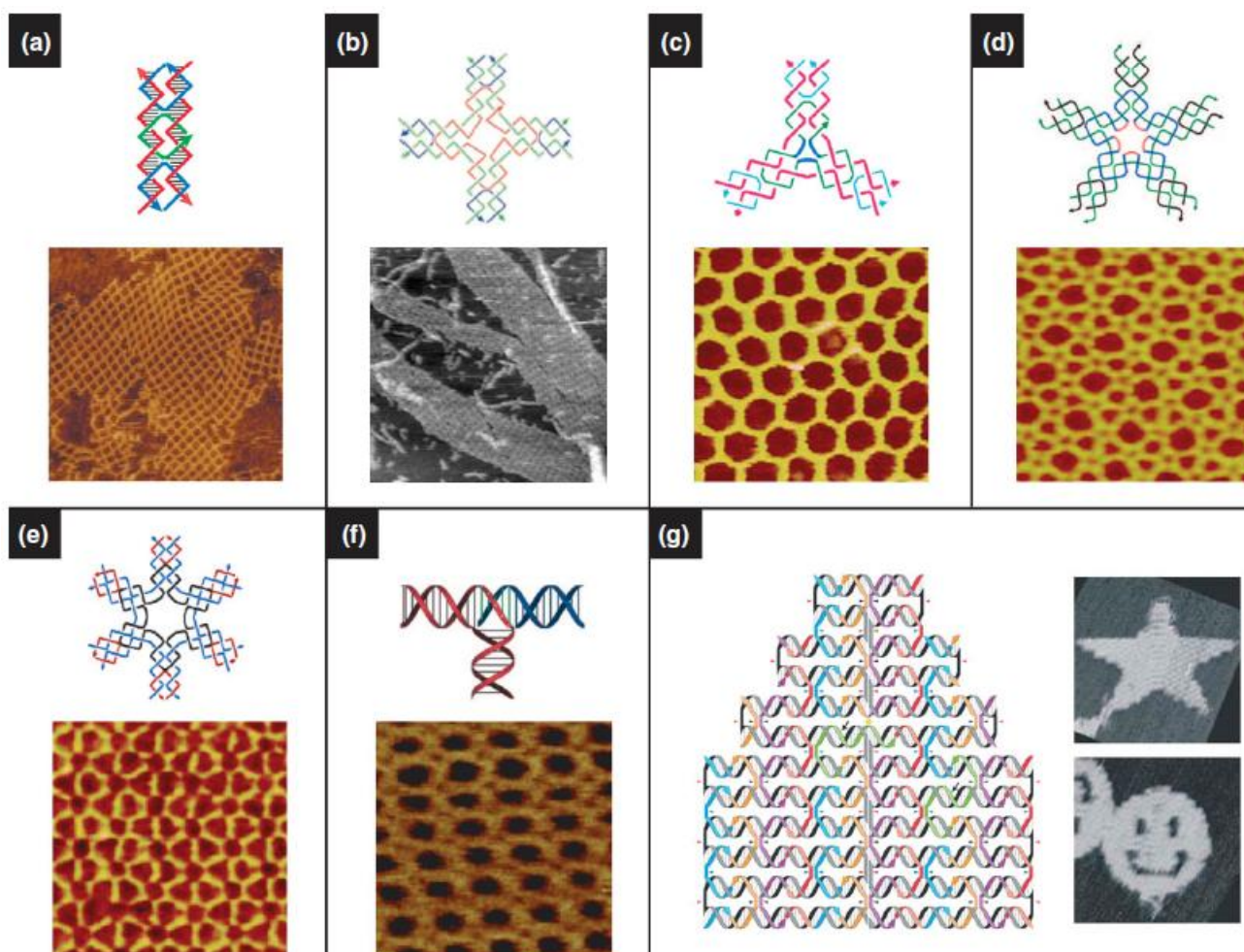
αυτό, διεξήχθησαν δύο πειράματα, τα οποία αποτυπώνονται στα σχήματα 3.26 (b) και 3.26 (c). Στο **σχήμα 3.26 (b)** απεικονίζεται μία σύνδεση στην οποία ένα απλό μόριο DX παρεμβάλλεται κάθε φορά ανάμεσα σε δύο τρίγωνα [47]. Στην περίπτωση αυτή, η απόσταση μεταξύ των κορυφών των τριγώνων θα έπρεπε να αυξάνεται σε 60,5 nm. Πράγματι, η παρατήρηση του προϊόντος σύνδεσης με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης επιβεβαιώνει ότι η εν λόγω απόσταση είναι η αναμενόμενη. Τέλος, το **σχήμα 3.26 (c)** δείχνει ότι η προσθήκη μιας ημιστροφής (πέντε ζευγών στην περίπτωση αυτή) στο διεσπαρμένο μόριο DX αναμένεται να αλλάξει την εικόνα δραματικά: Η απόσταση θα έπρεπε να επανέλθει στα 32 nm, αλλά αυτή τη φορά τα τρίγωνα θα έπρεπε να βρίσκονται όλα στη μία πλευρά του κεντρικού άξονα. Και πάλι, ακριβώς αυτό είναι το προκύπτον αποτέλεσμα.

Στα πειράματα αυτά, δεν παρατηρήθηκε κανένα κυκλικό προϊόν και καμία διαστρέβλωση της καμπυλότητας. Τα προκύπτοντα μόρια μπορεί να έχουν μήκος 85 τριγώνων ή και περισσότερων. Συνεπώς, φαίνεται ότι το μοτίβο DX μπορεί να προστεθεί με επιτυχία σε ένα DNA πολύγωνο, χωρίς να μειώσει τη δομική του ακεραιότητα.

3.5 Δισδιάστατες (2D) DNA κατασκευές

Την τελευταία δεκαετία, έχει κατασκευαστεί μία πληθώρα δισδιάστατων δομών με διαφορετικές γεωμετρίες και τοπολογίες, με εξαιρετική απόδοση. Το πιο σημαντικό διακλαδούμενο μόριο DNA στη δισδιάστατη αυτοσυναρμολόγηση του DNA είναι το DX (το οποίο φαίνεται στο σχήμα 3.10 της σελίδας 41 της παρούσας εργασίας). Τα μόρια DX είναι ανάλογα των ενδιαμέσων στη μείωση, που αποτελούνται από δύο δίκλωνες έλικες συνδεδεμένες σε δύο σημεία διασταύρωσης. Ο Winfree και οι συνεργάτες του [75] ήταν αυτοί που έφεραν εις

πέρας για πρώτη φορά τη συναρμολόγηση δισδιάστατων πλεγμάτων από μοτίβα DX, που απεικονίζονται στο [σχήμα 3.27\(a\)](#).



Σχήμα 3.27: Δισδιάστατες (2D) DNA νανοδομές [74]. **(a)** Δισδιάστατοι κρύσταλλοι σχηματισμένοι από μοτίβα DX. **(b)** Τετράγωνα πλέγματα σχηματισμένα από συνδέσμους με τέσσερεις διακλαδώσεις. **(c)** Εξαγωνικά πλέγματα σχηματισμένα από μοτίβα σχήματος αστεριού με τρεις κορυφές (three-point star motifs). **(d)** Πολύπλοκα πλέγματα συναρμολογούμενα από μοτίβα σχήματος αστεριού με πέντε κορυφές. **(e)** Δισδιάστατες περιοδικές συστοιχίες (2D periodic arrays) συναρμολογούμενες από συμμετρικά μοτίβα σχήματος αστεριού με έξι κορυφές. **(f)** Δισδιάστατες περιοδικές συστοιχίες συναρμολογούμενες από συνδέσμους T (T-junctions). **(g)** Δισδιάστατες διατάξεις κατασκευασμένες με τη μέθοδο DNA οριγκάμι (DNA origami), στην οποία ένας μακρύς μονός κλώνος διπλώνεται με τη βοήθεια μικρότερων «συνδετικών κλώνων» (“staple strands”).

Το μοτίβο DX αποτέλεσε έμπνευση για την κατασκευή πολλών άλλων μοτίβων για τη δημιουργία δισδιάστατων δομών, όπως των μοτίβων TX [80], του παραλληλογράμμου DNA [94], δομών τέσσερα επί τέσσερα (4x4) [90], και μοτίβων σχήματος αστεριού με 3, 5 και 6 κορυφές (3-, 5- και 6-point-star motifs) [σχήμα 3.27(b)-(e)] [95-97]. Τα μοτίβα αυτά οδήγησαν στον επιτυχή σχηματισμό δισδιάστατων συστοιχιών (2D arrays). Για παράδειγμα, ο Yan και οι συνάδελφοί του [90] σχεδίασαν έναν σύνδεσμο με τέσσερις διακλαδώσεις για να συναρμολογήσει νανοταινίες (nanoribbons) με ομοιόμορφο πλάτος και δισδιάστατα νανοπλέγματα (nanogrids) (σχήμα 3.27 (b)). Ο He και οι συνεργάτες του [95] κατασκεύασαν πορώδεις και εξαγωνικές δισδιάστατες συστοιχίες που συναρμολογήθηκαν από μοτίβα σχήματος αστεριού με τρεις κορυφές (three-point-star motifs) (σχήμα 3.27 (c)). Τα προηγούμενα χρόνια, επικρατούσε η αντίληψη ότι ήταν δυνατόν να κατασκευαστούν δομές DNA μόνο από τρίγωνα ή μόνο από τετράγωνα ή μόνο από εξάγωνα [98]. Παρόλα αυτά, δισδιάστατες αυτοσυναρμολογούμενες DNA συστοιχίες μπορεί να περιλαμβάνουν δομές διαφορετικών τύπων. Παραδείγματος χάριν, ο Zhang και οι συνεργάτες του [96] κατασκεύασαν δισδιάστατα πλέγματα αποτελούμενα και από τρίγωνα και από τετράγωνα, χρησιμοποιώντας το μοτίβο σχήματος αστεριού με πέντε κορυφές (σχήμα 3.27 (d)).

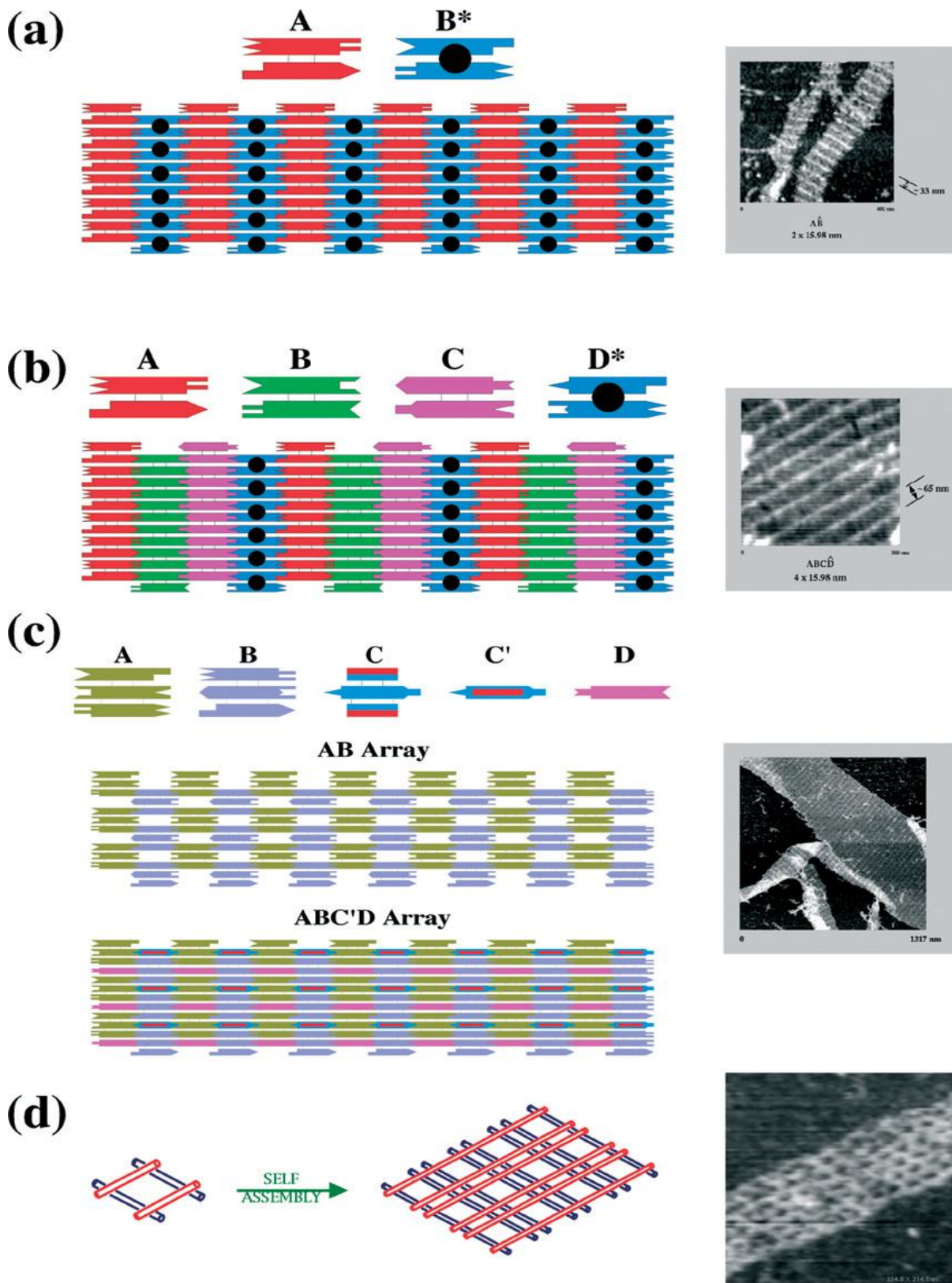
Ο Mao και οι συνάδελφοί του ανέπτυξαν την ιδέα ότι η συμμετρία αλληλουχιών DNA (DNA sequence symmetry) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό δομικών μονάδων DNA για μεγαλύτερες αυτοσυναρμολογούμενες δομές [97, 99, 100]. Για παράδειγμα, χρησιμοποίησαν συμμετρικά μοτίβα σχήματος αστεριού με έξι κορυφές για να κατασκευάσουν σταθερές δισδιάστατες περιοδικές συστοιχίες (σχήμα 3.27 (e)). Η συμμετρία αλληλουχιών DNA πλεονεκτούσε στο ότι χρησιμοποιούσε λιγότερους κλώνους DNA και αποφεύγονταν κάποιες απρόβλεπτες παραμορφώσεις στις DNA νανοδομές. Είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι η «συμμετρία αλληλουχιών» στην περίπτωση αυτή είναι μεταξύ διαφορετικών κλώνων στο ίδιο μοτίβο DNA στις συμμετρικές θέσεις, αλλά εντός κάθε μεμονωμένου κλώνου η συμμετρία των ζευγών βάσεων (base-pairing symmetry) εξακολουθεί να αποφεύγεται.

Οι προαναφερθείσες δισδιάστατες περιοδικές συστοιχίες δεν είναι, προφανώς, οι μοναδικές που έχουν κατασκευαστεί. Στο σχήμα 3.28(a) απεικονίζεται μία

συστοιχία που κατασκευάστηκε από ένα μόριο DX και ένα μόριο DX+J [14]. Οι διαστάσεις αυτών των δομικών στοιχείων πάχους 2 νανομέτρων είναι περίπου 4 x 16 nm. Το μόριο DX+J έχει τις επιπρόσθετες περιοχές του περιστρεμμένες έξω από το επίπεδο της συστοιχίας, έτσι ώστε να δρουν ως τοπογραφικοί δείκτες για το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης. Συνεπώς, θα έπρεπε να εμφανίζεται στη διάταξη μια σειρά από γραμμικούς σχηματισμούς, σε απόσταση περίπου 32 nm ο ένας από τον άλλον, όπως φαίνεται στο δεξί μέρος του σχήματος. Στο **σχήμα 3.28 (b)**, στο οποίο φαίνεται μια δεύτερη DX συστοιχία, υποδεικνύεται το επίπεδο του ελέγχου επί της διάταξης. Εδώ, τρία πλακίδια DX έχουν συνδυαστεί με ένα πλακίδιο DX+J, για να σχηματιστεί μία διάταξη στην οποία η απόσταση μεταξύ των γραμμών είναι 64 nm.

Μπορεί κανείς να ακολουθήσει την ίδια προσέγγιση για την κατασκευή διατάξεων που χρησιμοποιήθηκε για τις DX συστοιχίες, χρησιμοποιώντας ένα πλακίδιο TX+J [14]. Το πλακίδιο TX προσφέρει έναν εύκολο τρόπο για την εισαγωγή δειγμάτων εντός της συστοιχίας: είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα κενό σε ένα συνεχές πλέγμα συνδέοντας μεταξύ τους τα μεμονωμένα πλακίδια 1-3, τοποθετώντας, για παράδειγμα, κολλώδη άκρα που συνδέουν την πρώτη περιοχή στην τρίτη περιοχή, όπως απεικονίζεται στην AB συστοιχία του **σχήματος 3.28 (c)**. Ένας τρόπος για να παρουσιαστεί μία επιτυχημένη εισαγωγή σε αυτήν την συστοιχία είναι να μετατοπιστεί (re-phase) ένα τρίτο πλακίδιο TX (το C στο σχήμα 3.28 (c)) κατά τρία ζεύγη νουκλεοτιδίων (~102°), έτσι ώστε να είναι περίπου κάθετο στην AB συστοιχία (την C' στο σχήμα 3.28 (c)). Το πλακίδιο αυτό τοποθετείται στην μπλε-γκρι στήλη στην AB συστοιχία με σύνδεση της κεντρικής του περιοχής. Ένα τέταρτο δομικό στοιχείο, ένα τμήμα γραμμικού διπλού DNA (το D στο σχήμα 3.28(c)), έχει, επίσης, εισαχθεί στη χρυσή γραμμή.

Στο **σχήμα 3.28 (d)** αποτυπώνεται ο συνδυασμός τεσσάρων συνδέσμων με τέσσερις διακλαδώσεις προς σχηματισμό ενός παραλληλογράμμου [14]. Οι διακλαδούμενοι σύνδεσμοι «ταξινομούν» τις τέσσερις διακλαδώσεις τους σε δύο περιοχές διπλής έλικας, η καθεμία από τις οποίες είναι συνεστραμμένη ως προς την άλλη. Η συστροφή μπορεί να είναι 40-60° από αντιπαράλληλα ή 70° από παράλληλα, ούτως ώστε να μπορεί να παραχθεί μια ποικιλία παραλληλογράμμων. Τα παραλληλόγραμμα μπορούν να συνδεθούν μέσω



Σχήμα 3.28: Δισδιάστατες DNA συστοιχίες [14]. **(a)** Η συστοιχία αποτελείται από δύο διαφορετικά μόρια DN , ένα τυπικό μόριο DN , το A , και ένα μόριο $DN+J$, το B^* . Η επιπρόσθετη περιοχή στο B^* οδηγεί σε γραμμές. Τα μόρια είναι 4×16 nm στην προβολή αυτή, οπότε οι γραμμές βρίσκονται σε απόσταση περίπου 32 nm

η μία από την άλλη, όπως φαίνεται στην εικόνα από το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM) στο δεξί μέρος του σχήματος. **(b)** Η συστοιχία αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά μόρια DX. Η διάταξη αυτή είναι παρόμοια με εκείνη του (a), με τη διαφορά ότι εδώ υπάρχει μόνο ένα μόριο DX+J, το D*, οπότε η απόσταση μεταξύ των γραμμών είναι περίπου 64 nm, όπως φαίνεται στα δεξιά. **(c)** Μία TX συστοιχία. Δύο πλακίδια TX, A και B είναι συνδεδεμένα μέσω συμπληρωματικότητας μεταξύ της πρώτης και της τρίτης τους περιοχής διπλής έλικας, με αποτέλεσμα να υπάρχουν κενά ανάμεσα στα πλακίδια. Το D είναι ένα γραμμικό διπλό μόριο που βρίσκεται στις κίτρινες σειρές και το C είναι ένα μόριο TX, το οποίο έχει μετατοπιστεί κατά τρία ζεύγη νουκλεοτιδίων· βρίσκεται στις γκρι σειρές και επεκτείνει τις έλικες πέρα από το επίπεδο AB και στις δύο κατευθύνσεις, όπως φαίνεται στη μικρογραφία στα δεξιά. **(d)** Μία παραλληλόγραμμη DNA συστοιχία. Τέσσερα ανάλογα του συνδέσμου Holliday σχηματίζουν ένα παραλληλόγραμμο, το οποίο επεκτείνεται για να παραχθεί μία περιοδική συστοιχία. Τα μεγέθη των κοιλοτήτων στη συστοιχία μπορούν να ρυθμιστούν. Οι κοιλοότητες στη συστοιχία στα δεξιά είναι περίπου 13 x 20 nm.

συνένωσης των κολλωδών άκρων (sticky-ended cohesion) για να παραχθεί μία συστοιχία που να περιέχει κοιλοότητες, όπως αυτή που φαίνεται στο σχήμα 3.28(d).

Πολύ πρόσφατα, ο Hamada και οι συνεργάτες του [101] ανέπτυξαν ένα νέο μοτίβο, έναν αλληλοσυνδεδεμένο σύνδεσμο T (T-junction), ο οποίος συναρμολογείται σε ποικίλες δομές σε διάλυμα, όπως σε ορθογωνικά συνδεδεμένες σκάλες και πλέγματα (*σχήμα 3.27 (f)*). Σε αντίθεση με τον διασταυρούμενο σύνδεσμο (crossover junction) με την ίδια γεωμετρία, ο σύνδεσμος T παρέχει μία γεωμετρία ορθής γωνίας (right-angled), η οποία διευρύνει την ποικιλία των DNA νανοδομών. Επιπροσθέτως, οι σύνδεσμοι T καθιστούν δυνατή τη μεγαλύτερη δομική ανάλυση, επειδή έχουν μικρότερο μήκος διασύνδεσης (6 ή 7 ζεύγη βάσεων) μεταξύ των μοτίβων συγκρινόμενα με τα μοτίβα που βασίζονται σε διασταυρώσεις (τουλάχιστον 10,5 ζεύγη βάσεων). Αυτό θα μπορούσε να κάνει δυνατό το σχηματισμό μικρότερων «νανοσκοπικών» λεπτομερειών στις DNA νανοδομές. Επίσης, ο σύνδεσμος T περιορίζει την

ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των ραχοκοκαλιών του DNA, αποφεύγοντας την παραμόρφωση που προκύπτει από έλικες διατεταγμένες παράλληλα [74]. Επιπλέον, οι δομές αυτές μπορούν να αναπτυχθούν ομοιόμορφα πάνω σε ολόκληρη την επιφάνεια των υποστρωμάτων με μία βοηθούμενη από τα υποστρώματα μέθοδο συναρμολόγησης (substrate-assisted assembly method). Ο Sun και οι συνεργάτες του [102] παρουσίασαν μία παρόμοια βοηθούμενη από τα υποστρώματα αυτοσυναρμολόγηση του DNA.

Ένα συναρπαστικό επίτευγμα στη δομική νανοτεχνολογία του DNA ως προς τη δημιουργία πολύπλοκων διατάξεων φέρει την ονομασία «DNA οριγκάμι» (DNA origami), που αναπτύχθηκε από τους Rothemund και Winfree [3]. Σε αντίθεση με τη συμβατική στρατηγική που βασίζεται στις διασταυρώσεις, με την οποία δημιουργούνται απλές δομικές μονάδες που αυτοσυναρμολογούνται σε μεγαλύτερες δομές με μία διαδικασία «δύο βημάτων» (“two-step process”), το DNA οριγκάμι παρέχει μία ευπροσάρμοστη και απλή μέθοδο ενός σταδίου (one-pot), χρησιμοποιώντας αναρίθμητους κοντούς μονούς κλώνους DNA [συνδεδετικούς κλώνους (staple strands)] για να κατευθύνουν την αναδίπλωση ενός μακρού μονού κλώνου DNA στο επιθυμητό σχήμα (**σχήμα 3.27 (g)**). Οι DNA νανοδομές που συναρμολογούνται με τη μέθοδο DNA οριγκάμι μπορεί να είναι πολύ πολύπλοκες και θεωρείται ότι θα μπορούσε έτσι να σχηματιστεί οποιοδήποτε αυθαίρετο σχήμα. Ο Rothemund, το 2006, με τη δημοσίευσή του υπέδειξε ότι κατάφερε να πάρει μονόκλωνο DNA από τον ιό M13 και να το διπλώσει έτσι ώστε να σχηματιστεί μια ποικιλία σχημάτων [15], συμπεριλαμβανομένου ενός χαμογελαστού προσώπου (που φαίνεται στο δεξί μέρος του **σχήματος 3.27 (g)**). Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του κατορθώματος αυτού είναι ότι δημιουργεί μία κατευθυνόμενη (addressable) έκταση επιφάνειας 100 περίπου τετραγωνικών νανομέτρων.

Παρόλα αυτά, μία κρίσιμη πρόκληση για την εν λόγω μέθοδο είναι η αύξηση του μεγέθους των δημιουργούμενων δομών [74]. Ο Zhao και οι συνεργάτες του [103] ανέπτυξαν μία νέα στρατηγική στην οποία χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια DNA ορθογώνιου σχήματος αντί για παραδοσιακούς «συνδεδετικούς κλώνους» για την κατασκευή δισδιάστατου DNA οριγκάμι μεγαλύτερης κλίμακας και, πιο

συγκεκριμένα, με περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερο μέγεθος από αυτό της κατασκευής του Rothemund.

Η μέθοδος DNA οριγκάμι χρησιμοποιείται ευρέως από τότε που πρωτοπαρουσιάστηκε [15]. Για παράδειγμα, χρησιμοποιείται για την κατασκευή μακριών δεσμών έξι ελίκων (six-helix bundles), ως βοήθημα στον προσδιορισμό της δομής αντικειμένων με NMR, καθώς και για την κατασκευή τρισδιάστατων αντικειμένων.

3.6 Τρισδιάστατες (3D) DNA κατασκευές

Όταν ο Seeman δημοσίευσε την επαναστατική του ιδέα στις αρχές του 1980, ένας από τους πιο βασικούς του στόχους ήταν η κατασκευή τρισδιάστατων DNA κρυστάλλων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X διαφόρων μορίων, όπως πρωτεϊνών [19]. Αποδείχτηκε, όμως, ότι ήταν πολύ πιο δύσκολο να κατασκευαστούν τρισδιάστατες δομές από ό,τι δισδιάστατες και ο στόχος αυτός δεν είχε επιτευχθεί έως το 2004. Θεωρητικά, δε θα έπρεπε να υπάρχει καμία εννοιολογική διαφορά ανάμεσα στη δισδιάστατη και τρισδιάστατη αυτοσυναρμολόγηση, το οποίο σημαίνει ότι οι αρχές της δισδιάστατης συναρμολόγησης θα έπρεπε να ισχύουν και στα τρισδιάστατα συστήματα. Παρόλα αυτά, οι αρχικές απόπειρες να κατασκευαστούν τρισδιάστατες δομές σύμφωνα με τις αρχές αυτές παρεμποδίστηκαν από την περιορισμένη ακαμψία των δομικών μονάδων DNA [74]. Η ανάπτυξη άκαμπτων μοτίβων και στρατηγικών συναρμολόγησης άνοιξε το δρόμο για την κατασκευή ενός μεγάλου αριθμού τρισδιάστατων νανοϋλικών.

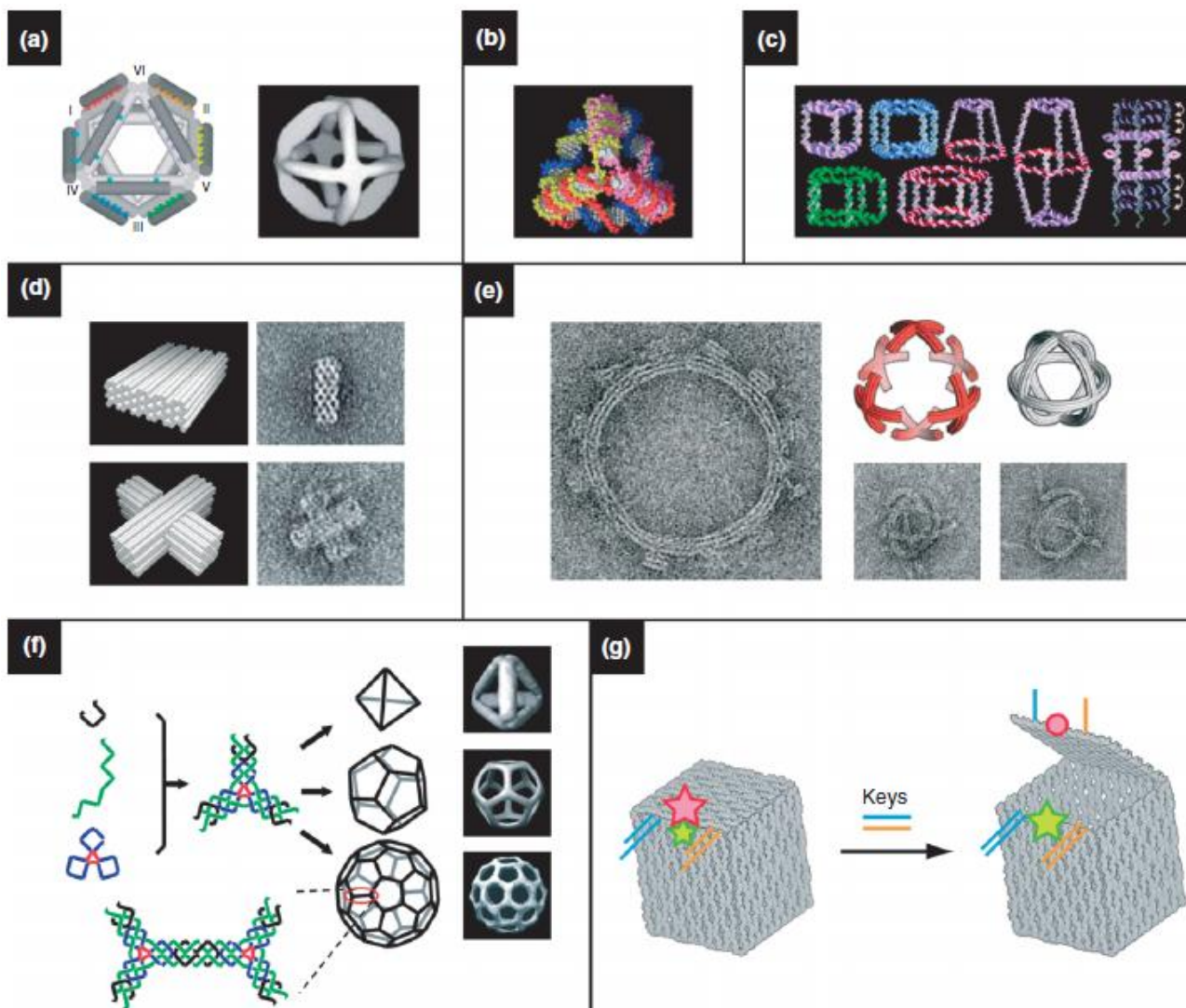
Ο Shih και οι συνεργάτες του [106] κατασκεύασαν ένα άκαμπτο και χειρόμορφο DNA οκτάεδρο, αναδιπλώνοντας ένα μονόκλωνο DNA μήκους 1,7 χιλιάδων ζευγών βάσεων (1,7 kb*), το οποίο αποτελούνταν από πέντε μοτίβα DX και επτά μοτίβα PX ενωμένα σε έξι κόμβους με τέσσερις διακλαδώσεις (**σχήμα 3.29 (α), αριστερά**). Χρησιμοποίησαν μικροσκόπιο μετάδοσης ηλεκτρονίων (Transmission

*Η χιλιάδα ζευγών βάσεων (kilobase, kb) είναι μια μονάδα μέτρησης μεγέθους μορίων DNA ή RNA και ισούται, όπως είναι πασιφανές από την ονομασία της, με χίλια ζεύγη βάσεων.

Electron Microscope, TEM) για να παρατηρήσουν τη μορφολογία των προϊόντων της συναρμολόγησης, το οποίο αποκάλυψε την επιτυχή αναδίπλωση των κλώνων DNA σε μία οκταεδρική δομή (*σχήμα 3.29 (α), δεξιά*). Ο Turberfield και κάποιοι συνάδελφοί του κατασκεύασαν μια σειρά από DNA τετράεδρα [107] (*σχήμα 3.29 (β)*). Οι δομές αυτές συναρμολογήθηκαν αποκλειστικά μέσω υβριδοποίησης των συμμετεχόντων μορίων μονόκλωνου DNA και η απόδοση παραγωγής τους ήταν μεγάλη (>95% σε συγκέντρωση DNA 50 nM).

Οι Aldaye και Sleiman παρουσίασαν μία καινοτόμο σταδιακή μέθοδο συναρμολόγησης για την κατασκευή τρισδιάστατων DNA πρισμάτων [74]. Αρχικά, έφτιαξαν κυκλικά μόρια μονόκλωνου DNA μέσω σύνθεσης DNA σε στερεή φάση (solid-phase DNA synthesis) και επακόλουθης χημικής σύνδεσης με το DNA ως εκμαγείο (DNA-templated chemical ligation). Η γεωμετρία αυτών των κυκλικών μορίων μονόκλωνου DNA μπορούσε να σχεδιαστεί και να ελεγχθεί κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Ως αποτέλεσμα, δημιουργήθηκε μία βιβλιοθήκη από πολυγωνικές DNA δομές με πλευρές από μονόκλωνο DNA και άκαμπτα οργανικά μόρια ως κορυφές (*σχήμα 3.29 (γ)*). Στο επόμενο βήμα, τα DNA πολύγωνα λειτούργησαν ως οι επάνω και κάτω πλευρές τρισδιάστατων DNA πρισμάτων, οι οποίες αμφοτέρως ενώθηκαν συνδέοντας κλώνους μεταξύ τους, και οι κάθετες πλευρές ενισχύθηκαν επιπρόσθετα από κλώνους που προσδίδουν ακαμψία. Αυτή η δομοστοιχειωτή σχεδίαση και συνδυαστική στρατηγική συναρμολόγησης κατέστησε δυνατή την κατασκευή ενός τεράστιου αριθμού τρισδιάστατων DNA κλουβιών (3D DNA cages).

Ο Shih και οι συνεργάτες του πρόσφατα επέκτειναν το DNA οριγκάμι στην κατασκευή τρισδιάστατων νανοδομών [109, 110]. Παρουσίασαν μία προσέγγιση πτυχωτού σαν κυψέλη οριγκάμι (honeycomb-pleated origami) που εξελισσόταν σε μία αντίδραση ενός σταδίου μεταξύ ενός κλώνου που δρούσε ως ικρίωμα (scaffold strand) και εκατοντάδων συνδετικών κλώνων ολιγονουκλεοτιδίων (staple strands), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να κατευθύνουν την αναδίπλωσή του στο επιθυμητό σχήμα. Σχεδιάστηκαν πολλά τρισδιάστατα αντικείμενα με διαφορετικές μορφολογίες, συμπεριλαμβανομένων μονόλιθων, τετράγωνων περικοχλίων, περιπλεγμένων σταυρών (slotted crosses) και στοιβαγμένων σταυρών (stacked crosses): δύο αντιπροσωπευτικές εικόνες



Σχήμα 3.29: Τρισδιάστατες (3D) DNA νανοδομές [74]. **(a)** Οκτάεδρα. **(b)** Τετράεδρα. **(c)** Μια ποικιλία πολυέδρων. **(d, e)** Τρισδιάστατο DNA οριγκάμι. **(f)** Κενά πολυέδρα, που έχουν συναρμολογηθεί μέσω τροποποίησης της ευκαμψίας μοτίβων σχήματος αστεριού με τρεις κορυφές, στα οποία η καμπυλότητα καθορίζει το προκύπτον σχήμα. **(g)** Ένα DNA κουτί βασισμένο στο DNA οριγκάμι. Το κουτί μπορεί να ανοίξει με την εισαγωγή δύο «κλειδιών» ολιγονουκλεοτιδίων.

φαίνονται στο **σχήμα 3.29 (d)** [109]. Χρησιμοποιώντας την ίδια στρατηγική, επέκτειναν τα σχήματα DNA-οριγκάμι ώστε να συμπεριλάβουν μία πλούσια ποικιλία νανοδομών με σχεδιασμένη συστροφή (twist) και καμπυλότητα. Όχι

μόνο κατασκεύασαν συνεστραμμένες DNA δέσμες και καμπύλα σχήματα με σαφώς καθορισμένες γωνίες κάμψης, αλλά συναρμολόγησαν, επίσης, συνεστραμμένα και καμπύλα αντικείμενα σε πιο περίπλοκες δομές, όπως οδοντωτούς τροχούς στην κλίμακα των νανομέτρων (nanogears) και σφαιρικούς ακροδέκτες (wireframes) [110] (*σχήμα 3.29(e)*).

Κενές τρισδιάστατες νανοδομές, όπως δισδιάστατα πλέγματα, συναρμολογούνται από απλούστερες DNA υπομονάδες και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητάς τους να μεταφέρουν φορτίο. Ο He και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μία στρατηγική συναρμολόγησης ενός σταδίου για τη συναρμολόγηση ξεχωριστών τρισδιάστατων δομών [74]. Μοτίβα σχήματος αστεριού με τρεις κορυφές (three-point star motifs), που χρησιμοποιούνται συνήθως για να συναρμολογηθούν σε δισδιάστατες συστοιχίες, μπόρεσαν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να έχουν μια πιο εύκαμπτη δομή μέσω προσεκτικής τροποποίησης του συνδέσμου. Η ευκαμψία αυτή κατάφερε να προάγει καμπυλότητα στις υπομονάδες, η οποία οδήγησε στο σχηματισμό κλειστών πολυεδρικών δομών, συμπεριλαμβανομένων τετραέδρων, δωδεκαέδρων και «σφαιρών-κλωβών» (buckyballs) (*σχήμα 3.29(f)*). Ομοίως, ο Zhang και οι συνάδελφοί του [96] χρησιμοποίησαν ένα συμμετρικό μοτίβο σχήματος αστεριού με πέντε κορυφές για να κατασκευάσουν εικοσάεδρα και νανοκλουβιά (nanocages). Πρόσφατα, ο Andersen και οι συνεργάτες του [85] χρησιμοποίησαν τη μέθοδο DNA οριγκάμι για να σχεδιάσουν τρισδιάστατα κουτιά με ρυθμιζόμενο άνοιγμα καπακιών (controllable lids). Στην περίπτωση αυτή, σχεδιάστηκαν έξι πλευρές DNA οριγκάμι που συναρμολογήθηκαν σε ένα κενό τρισδιάστατο κουτί (*σχήμα 3.29(g)*). Το καπάκι του κουτιού «ανοίγει» και «κλείνει» δυναμικά μέσω της εισαγωγής «κλειδιών» αλληλουχιών νουκλεοτιδίων που μετατοπίζουν τα διπλά μόρια DNA που κρατούν το καπάκι κλειστό. Το άνοιγμα του καπακιού του κουτιού μπορούσε να παρατηρηθεί μέσω αλλαγών στη μεταφορά ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET) μεταξύ δύο φθορίζουσών χρωστικών ουσιών τοποθετημένων στην DNA δομή σε στρατηγικές θέσεις. Το άνοιγμα του DNA κουτιού θα μπορούσε να προγραμματιστεί έτσι ώστε να χρειάζεται δύο κλειδιά ολιγονουκλεοτιδίων για να επιτευχθεί, επομένως, οι δημιουργοί του προτείνουν ότι υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησης των δομών αυτών για απελευθέρωση φορτίου [34].

4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ DNA

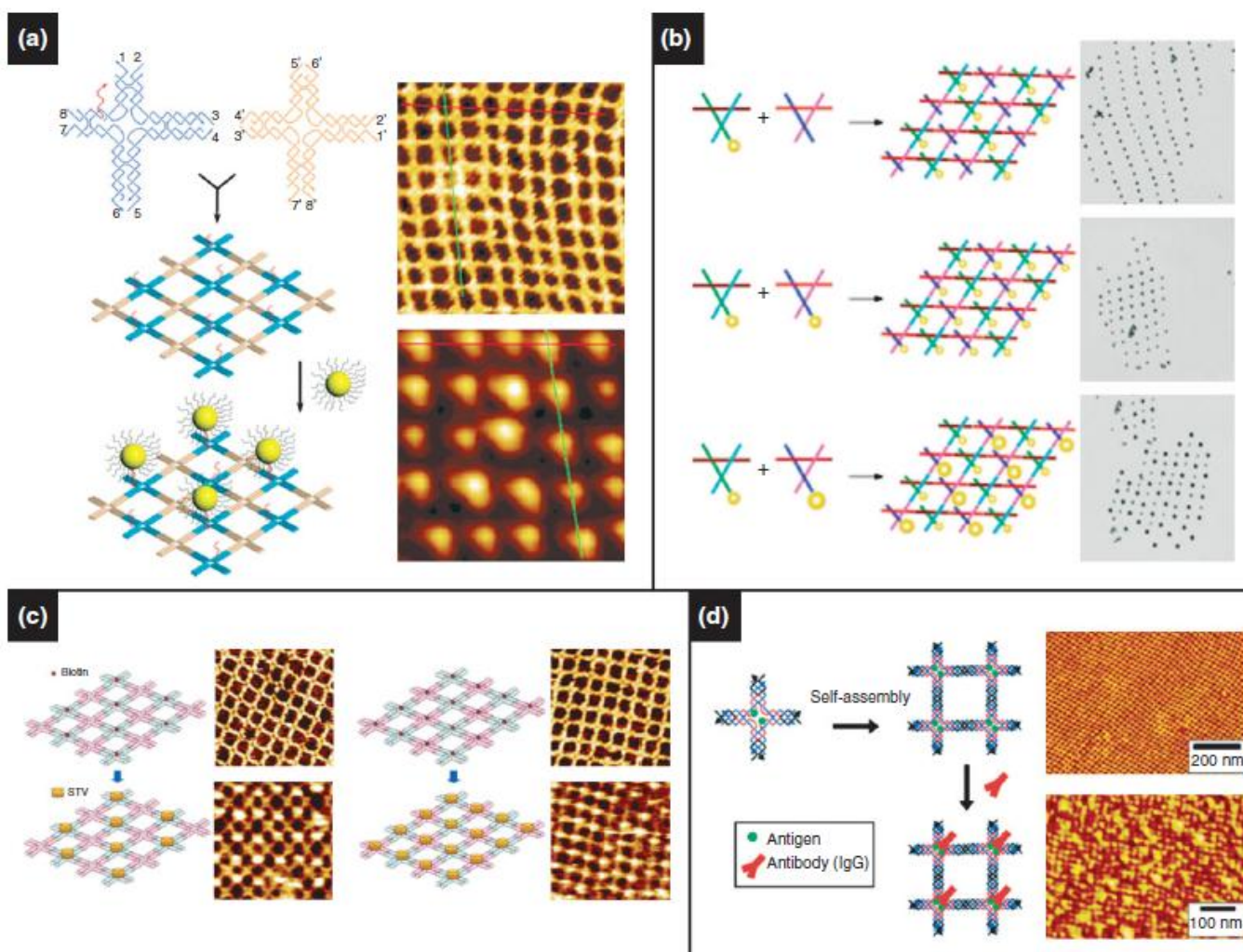
4.1 Το DNA ως εκμαγείο για αυτοσυναρμολόγηση

Έχει αποδειχθεί ότι μία ποικιλία λειτουργικών ομάδων και δομικών στοιχείων μπορούν να ενωθούν χημικά με το DNA. Αυτό ενισχύει σημαντικά την ελκυστικότητα των αυτοσυναρμολογούμενων DNA νανοδομών ως εξαιρετικών εκμαγείων για την τοποθέτηση στο χώρο άλλων λειτουργικών μορίων με ακρίβεια της τάξης των νανομέτρων και ακόμα μεγαλύτερη.

Με σκοπό τη συναρμολόγηση νανοσυρμάτων (nanowires), έχουν παρουσιαστεί γραμμικές συστοιχίες νανοσωματιδίων από αρκετές ομάδες επιστημόνων. Σύρματα νανοσωματιδίων έχουν κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατική πρόσδεση νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) καλυμμένων με συνδέτη (ligand-capped) στη ραχοκοκαλιά του DNA [118, 119], «εισαγωγή» του συνδέτη που καλύπτει τα νανοσωματίδια στο DNA εκμαγείο [120] και συγκρατώντας νανοσωματίδια που καθίστανται λειτουργικά από τη στρεπταβιδίνη (streptavidin-functionalized nanoparticles) σε βιοτινυλιωμένες γραμμικές DNA συστοιχίες [121]. Σε μία πρόσφατη δημοσίευση από τον Stearns και τους συνεργάτες του [122], DNA νανοσωλήνες με ακινητοποιημένα στην επιφάνεια συζεύγματα πεπτιδίου-DNA χρησιμοποιήθηκαν για να σχηματίσουν γραμμικές συστοιχίες νανοσωματιδίων. Στην περίπτωση αυτή, το άλας χρυσού μειώθηκε υπό την παρουσία των πεπτιδίων, με αποτέλεσμα την πυρήνωση και ανάπτυξη των AuNPs στις περιοχές στις οποίες υπήρχε το πεπτίδιο.

Ενσωματώνοντας λειτουργικά τμήματα στις αρχιτεκτονικές τους, τα δισδιάστατα DNA πλέγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ικριώματα για την οργάνωση υλικών στη νανοκλίμακα, όπως νανοσωματιδίων και μακρομορίων. Ο Xiao και οι συνάδελφοί του [123] παρουσίασαν DNA πλέγματα (DNA grids) φτιαγμένα από πλακίδια DX. Νανοσωματίδια συνδέθηκαν με ομοιοπολικό δεσμό με το DNA εντός ενός πλακιδίου. Σε μία μετέπειτα προσέγγιση, νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) επικαλύφθηκαν με μονόκλωνο DNA και ύστερα συνδέθηκαν με δισδιάστατες DNA συστοιχίες από πλακίδια DX μέσω συμπληρωματικών προεξοχών που προεξείχαν από τα πλακίδια [124, 125]. Εκτός από τις συστοιχίες

πλακιδίων, για την οργάνωση νανοσωματιδίων χρυσού που καθίστανται λειτουργικά από το DNA (DNA-functionalized AuNPs) έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί περιοδικά τετράγωνα πλέγματα συναρμολογούμενα από συνδέσμους με τέσσερις διακλαδώσεις. Προσεκτικός σχεδιασμός των πλακιδίων του πλέγματος, τέτοιος ώστε μπόρεσε να ακινητοποιηθεί σε κάθε κόμβο ένα νανοσωματίδιο, οδήγησε στη δημιουργία συστοιχιών με ακριβή τοποθέτηση των νανοσωματιδίων [126, 127] (σχήμα 4.1 (a)). Ο Zheng και συνεργάτες του [128] παρουσίασαν την περιοδική διάταξη νανοσωματιδίων διαφορετικών μεγεθών (σχήμα 4.1(b)). Όπως τα νανοσωματίδια χρυσού, έτσι



Σχήμα 4.1: DNA νανοδομές που χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη συναρμολόγηση δομικών στοιχείων στη νανοκλίμακα. **(a)** Δισδιάστατες συστοιχίες νανοσωματιδίων χρυσού. **(b)** Προγραμματιζόμενες υπομονάδες καθιστούν δυνατή τη διάταξη νανοσωματιδίων διαφορετικού μεγέθους. **(c)** Συστοιχίες στρεπταβιδίνης. **(d)** Συστοιχίες αντισωμάτων.

και τα DNA ικρίωματα (DNA scaffolds) είναι ικανά να διατάσσουν άλλα δομικά στοιχεία στη νανοκλίμακα, όπως κβαντικά στίγματα (QDs, Quantum Dots) [129], ακόμη και νανοσωλήνες άνθρακα [130].

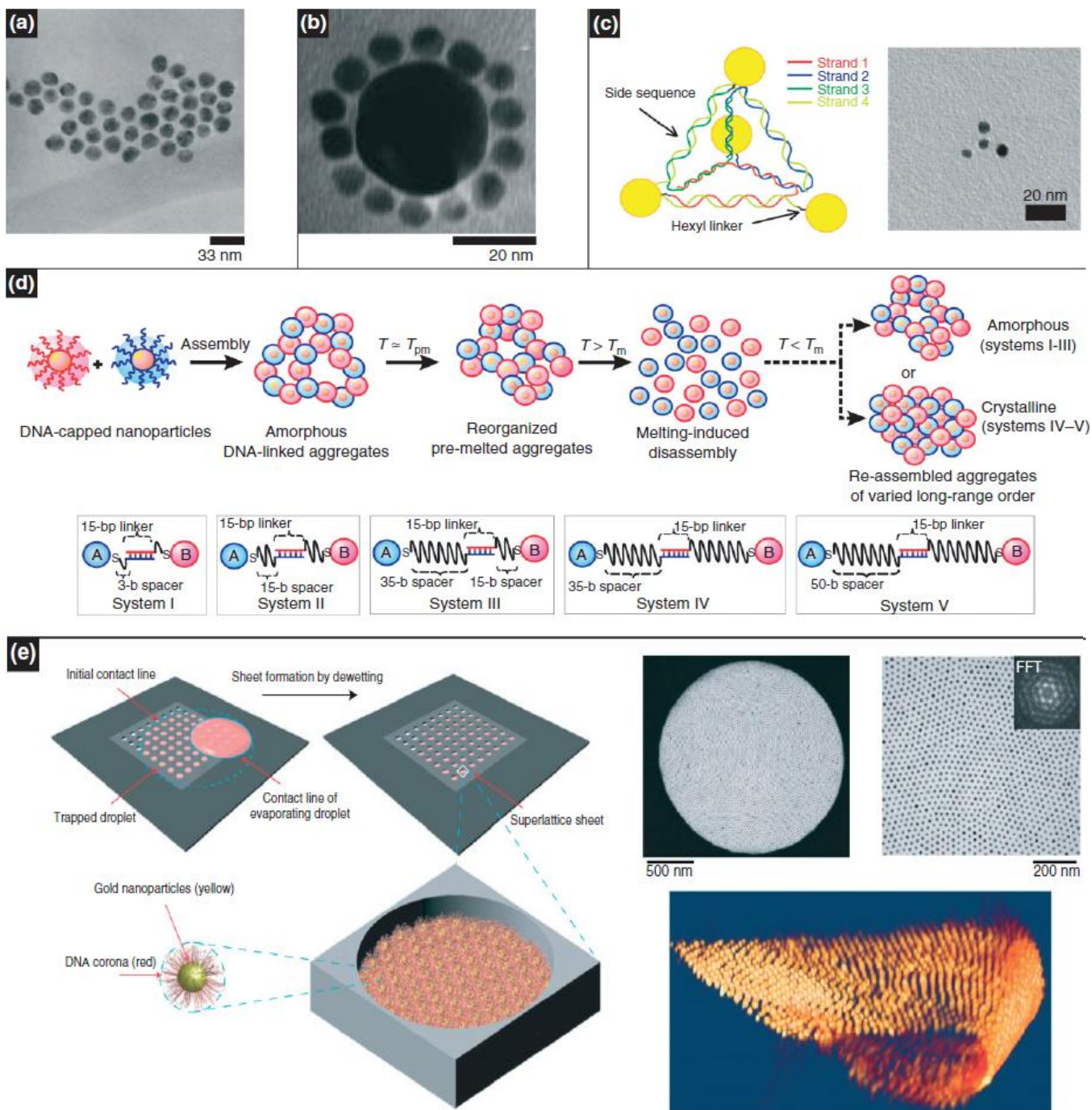
Μία ποικιλία τεχνικών που χρησιμοποιούν DNA δομές ως εκμαγεία έχουν εφαρμοστεί για τη διάταξη μακρομορίων. Ειδικά η ακριβής διάταξη πρωτεϊνών καθιστά δυνατή την εξέταση θεμελιωδών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, η οποία θα βοηθήσει στο μελλοντικό σχεδιασμό φαρμάκων και στη βιομοριακή διαγνωστική [74]. Ο Yan και οι συνεργάτες του [132] ήταν οι πρώτοι που παρουσίασαν την προγραμματιζόμενη συναρμολόγηση περιοδικών συστοιχιών πρωτεϊνών μέσω αυτοσυναρμολογούμενων DNA πλεγμάτων (*σχήμα 4.1(c)*). Με την ενσωμάτωση αλληλουχιών απταμερών που συνδέουν πρωτεΐνες (protein-binding aptamer sequences) και σε πλακίδια DX και σε DNA οριγκάμι, ο Chhabra και οι συντέταιροί του [133] παρουσίασαν μία εύκολη και πολλαπλών χρήσεων τεχνική για τη δημιουργία σαφώς καθορισμένων γραμμικών συστοιχιών πρωτεϊνών. Παρόμοιες προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί για τη δημιουργία αυστηρά διατεταγμένων συστοιχιών αντισωμάτων για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [134, 135] (*σχήμα 4.1(d)*). Ο Numajiri και οι συνεργάτες του [136] υπέδειξαν τη δυνατότητα του DNA οριγκάμι να σχηματίζει εκλεκτικά σύμπλοκα πρωτεΐνης-DNA. Στην περίπτωση αυτή, οι DNA οριγκάμι δομές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να έχουν σαφώς καθορισμένες κοιλότητες, οι οποίες κατέστησαν δυνατή την εκλεκτική βάσει μεγέθους δέσμευση της στρεπταβιδίνης.

4.2 Το DNA ως οδηγός για αυτοσυναρμολόγηση

Η συναρμολόγηση με οδηγό το DNA, σε αντίθεση με τα προκαθορισμένα ικρίωματα, βασίζεται στη συναρμολόγηση δομικών στοιχείων στη νανοκλίμακα σε πραγματικό χρόνο λόγω της ικανότητας μοριακής αναγνώρισης του DNA. Η επιτυχία τέτοιων στρατηγικών αυτοσυναρμολόγησης έχει οδηγήσει στη σημείωση μεγάλης προόδου στη βιομοριακή ανίχνευση (biomolecular sensing) και αναμένεται να διευκολύνει το σχεδιασμό καινοτόμων υλικών με ξεχωριστές οπτικές, μαγνητικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες [74]. Ο Mirkin και ο Alivisatos

ήταν οι πρώτοι που παρουσίασαν προγραμματιζόμενη συσσωμάτωση νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με DNA (DNA-capped AuNPs) [138-140] (**σχήμα 4.2 (a)**). Οι προγραμματιζόμενες αυτές στρατηγικές χρησιμοποιούνται έκτοτε για την ανάπτυξη «μορίων νανοσωματιδίων» [141, 142] (**σχήμα 4.2 (b)** και **(c)**), καθώς και τρισδιάστατων κρυστάλλων νανοσωματιδίων [143-145]. Ο Park και οι συνεργάτες του κατάφεραν να προγραμματίσουν συζεύγματα νανοσωματιδίων-DNA που συναρμολογήθηκαν σε διαφορετικές διατάξεις κρυσταλλικών πλεγμάτων, συμπεριλαμβανομένων συστημάτων με ένα δομικό στοιχείο και με πολλά δομικά στοιχεία, διαφοροποιώντας τους DNA συνδέτες (DNA linkers) (**σχήμα 4.2(d)**).

Εκτός από την ικανότητα προγραμματισμού, το DNA έχει χρησιμοποιηθεί και ως διαχωριστής γενικής χρήσης (generic spacer) για μεγάλης ακρίβειας διάταξη νανοσωματιδίων, χωρίς να είναι απαραίτητη η δημιουργία ζευγών βάσεων. Ο Yang, ο Campolongo και οι συνεργάτες τους παρουσίασαν το σχεδιασμό υπερ-πλεγμάτων νανοσωματιδίων (nanoparticle superlattices), ο οποίος βασιζόταν στην ελεγχόμενη ξήρανση ενός κολλοειδούς διαλύματος σε μία στερεή επιφάνεια με ένα «μικρο-κατασκευασμένο» αποτύπωμα (microfabricated stamp) [74, 147]. Η περαιτέρω ανάπτυξη αυτής της στρατηγικής συντέλεσε στο σχηματισμό ελεύθερων (free-standing) μεμβρανών νανοσωματιδίων εντός «μικρο-σχεδιασμένων» οπών μιας μεμβράνης νιτριδίου του πυριτίου [148] (**σχήμα 4.2 (e)**). Στην περίπτωση αυτή, φάνηκε ότι με απλή μεταβολή του μήκους του DNA συνδέτη (DNA ligand) μπόρεσε να ρυθμιστεί η διασωματιδιακή απόσταση, με αποτέλεσμα να μεταβληθούν οι μηχανικές και οπτικές ιδιότητες. Παρατηρήθηκε, επίσης, η τρισδιάστατη κρυστάλλωση αυτών των «μαλακών» νανοσωματιδίων σε πραγματικό χρόνο και επί τόπου (*in situ*) μέσω σκέδασης ακτίνων X υπό μικρές γωνίες (small-angle X-ray scattering) [149]. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν το σχηματισμό κρυσταλλινών κατά τη διάρκεια της εξάτμισης, οι οποίοι παρουσίαζαν μια συνέχεια στις αποστάσεις των πλεγμάτων. Φάνηκε, επιπλέον, ότι οι κρύσταλλοι μπορούσαν να διασταλούν και να συσταλούν με μεταβολή της υγρασίας.



Σχήμα 4.2: DNA νανοδομές που χρησιμοποιούνται ως οδηγοί για τη συναρμολόγηση δομικών στοιχείων στη νανοκλίμακα [74]. **(a, b)** Προγραμματιζόμενα DNA νανοσωματίδια που σχηματίζουν δίκτυα νανοσωματιδίων. **(c)** Διατάξεις νανοσωματιδίων που μοιάζουν με αυτές των μορίων. **(d)** Ο σχηματισμός άμορφων ή κρυσταλλικών συστημάτων μπορεί να ελεγχθεί προσαρμόζοντας κατάλληλα τους DNA διαχωριστές (DNA spacers). **(e)** Δισδιάστατα υπερ-πλέγματα νανοσωματιδίων (nanoparticle superlattices) που σχηματίστηκαν με εξάτμιση διαλύματος.

4.3 Διαγνωστική ιατρική (medical diagnostics)

Οι τεχνικές ιατρικής διάγνωσης χρησιμοποιούν σήματα για να ανιχνεύσουν και να ταυτοποιήσουν ασθένειες ή ιατρικές παθήσεις. Τις τελευταίες δεκαετίες, διάφορα νέα και καινοτόμα υλικά, όπως νανοσωματίδια, νανοσύρματα και κβαντικά στίγματα (QDs) έχουν ενσωματωθεί σε συμβατικά συστήματα διάγνωσης για να βελτιώσουν την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα και την πρακτικότητα των αναλύσεων [150]. Τα DNA υλικά κατέχουν μία μοναδική ικανότητα μοριακής αναγνώρισης, με αποτέλεσμα οι νανοδομές από DNA να χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές σε συστήματα ιατρικής διάγνωσης με τρομερή απόδοση [151].

Το DNA είναι ένα ελκυστικό υλικό για ανίχνευση όχι μόνο λόγω της εξαιρετικής του ικανότητας μοριακής αναγνώρισης, αλλά και λόγω της υψηλής φυσικοχημικής του σταθερότητας [74]. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να συντεθεί, να επεξεργαστεί και να αποθηκευτεί υπό ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και συνθηκών, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για την εφαρμογή των ιατρικών τεχνολογιών σε ευρεία κλίμακα. Επιπροσθέτως, η ικανότητα ελέγχου της αυτοσυναρμολόγησης μπορεί να οδηγήσει στην επίτευξη μεγάλης ενίσχυσης του σήματος και πραγματοποίησης πολλαπλών ανιχνεύσεων [117, 152]. Επιπλέον, χημικές τροποποιήσεις και τροποποιήσεις με τη χρήση ενζύμων προσδίδουν στο DNA την ικανότητα να συνδέεται με διάφορα λειτουργικά υλικά, όπως πρωτεΐνες και νανοσωματίδια.

Τα πρώτα υλικά με βάση το DNA που υποδείχθηκαν για εφαρμογή στη διαγνωστική ήταν συζεύγματα DNA-νανοσωματιδίων. Το σύστημα βασιζόταν, κυρίως, σε ένα έργο που αποτέλεσε ορόσημο στη συναρμολόγηση νανοσωματιδίων με τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια (oligonucleotide-modified nanoparticles), η οποία κατευθυνόταν από την υβριδοποίηση του DNA [74]. Μετά από αυτό, ο Mirkin μαζί με συνεργάτες του χρησιμοποίησε νανοσωματίδια χρυσού με τροποποιημένο DNA (DNA-modified AuNPs) για την ανάπτυξη μιας εξαιρετικά εκλεκτικής χρωματομετρικής τεχνικής ανίχνευσης DNA (colorimetric DNA detection technique). Στο σύστημα αυτό, το DNA-στόχος δρούσε ως γέφυρα υβριδοποίησης μεταξύ ολιγονουκλεοτιδίων

ακίνητοποιημένων στην επιφάνεια, προκαλώντας μεταβολή του χρώματος από κόκκινο σε μωβ λόγω σύζευξης των πλασμιδίων (plasmon coupling) των συσσωματωμάτων νανοσωματιδίων χρυσού που προέκυπταν [153, 154]. Έκτοτε, χρωματομετρικές μέθοδοι που βασίζονται σε συζεύγματα DNA-νανοσωματιδίων χρησιμοποιούνται σε διάφορα συστήματα ανίχνευσης, όπως σε συστήματα ανίχνευσης πρωτεϊνών [155], ιόντων υδραργύρου [156] και αλληλουχιών DNA [154].

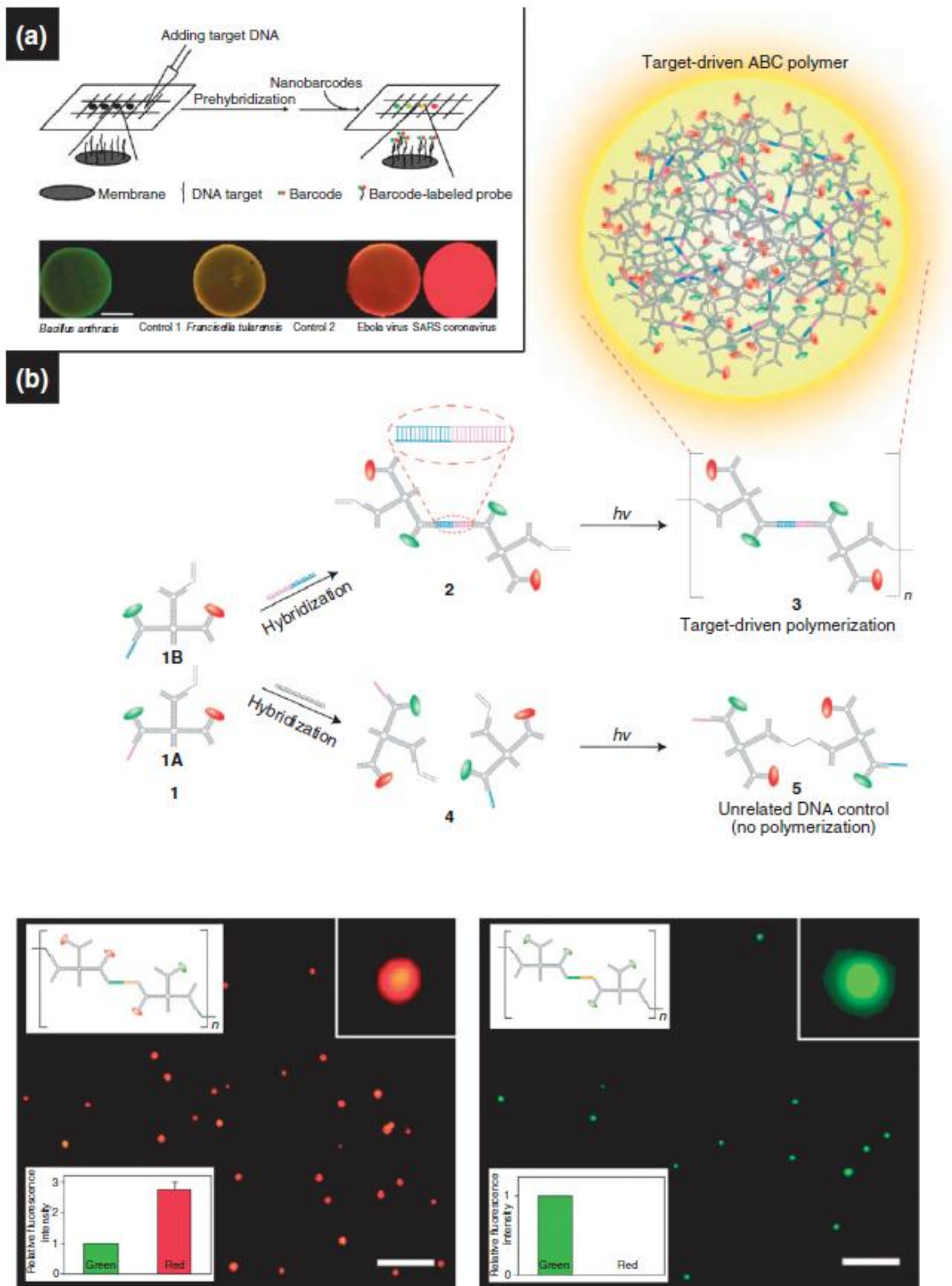
Η χρωματομετρική τεχνολογία προσέφερε μία απλή και οικονομική διαγνωστική μέθοδο. Επιπλέον, ήταν ικανή να ανιχνεύει στόχους με ευαισθησία στην κλίμακα των ζεπτο-moles (10^{-12} moles), χωρίς ενίσχυση του στόχου ή του σήματος [74]. Εκτός από τις μεταβολές του χρώματος στις διαγνωστικές μεθόδους που βασίζονται σε συζεύγματα DNA-νανοσωματιδίων, η ομάδα του Mirkin ανέπτυξε, επίσης, μια σειρά από στρατηγικές μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων της φασματοσκοπίας σκέδασης φωτός (light scattering spectroscopy), της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας (electrochemistry spectroscopy) και της φασματοσκοπίας Raman (Raman spectroscopy). Εκτός από τα νανοσωματίδια, έχουν εξεταστεί ως μοτίβα μεταγωγής σήματος και τα νανοσύρματα και οι νανοσωλήνες λόγω των μοναδικών ηλεκτρονικών ιδιοτήτων τους. Οι αναλύσεις αυτές βασίζονται σε μεταβολές στην αγωγιμότητα νανοσυρμάτων ή νανοσωλήνων με τροποποιημένο DNA μετά από υβριδοποίηση με το DNA-στόχο.

Η πολλαπλή ανίχνευση (multiplexed detection) είναι άκρως επιθυμητή στη διαγνωστική ιατρική. Η ομάδα του Mirkin ανέπτυξε μία ευρέως πλέον γνωστή μέθοδο που βασίζεται σε νανοσωματίδια, η οποία αποκαλείται «ανάλυση βιο-γραμμωτού κώδικα» (“bio-barcode assay”) για πολλαπλή ανίχνευση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων [155, 157, 158]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του DNA-στόχου να γεφυρώνει νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) και μαγνητικά μικροσωματίδια, καθένα από τα οποία είναι τροποποιημένα από μονούς κλώνους DNA που είναι συμπληρωματικοί σε αντίθετα άκρα του στόχου. Τα μαγνητικά μικροσωματίδια που έχουν συμπλοκοποιηθεί με το DNA-στόχο και με τα AuNPs συλλέγονται μέσω της εφαρμογής μαγνητικού πεδίου, αφήνοντας πίσω όλους τους αδέσμευτους ανιχνευτές που δεν ανίχνευσαν κανέναν στόχο

και, τελικά, ο DNA-στόχος απομονώνεται από τα συλλεγμένα νανοσωματίδια [74, 159].

Οι διακλαδούμενες DNA νανοδομές μπορούν κι αυτές να χρησιμοποιηθούν σε μεθόδους πολλαπλής διάγνωσης, καθώς διαθέτουν την ικανότητα να προσδίδουν συγκεκριμένες λειτουργικές δυνατότητες σε ξεχωριστές διακλαδώσεις, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ανισότροπες δομές. Ο Dan Luo, ο Yougen Li και οι συνεργάτες τους ανέπτυξαν DNA νανο-γραμμωτούς κώδικες (DNA nanobarcodes) για πολλαπλή ανίχνευση [152]. Πολύχρωμοι νανο-γραμμωτοί κώδικες κατασκευάστηκαν μέσω ακριβούς ελέγχου και των ειδών αλλά και των αριθμών των φθοριζόντων στοιχείων επισήμανσης. Οι DNA νανο-γραμμωτοί κώδικες κατέστησαν δυνατή την ταυτόχρονη ανίχνευση αρκετών διαφορετικών παθογόνων DNA. Οι ενδείξεις εξόδου θα μπορούσαν να ληφθούν μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (fluorescence microscopy), μέσω αποτύπωσης στίγματος (dot blotting), μέσω κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry) ή ακόμη και μέσω ψηφιακής κάμερας. Η ευαισθησία έφτασε στην κλίμακα των αττο-moles (10^{-18} moles) με έναν τρομερά μικρό χρόνο ανίχνευσης. Για παράδειγμα, στο **σχήμα 4.3(a)** φαίνονται τα αποτελέσματα νανο-γραμμωτών κωδίκων που χρησιμοποιήθηκαν στη διαγνωστική αποτύπωσης στίγματος [74]. Έξι δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων ελέγχου ενός 27-μερούς μονόκλωνου DNA με «άσχετες» αλληλουχίες και ενός πλασμιδιακού DNA μεγέθους 6,1 kb, αποτυπώθηκαν, αρχικά, σε μία μεμβράνη (membrane). Ακολούθως, πέντε είδη νανο-γραμμωτών κωδίκων υβριδοποιήθηκαν στον DNA-στόχο (DNA target) για ανίχνευση (**σχήμα 4.3(a), στο πάνω μέρος**). Η ταυτόχρονη ανίχνευση τεσσάρων χρωμάτων στην προκύπτουσα μεμβράνη υπέδειξε την ύπαρξη τεσσάρων DNA-στόχων (*Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Ebola virus*, και *SARS coronavirus*), οι οποίοι, ύστερα, ταυτοποιήθηκαν ανατρέχοντας σε μία βιβλιοθήκη αποκωδικοποίησης. Δεν ανιχνεύτηκε κανένα φθορίζων σήμα στα δύο στίγματα ελέγχου, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η ανίχνευση που βασίζεται σε νανο-γραμμωτούς κώδικες είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη (**σχήμα 4.3(a), στο κάτω μέρος**).

Η ίδια ομάδα ανέπτυξε μία στρατηγική καθοδηγούμενου από το στόχο πολυμερισμού (target-driven polymerization strategy) που βασίζεται σε



Σχήμα 4.3: (a) Νανο-γραμμωτοί κώδικες (nanobarcodes) και (b) Ένας καθοδηγούμενος από το στόχο πολυμερισμός (target-driven polymerization) μονομερών ABC, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε σε μια στρατηγική πολλαπλής ανίχνευσης [74].

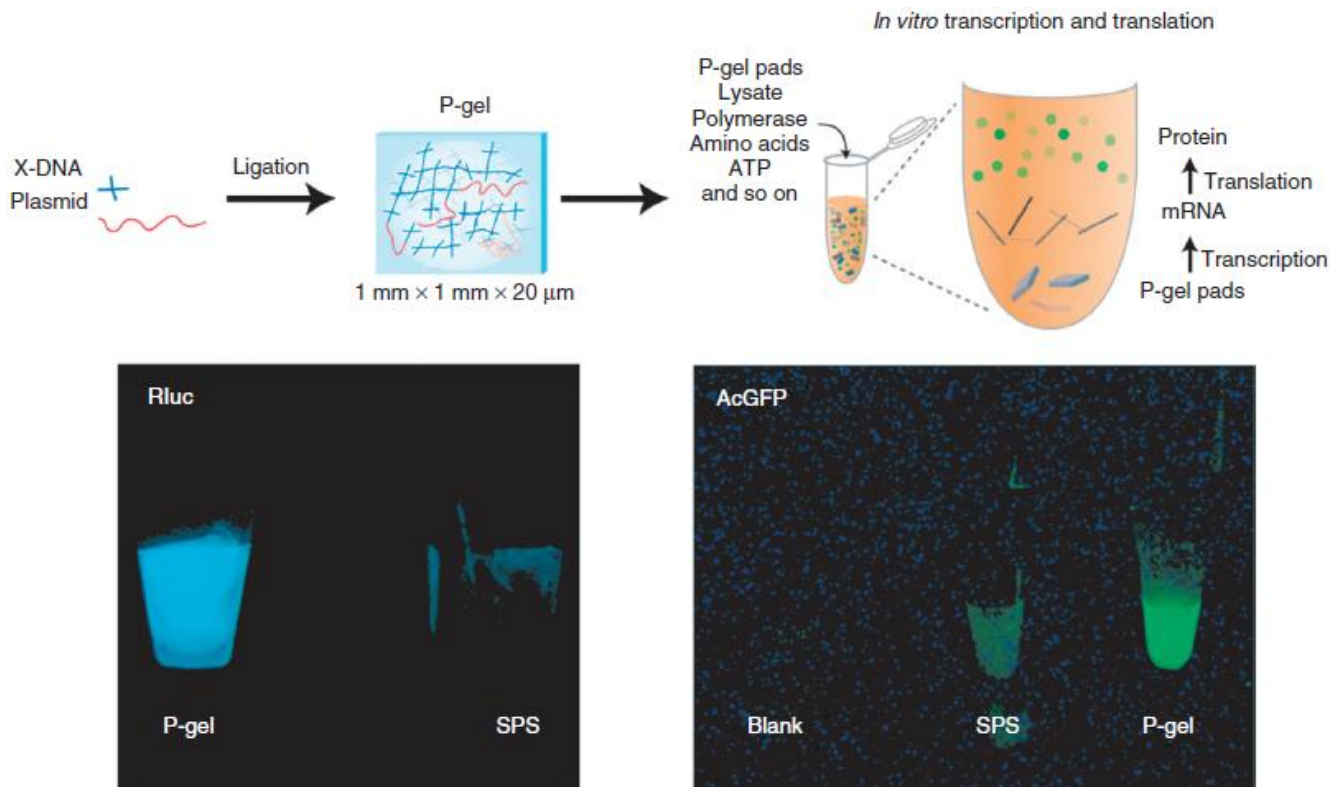
διακλαδούμενα μονομερή ABC (ABC monomers) από DNA [117]. Υπομονάδες μονομερών ABC επισημάνθηκαν με διάφορα τμήματα, συμπεριλαμβανομένων δύο κβαντικών σιγμάτων (QDs), μιας φωτοδιασταυρούμενης ομάδας (photocrosslinkable group) και ενός ανιχνευτή μονόκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου που ήταν συμπληρωματικός σε ένα συγκεκριμένο παθογόνο DNA (στο DNA HIV στην περίπτωση αυτή) (**σχήμα 4.3(b), στο πάνω μέρος**). Αυτά τα μονομερή ABC σχημάτιζαν διμερή μόνο παρουσία ενός συγκεκριμένου παθογόνου DNA, επειδή το παθογόνο DNA δρούσε ως συμπληρωματικό συνδετικό DNA (linker DNA). Με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος, τα διμερή αυτά πολυμερίστηκαν σε συσσωματώματα πολυμερών (σφαίρες πολυμερών), με διαμέτρους περίπου 400 nm (από το βήμα 1 στο βήμα 2 και μετά στο 3, όπως φαίνεται στο **πάνω μέρος του σχήματος 4.3 (b)**). Στην περίπτωση, όμως, που το παθογόνο DNA-στόχος απουσίαζε, δε λάμβανε χώρα πολυμερισμός (από το βήμα 1 στο βήμα 4 και μετά στο 5, όπως φαίνεται στο **πάνω μέρος του σχήματος 4.3 (b)**). Αυτός ο καθοδηγούμενος από το DNA-στόχο πολυμερισμός κατέστησε δυνατή την ταχεία ενίσχυση του σήματος για την ανίχνευση παθογόνων με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία. Στο **σχήμα 4.3(b)** φαίνονται οι εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού των παθογόνων DNA που ανιχνεύτηκαν: *B. anthracis* (αριστερά) και *Ebola* (δεξιά). Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι η συγκέντρωση των σφαιρών πολυμερούς ABC ήταν γραμμικά ανάλογη του λογαρίθμου της συγκέντρωσης του DNA-στόχου. Συνεπώς, η συγκέντρωση του παθογόνου DNA μπορούσε πολύ εύκολα να αναγνωστεί όταν παρουσιαζόταν σε διάγραμμα συναρτήσεως του αριθμού των σφαιρικών συσσωματωμάτων. Το όριο ανίχνευσης ήταν περίπου 100 fM (10^{-15} M).

4.4 Πήκτωμα DNA (DNA gel) ως ικρίωμα για παραγωγή πρωτεϊνών χωρίς κύτταρα

Η υψηλής απόδοσης παραγωγή πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την έκφραση και τροποποίηση των πρωτεϊνών. Τα παραδοσιακά συστήματα που βασίζονται σε ζώα ή σε κύτταρα για την παραγωγή πρωτεΐνης είναι, γενικά, ακριβά και χρονοβόρα. Επιπροσθέτως, πολλές πρωτεΐνες είναι δύσκολο να παραχθούν. Ως εναλλακτική λύση, συστήματα παραγωγής πρωτεϊνών που δεν περιλαμβάνουν

κύτταρα (cell-free protein production systems) μπορούν να ξεπεράσουν τις δυσκολίες που σχετίζονται με τα παραδοσιακά συστήματα που βασίζονται σε ζώα ή σε κύτταρα [74]. Τα συστήματα που δεν περιλαμβάνουν κύτταρα χρησιμοποιούν καθαρά εκχυλίσματα κυττάρων (λύματα) για τη μεταγραφή και μετάφραση του DNA, με αποτέλεσμα η παραγωγή πρωτεϊνών να είναι πιο απλή και πιο γρήγορη. Σχεδόν όλα τα συστήματα που δεν περιλαμβάνουν κύτταρα είναι συστήματα σε φάση διαλύματος (solution phase systems, SPS), στα οποία τα γονιδιακά εκμαγεία (gene templates) είναι διεσπαρμένα σε διάλυμα. Παρόλα αυτά, η τροποποίηση της μορφής των γονιδίων (η ενσωμάτωση του γονιδίου σε μεγαλύτερες δομές) είναι ένας εναλλακτικός τρόπος βελτίωσης της απόδοσης της παραγωγής.

Τα προσόντα του πηκτώματος DNA (DNA gel), όπως η ικανότητα προγραμματισμού και η βιοσυμβατότητα, το καθιστούν έναν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο ως κριώμα για βιοϊατρικές εφαρμογές και, ειδικότερα, για την παραγωγή πρωτεϊνών [74]. Ο Dan Luo, ο Yougen Li και οι συνεργάτες τους χρησιμοποίησαν υδροπήκτωμα DNA (DNA hydrogel) ως κριώμα για την παραγωγή πρωτεΐνης χωρίς τη χρησιμοποίηση κυττάρων (που αποκαλείται «P-gel»), με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεΐνης με 300 φορές μεγαλύτερη απόδοση από αυτή που επιτυγχάνεται με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα που δεν περιλαμβάνουν κύτταρα (*σχήμα 4.4*). Το πήκτωμα αποτελείται από X-DNA που έχει κολλώδη άκρα συμπληρωματικά των προεξοχών του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου. Ένα τέτοιο μοτίβο καθιστά δυνατό το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου και του DNA κριώματος. Τρεις ήταν οι μηχανισμοί που προτάθηκαν για την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής απόδοσης: πρώτον, το πλασμίδιο ενώνεται με το X-DNA, το οποίο προστατεύει τα γονίδια από την αποδόμηση και τη μετουσίωση, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε αυξημένη σταθερότητα και παρατεταμένη έκφραση. Δεύτερον, η τοπική συγκέντρωση γονιδίων στο P-gel είναι υψηλότερη από αυτή στο SPS. Τρίτον, λόγω του ότι τα γονιδιακά εκμαγεία είναι περιορισμένα, ο ρυθμός του κύκλου διακίνησης των ενζύμων (turnover rate) αυξάνεται και, κατά συνέπεια, αυξάνεται και ο ρυθμός παραγωγής πρωτεΐνης. Μέχρι στιγμής, αυτό το σύστημα P-gel έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή έκφραση πολλών δωδεκάδων διαφορετικών πρωτεϊνών,



Σχήμα 4.4: Υδροπήκτωμα DNA (DNA hydrogel) για παραγωγή πρωτεϊνών (“P-gel”) [74]. Το πλασμίδιο συνδέεται με μία μήτρα υδροπηκτώματος DNA και τα προκύπτοντα “P-gel pads”, όπως αποκαλούνται, τα οποία είναι εγκλεισμένα σε γονίδια (gene-encapsulated), προστίθενται σε ένα λύμα κυττάρων (εκχύλισμα κυττάρων, δηλαδή) για την έκφραση πρωτεϊνών. Η σύγκριση του P-gel με ένα σύστημα σε φάση διαλύματος (solution phase system) έδειξε μεγαλύτερη έκφραση δύο φθορίζουσών πρωτεϊνών από το P-gel.

συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών αναφοράς (reporter proteins), μεμβρανικών πρωτεϊνών (membrane proteins), κινασών και τοξικών πρωτεϊνών, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 16 έως 110 kDa. Όλες οι πρωτεΐνες ήταν λειτουργικές και η συνολική απόδοση παραγωγής τους έφτανε τα 5 mg/mL. Αναμένεται ότι το σύστημα P-gel θα βρει εφαρμογή στη μικρορρευστονική (microfluidics) – στον επιστημονικό, δηλαδή, κλάδο που ασχολείται με το σχεδιασμό, την κατασκευή και τις εφαρμογές συσκευών και διαδικασιών στις οποίες χρησιμοποιούνται όγκοι ρευστών στην περιοχή των 10^{-12} και 10^{-9} L – για παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα.

4.5 Νανομηχανικές συσκευές

Το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για την κατασκευή πολύπλοκων στατικών διατάξεων στη νανοκλίμακα ή ως εκμαγείο για τη σύνθεση νανοϋλικών, αλλά και για την παραγωγή μηχανικών κινήσεων. Το DNA είναι ένας τέλειος υποψήφιος για την κατασκευή νανομηχανικών συσκευών (nanomechanical devices) λόγω της εξειδίκευσης με την οποία σχηματίζονται τα ζεύγη βάσεων και των καταπληκτικών του φυσικοχημικών ιδιοτήτων [6]. Οι νανομηχανικές συσκευές με βάση το DNA μπορούν να ταξινομηθούν σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες [6, 14]. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι συσκευές που βασίζονται σε μεταβολές της δομής του DNA. Η πρώτη DNA συσκευή που κατασκευάστηκε, η οποία απεικονίζεται στο **σχήμα 4.5**, αποτελούταν από ένα κυκλικό μόριο με μία διάταξη σε σχήμα σταυρού

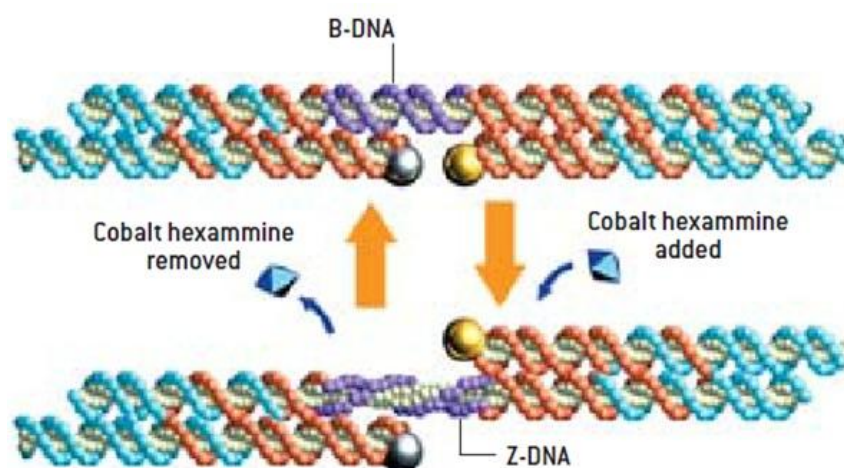


Σχήμα 4.5: Η πρώτη κινητή DNA συσκευή [12]. Η διάταξη στα αριστερά περιέχει τέσσερα κινητά ζεύγη βάσεων στη διακλάδωση του «σταυρού» που προεξέχει από τον κύκλο. Η προσθήκη ενός φαρμάκου παρεμβολής (intercalator) ξετυλίγει τον κύκλο, με αποτέλεσμα τα τέσσερα ζεύγη βάσεων να εισέρχονται στον κύκλο. Αφαίρεση του φαρμάκου παρεμβολής αντιστρέφει τη δράση της συσκευής.

(cruciform) που περιείχε τέσσερα κινητά (συμμετρικά) ζεύγη νουκλεοτιδίων [12]. Η προσθήκη ή η αφαίρεση ενός φαρμάκου παρεμβολής (intercalating drug), όπως το αιθίδιο (ethidium) –που δεσμεύεται ανάμεσα στις βάσεις με αποτέλεσμα να ξετυλίγει την έλικα– αλλάζει τη θέση του σημείου διακλάδωσης [14]. Στην περίπτωση απουσίας του φαρμάκου, τα τέσσερα κινητά ζεύγη νουκλεοτιδίων βρίσκονται στη διακλάδωση του «σταυρού» που προεξέχει από

τον κύκλο. Στην περίπτωση προσθήκης, όμως, του φαρμάκου, ο κύκλος «χαλαρώνει» και τα τέσσερα νουκλεοτίδια επανεισάγονται στον κύκλο. Η συσκευή αυτή δεν ήταν εύκολη στη χρήση, δεν είχε σαφώς καθορισμένη τρισδιάστατη δομή και δεν μπορούσε να ενσωματωθεί με ευκολία σε μία οργανωμένη DNA υπερδομή.

Η δεύτερη DNA συσκευή [53] έλυσε πολλά από τα παραπάνω προβλήματα. Βασιζόταν στη μετάβαση από το τυπικό δεξιόστροφο B-DNA στο αριστερόστροφο Z-DNA και αντίστροφα. Όπως έχει προαναφερθεί, το Z-DNA έχει δύο απαιτήσεις για να σχηματιστεί: μία κατάλληλη αλληλουχία και συνθήκες που προάγουν το σχηματισμό του. Εάν δεν ικανοποιείται οποιαδήποτε από τις δύο αυτές απαιτήσεις, το DNA παραμένει στη B μορφή. Η ανάγκη για μία ειδική αλληλουχία παρέχει στους νανοτεχνολόγους τη δυνατότητα ελέγχου της μετάβασης στο χώρο (δηλαδή, πού ακριβώς θα συμβεί) και η ανάγκη για συνθήκες που προάγουν το σχηματισμό του Z-DNA παρέχει στους νανοτεχνολόγους τη δυνατότητα ελέγχου της μετάβασης στο χρόνο (δηλαδή, πότε θα συμβεί) [14]. Όπως φαίνεται στο [σχήμα 4.6](#), η εν λόγω συσκευή



Σχήμα 4.6: Μία DNA νανομηχανική συσκευή που βασίζεται στη μετάβαση $B \leftrightarrow Z$ [1, 12]. Η συσκευή αποτελείται από δύο μόρια DX συνδεδεμένα με έναν άξονα (shaft) που περιέχει 20 ζεύγη νουκλεοτιδίων (μωβ), τα οποία μπορούν να υπόκεινται στη μετάβαση $B \leftrightarrow Z$. Υπό συνθήκες που προάγουν την B κατάσταση, οι μικρές περιοχές βρίσκονται στην ίδια πλευρά του άξονα, αλλά υπό συνθήκες που προάγουν τη Z κατάσταση [παρουσία $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (cobalt hexamine)],

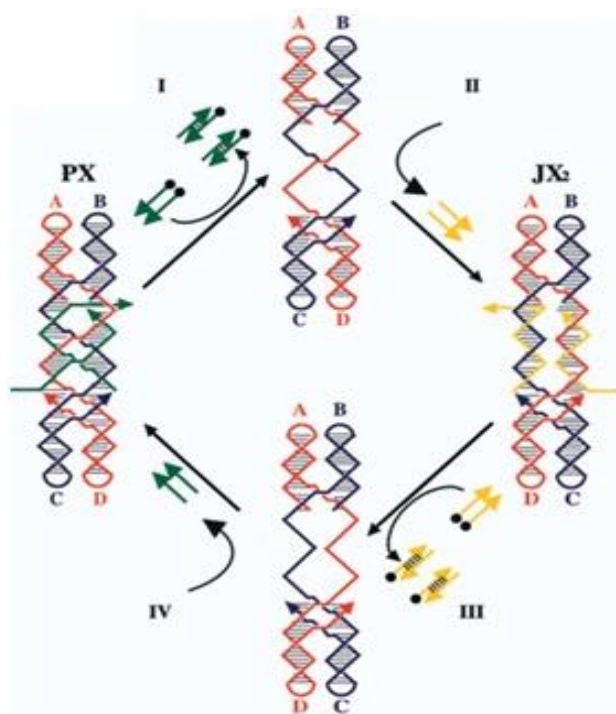
βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του άξονα. Το γκρι και κίτρινο ζεύγος χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της αλλαγής αυτής μέσω της τεχνικής μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (FRET).

αποτελείται από δύο μόρια DX συνδεδεμένα με έναν άξονα (shaft). Τα μωβ νουκλεοτίδια στον άξονα αντιπροσωπεύουν 20 ζεύγη νουκλεοτιδίων που είναι ικανά να υπόκεινται στη μετάβαση B \leftrightarrow Z. Απουσία συνθηκών που προάγουν τη μετάβαση του DNA από την B στη Z μορφή, τα νουκλεοτίδια αυτά βρίσκονται στην B κατάσταση, όπως φαίνεται στο πάνω μέρος του σχήματος, και αμφότερες οι περιοχές που δεν είναι συνδεδεμένες με τον άξονα βρίσκονται στην ίδια πλευρά του τελευταίου. Η προσθήκη του Co(NH₃)₆³⁺, όμως, προκαλεί τη μετάβασή τους στην Z κατάσταση και αυτό, με τη σειρά του, προκαλεί την περιστροφή μιας μη συνδεδεμένης περιοχής ενός μορίου DX στην άλλη πλευρά του άξονα [12, 14]. Η μετάβαση B \leftrightarrow Z υποδεικνύεται από ένα ζεύγος χρωστικών, με τη χρήση της τεχνικής μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (FRET).

Το πρόβλημα των συσκευών που βασίζονται σε δομικές μεταβολές του DNA είναι ότι ενεργοποιούνται από ένα μοναδικό μοριακό είδος και δεν μπορούν να λειτουργήσουν από μόνες τους [14]. Έχουν κατασκευαστεί κάποιες συσκευές που αξιοποιούν μία μετάβαση μεταξύ του B-DNA και τετραδικών δομών G₄ [56-58] ή που βασίζονται στο pH [59], αλλά οι συσκευές αυτές παρουσιάζουν το ίδιο πρόβλημα. Την επανάσταση στον τομέα αυτό έφερε ο Yurke [60], ο οποίος μαζί με τους συνεργάτες του ανέπτυξε μία συσκευή εξαρτώμενη από την αλληλουχία βάσεων (sequence-dependent device), η οποία αποτελούταν από «λαβίδες» DNA (DNA tweezers), οι οποίες συστέλλονταν με την προσθήκη ενός συγκεκριμένου κλώνου στο διάλυμα και όταν ο κλώνος αφαιρούταν, διαστέλλονταν. Η αφαίρεση του κλώνου επιτυγχανόταν μέσω προσθήκης ενός μικρού, ασύζευκτου τμήματος (που ονομάζεται «toehold») στο άκρο του. Η προσθήκη ολόκληρης της συμπληρωματικής διακλάδωσης αυτού του κλώνου είχε ως αποτέλεσμα τη σύνδεσή της πρώτα με το ασύζευκτο τμήμα (toehold) και, έπειτα, τη μετακίνησή της διαμέσου της δομής έως ότου όλος ο κλώνος να είναι σε διπλή μορφή. Δυστυχώς, η έξυπνη αυτή συσκευή δεν ήταν ανθεκτική

(robust). Κατά τη διάρκεια των μεταβάσεων, παράγονταν διμερή και άλλα πολυμερή. Πολλές είναι οι συσκευές που έχουν κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας αυτήν την προσέγγιση, συμπεριλαμβανομένων ενός περιπατητήρα με δύο «πετάλια» (bipedal walker) [61] και μιας συσκευής ελεγχόμενης από τη μεταγραφή (transcriptionally controlled device) [62].

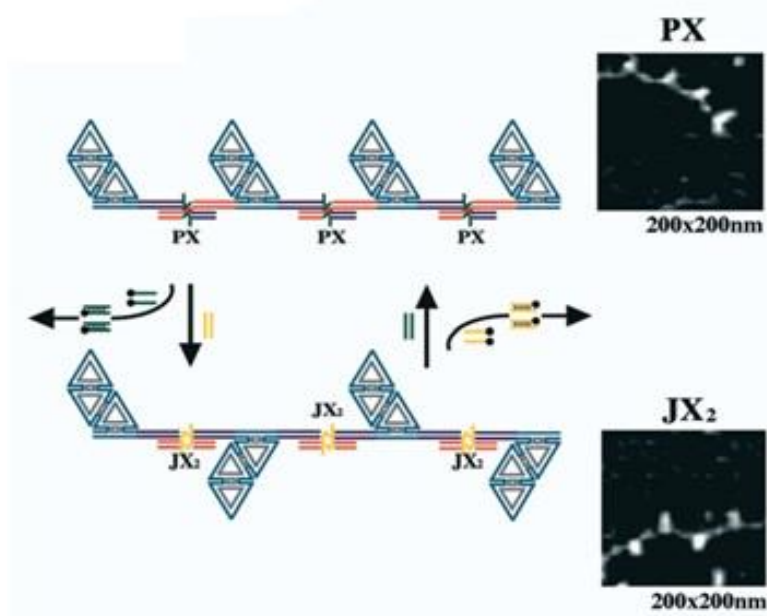
Η πρώτη ανθεκτική συσκευή που βασίζεται σε αυτήν την αρχή [54] απεικονίζεται στο **σχήμα 4.7**. Πρόκειται για μία συσκευή δύο καταστάσεων (two-state device) που βασίζεται στην αλληλομετατροπή των μοτίβων PX και JX₂ [12]. Τα μοτίβα PX



Σχήμα 4.7: Ο κύκλος μιας συσκευής PX-JX₂ [14]. Ξεκινώντας με τη δομή PX στα αριστερά, οι πράσινοι κλώνοι αφαιρούνται από τους συμπληρωματικούς τους (διεργασία I), οδηγώντας σε έναν ελλειπώς δομημένο σκελετό. Η προσθήκη των κίτρινων κλώνων (διεργασία II) μετατρέπει το σκελετό στη δομή JX₂, στην οποία οι πάνω και κάτω περιοχές είναι περιστρεμμένες κατά μισή στροφή σε σχέση με τη διάταξή τους στη διαμόρφωση PX. Οι διεργασίες III και IV αντιστρέφουν τη διεργασία αυτή και επαναφέρουν τη δομή PX.

και JX₂ διαφέρουν κατά μία ημιστροφή, οπότε η αλληλομετατροπή μεταξύ των δύο μοτίβων περιστρέφει τα άκρα της συσκευής κατά μισή στροφή. Η συσκευή

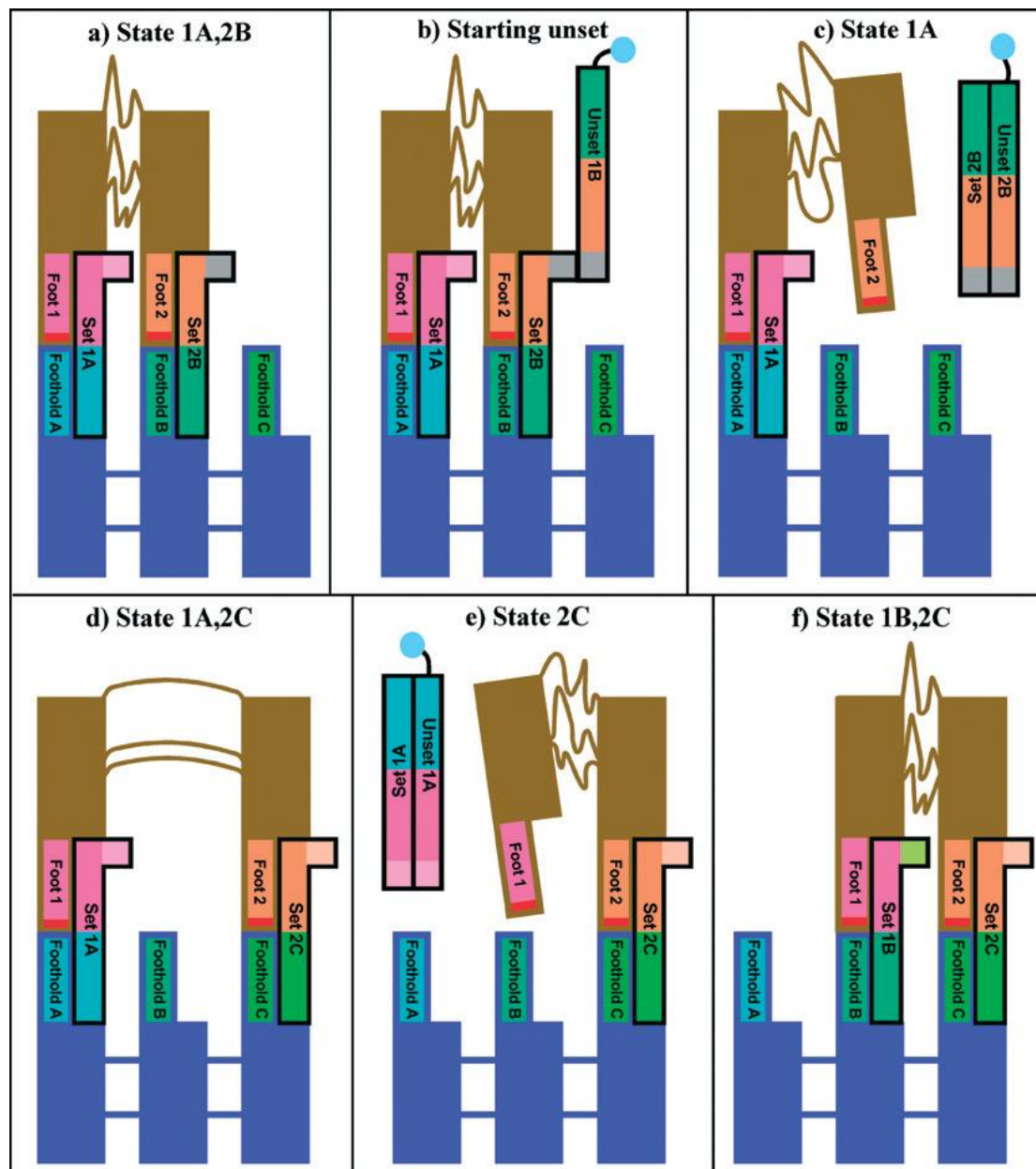
αποτελείται από έναν σκελετό στον οποίο ένας από τους κοκκινο-μπλε κλώνους έχει διακοπεί και αντικατασταθεί από έναν πράσινο «ενεργό» (“set”) κλώνο. Η παραλλαγή αυτού του μέρους του σκελετού οδηγεί σε αναρίθμητες συσκευές, καθεμία από τις οποίες ελέγχεται από τους δικούς της «ενεργούς» κλώνους. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.7, ο κύκλος της μηχανής έχει ως εξής: Ξεκινώντας από την κατάσταση PX, η προσθήκη ολόκληρων των συμπληρωματικών κλώνων των πράσινων «ενεργών» κλώνων έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση των τελευταίων από το σύμπλεγμα PX, η οποία με τη σειρά της, καθιστά τον σκελετό ελλειπώς δομημένο. Οι μαύρες τελείες στους συμπληρωματικούς κλώνους αντιπροσωπεύουν ομάδες βιοτίνης, επομένως, οι «ενεργοί» κλώνοι και οι συμπληρωματικοί τους μπορούν να αφαιρεθούν από το διάλυμα με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Η προσθήκη των κίτρινων «ενεργών» κλώνων μετατρέπει το σκελετό στη δομή JX₂. Η προσθήκη των συμπληρωματικών κλώνων των κίτρινων «ενεργών» κλώνων παράγει ξανά το σκελετό και η προσθήκη των πράσινων «ενεργών» κλώνων επαναφέρει την κατάσταση PX. Στο [σχήμα 4.8](#) φαίνεται ότι το σύστημα αυτό μπορεί όντως να κάνει δουλειά, περιστρέφοντας έναν δείκτη



Σχήμα 4.8: Επίδειξη της λειτουργίας της συσκευής PX-JX₂ μέσω του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM) [14]. Μια σειρά από DNA τραπεζοειδή είναι συνδεδεμένα με συσκευές PX-JX₂. Στην κατάσταση PX, τα τραπεζοειδή βρίσκονται σε παράλληλη διάταξη, αλλά όταν το σύστημα μετατρέπεται στην κατάσταση JX₂, βρίσκονται σε ζιγκ-ζαγκ διάταξη.

ορατό στο μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM) [14]. Στην κατάσταση PX , όλοι οι δείκτες βρίσκονται στην ίδια πλευρά μιας μονοδιάστατης συστοιχίας, αλλά στην κατάσταση JX_2 , οι δείκτες αυτοί εναλλάσσονται.

Η ίδια προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή μιας συσκευής που περπατάει σε έναν διάδρομο [14]. Στο **σχήμα 4.9** φαίνεται ότι η συσκευή αυτή



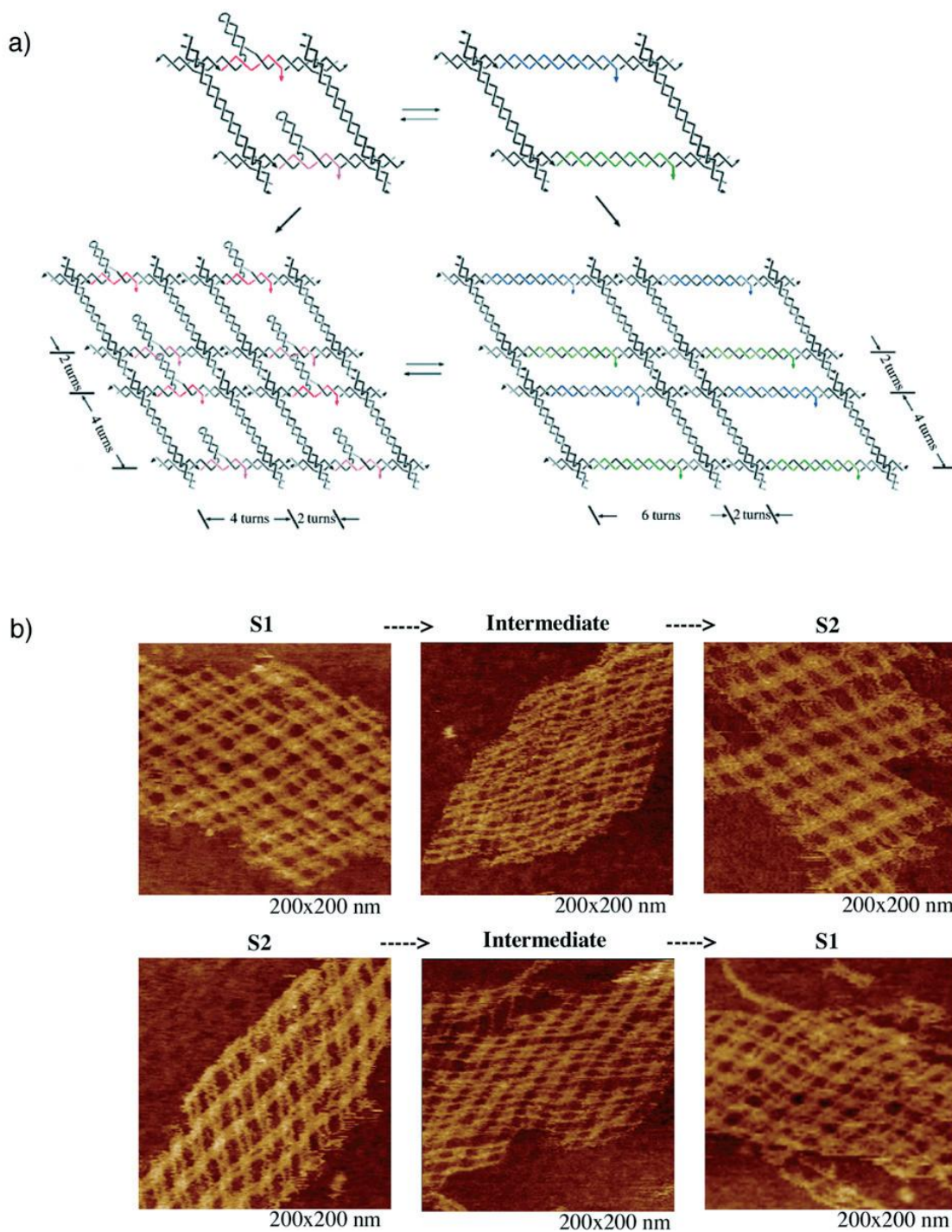
Σχήμα 4.9: Μία DNA συσκευή που περπατάει σε έναν διάδρομο [14]. Οι καταστάσεις από τις οποίες διέρχεται διαδοχικά το σύστημα φαίνονται στα τμήματα α)-f) του σχήματος. Τα όμοια χρώματα υποδεικνύουν συμπληρωματικές

αλληλουχίες μεταξύ κλώνων. Το κόκκινο τμήμα στην άκρη κάθε ποδιού αντιπροσωπεύει το ψωραλένιο, το οποίο χρησιμεύει στην πραγματοποίηση αναλύσεων. **(a)** Αρχική κατάσταση του περιπατητήρα. Τα πόδια 1 και 2 είναι συνδεδεμένα με το διάδρομο μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών υδρογόνου. **(b)** και **(c)** Αφαίρεση της σύνδεσης του ποδιού 2. Το «ανενεργό» σύμπλοκο (“unset” complex) αφαιρείται από το διάλυμα μέσω μιας ομάδας βιοτίνης (που αναπαρίσταται ως ένας γαλάζιος κύκλος) που είναι συνδεδεμένη με τον ανενεργό κλώνο. **(d)** Επανασύνδεση του ποδιού 2 στο διάδρομο σε μία νέα θέση. **(e)** Αποδέσμευση του ποδιού 1. **(f)** Επανασύνδεση του ποδιού 1 σε μία νέα θέση. Στο σημείο αυτό, η συσκευή έχει κάνει ένα ολόκληρο βήμα.

αποτελείται από δύο πόδια διπλής έλικας που είναι συνδεδεμένα το ένα με το άλλο μέσω ενός εύκαμπτου συνδέτη (linker). Είναι συνδεδεμένη με το διάδρομο μέσω ενεργών κλώνων, οι οποίοι τη συγκρατούν στη θέση της μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών υδρογόνου. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.9, η αφαίρεση ενός ενεργού κλώνου από τον συμπληρωματικό του «ανενεργό» (“unset”) κλώνο απελευθερώνει ένα πόδι, το οποίο μπορεί έπειτα να δεσμευτεί σε μία διαφορετική θέση από έναν διαφορετικό ενεργό κλώνο. Η ίδια μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποδεσμευτεί το άλλο πόδι και, ύστερα, να συνδεθεί και αυτό στο διάδρομο σε μία νέα θέση. Η συσκευή αυτή είναι δυνατόν να μετακινηθεί και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η απόδειξη της κίνησης γίνεται διασταυρώνοντας τα πόδια σε γνωστά κλάσματα του διαλύματος σε κάθε σημείο κατά μήκος της διαδρομής και εξετάζοντάς τα, στη συνέχεια, σε μία αποδιατακτική πηκτή (denaturing gel), η οποία θα εμφανίσει ζώνες που αντιστοιχούν στα διασταυρούμενα είδη [61].

Ένα συναρπαστικό υβρίδιο μιας συσκευής και ενός δισδιάστατου πλέγματος αναπτύχθηκε από τον Yan, τον Reif και τους συναδέλφους τους [63]. Όπως φαίνεται στο **σχήμα 4.10(a)**, κατασκευάστηκε ένα πλέγμα σε σχήμα παραλληλογράμμου που περιέχει έναν βρόχο σχήματος φουρκέτας. Μπορεί να αφαιρεθεί ένας κλώνος από τη βάση του βρόχου αυτού και να προστεθεί ένας κλώνος συμπληρωματικός ολόκληρου του βρόχου και της βάσης. Αυτό διευρύνει τις διαστάσεις του πλέγματος προς μία κατεύθυνση από τέσσερις στροφές σε

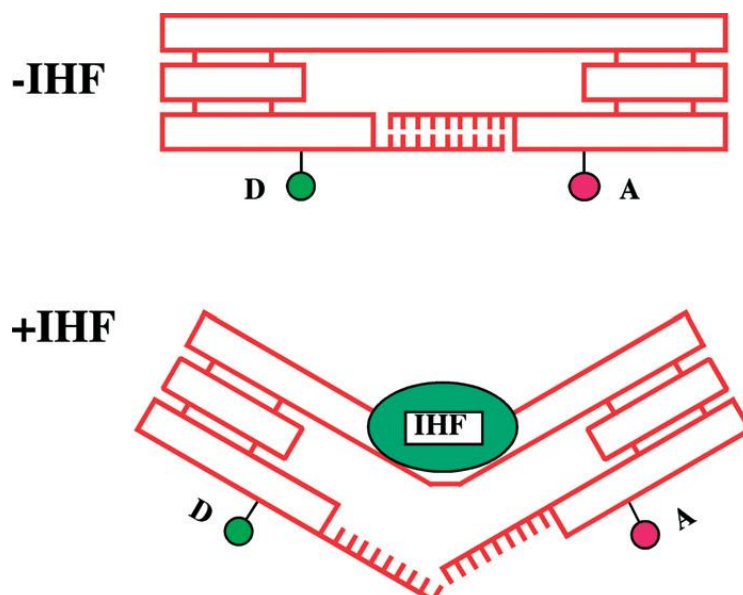
έξι στροφές. Τα «αποδεικτικά στοιχεία» που φαίνονται στο **σχήμα 4.10(b)** και που προκύπτουν από εξέταση με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM) υποδεικνύουν ότι η προσέγγιση αυτή θα μπορεί, τελικά, να χρησιμοποιείται για τη μεταβολή των διαστάσεων κρυσταλλικών δειγμάτων.



Σχήμα 4.10: Δισδιάστατη συστοιχία ικανή να μεταβάλλει τις διαστάσεις της κοιλότητας [14]. (a) Τα πλακίδια (tiles) και η ενσωμάτωσή τους σε συστοιχίες. Οι

κόκκινοι και οι μωβ «ενεργοί» κλώνοι (“set” strands) αντιστοιχούν σε μία συνεσταλμένη κατάσταση, ενώ οι μπλε και οι πράσινοι κλώνοι αντιστοιχούν στη διευρυμένη κατάσταση. **(b)** Εικόνες από μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM), στις οποίες αποτυπώνεται η προαναφερθείσα μεταβολή. Η προηγούμενη κατάσταση (αριστερά), η μεταβατική κατάσταση (στο κέντρο) και η μετέπειτα κατάσταση (δεξιά) της συστοιχίας απεικονίζονται προς αμφότερες τις κατευθύνσεις.

Μία τρίτη μορφή συσκευής είναι η ενεργοποίηση μιας μετάβασης του DNA από μία πρωτεΐνη. Αυτό είναι ό,τι πιο κοντινό υπάρχει σε ένα φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στην πραγματικότητα σε ένα ζωντανό κύτταρο. Αυτό το είδος συσκευής είναι εξαρτώμενο από κάποια αλληλουχία (sequence-dependent), αλλά είναι απαραίτητη μια νέα πρωτεΐνη για κάθε διαφορετική μετάβαση, με αποτέλεσμα η προσέγγιση να είναι λιγότερο βολική και λιγότερο γενικευμένη. Έχει κατασκευαστεί μία συσκευή αυτού του τύπου σε ένα πλαίσιο παρόμοιο με αυτό της συσκευής B-Z. Το τμήμα της συσκευής το οποίο προήγαγε το σχηματισμό της Z μορφής αντικαταστάθηκε από τη θέση πρόσδεσης μιας



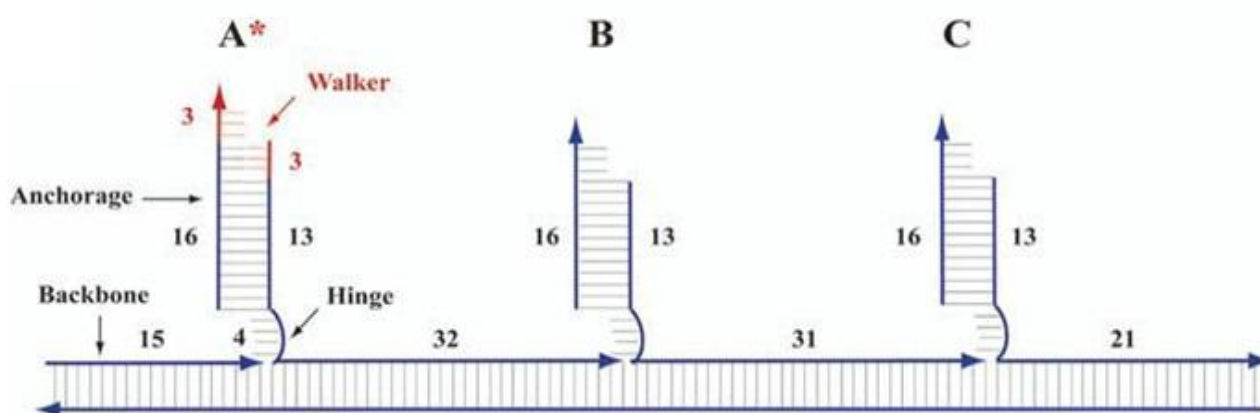
Σχήμα 4.11: Μια νανομηχανική συσκευή στην οποία ενεργοποιείται μια μετάβαση του DNA από μία πρωτεΐνη [14]. Το DNA σε μορφή διπλής έλικας

αναπαρίσταται ως ορθογώνια κουτιά. Τα μοτίβα TX αναπαρίστανται ως τρία συγχωνευμένα ορθογώνια κουτιά. Η επάνω περιοχή συνδέει τα δύο μοτίβα TX με τη θέση πρόσδεσης του IHF. Το IHF φαίνεται ως μία σκιασμένη έλλειψη και στο κάτω μέρος του σχήματος φαίνεται ότι η πρόσδεσή του παραμορφώνει τον συνδετικό άξονα. Στο πάνω μέρος του σχήματος, οι κατώτερες περιοχές TX συγκρατούνται μεταξύ τους με ένα κολλώδες άκρο. Στο κάτω μέρος του σχήματος, οι περιοχές αυτές αποσυνδέονται από την πρόσδεση της πρωτεΐνης. Μεταβάλλοντας την αντοχή του κολλώδους άκρου, εκτιμάται η ποσότητα της δουλειάς που μπορεί να κάνει η πρωτεΐνη μετά την πρόσδεσή της.

πρωτεΐνης που προσδένεται στο DNA (DNA-binding protein) [64], η οποία είναι γνωστή ως «παράγοντας ενσωμάτωσης στον ξενιστή» (integration host factor, IHF). Η σύνδεση του IHF στο DNA παρακολουθούταν μέσω της τεχνικής μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό φθορισμού (FRET), όπως γινόταν και στην περίπτωση της συσκευής B-Z. Το ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της συσκευής αυτής ήταν ότι χρησιμοποιούταν για τη μέτρηση της ποσότητας της δουλειάς που μπορούσε να κάνει η πρωτεΐνη μετά τη σύνδεσή της. Όπως φαίνεται στο **σχήμα 4.11**, η πρωτεΐνη έπρεπε να διασπάσει έναν αριθμό ζευγών βάσεων προκειμένου να συνδεθεί. Ογκομετρώντας τον αριθμό και το είδος των αλληλεπιδράσεων, μπόρεσε να εκτιμηθεί ότι η πρωτεΐνη είναι ικανή να κάνει $7-8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ δουλειάς όταν προσδένεται στο DNA.

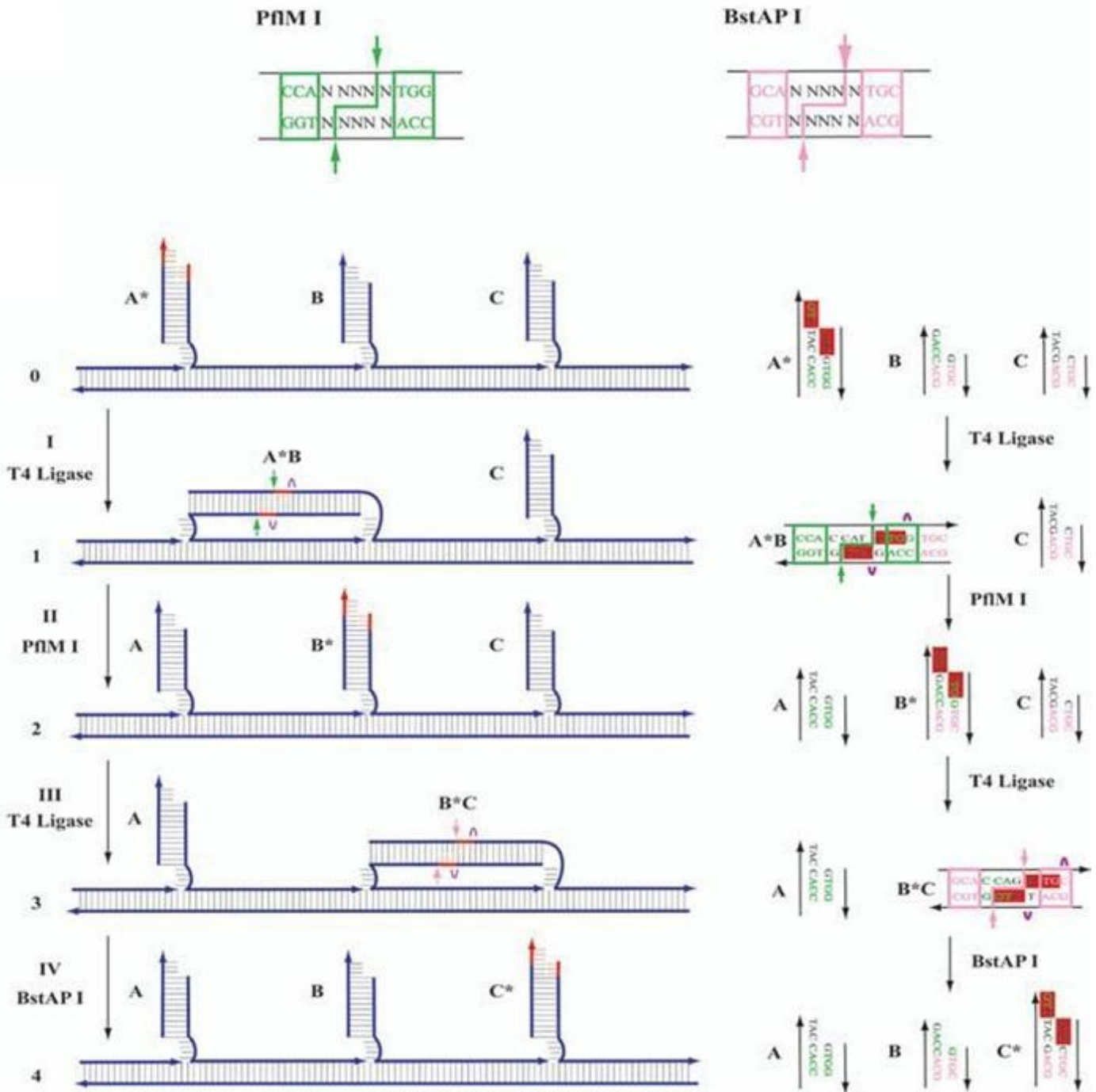
Οι DNA συσκευές που περιγράφηκαν παραπάνω δε λειτουργούν αυτόνομα, αλλά απαιτούν κάποιο είδος εξωτερικού ερεθίσματος σε κάθε κύκλο της συσκευής. Οι περισσότερες μοριακές μηχανές που εκτελούν κυτταρικές λειτουργίες στο ανθρώπινο σώμα είναι αυτόνομες και σε πολλές περιπτώσεις, μονοκατευθυντικές. Για το λόγο αυτό, η κατασκευή τέτοιων αυτόνομων μονοκατευθυντικών συσκευών σε τεχνητά συστήματα είναι άκρως ελκυστική και πολλά υποσχόμενη. Μία από τις πρώτες αυτόνομες συσκευές, κατασκευάστηκε από τον Mao και τους συναδέλφους του [65], οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα DNA ένζυμο, ένα μόριο DNA, δηλαδή, που προσδένεται σε μία συγκεκριμένη μικρή αλληλουχία RNA και έπειτα καταλύει τη διάσπασή της.

Η πρώτη αυτόνομη μονοκατευθυντική DNA συσκευή που περπατάει σε ένα «μονοπάτι» από DNA φαίνεται στα **σχήματα 4.12** και **4.13**. Η συσκευή αυτή δεν απαιτεί καμία εξωτερική παρέμβαση· η απαιτούμενη για τη λειτουργία της ενέργεια παρέχεται από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που έχει καταναλωθεί από τη λιγάση T_4 (T_4 ligase) [6]. Αρχικά, αυτοσυναρμολογήθηκε μία γραμμική DNA νανοδομή (ο «δρόμος») με μία σειρά από συνδεδεμένους μονούς κλώνους DNA (τα «βήματα»), όπως φαίνεται στο **σχήμα 4.12** [10]. Ένα τμήμα έλικας DNA σταθερού μήκους (ο «περιπατητήρας») με μικρά κολλώδη άκρα (τα «πόδια» του) συναρμολογήθηκε στο ένα άκρο του



Σχήμα 4.12: Μία αυτόνομη αυτοσυναρμολογούμενη από το DNA συσκευή που περπατάει [6, 010]. Η συσκευή αποτελείται από δύο μέρη: το «δρόμο» και τον περιπατητήρα (walker). Ο δρόμος αποτελείται από τρία στηρίγματα (anchorages) από διπλό DNA σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους, τα A, B και C, καθένα από τα οποία είναι συνδεδεμένο με τη ραχοκοκαλιά (backbone) διαμέσου μιας άρθρωσης (hinge), ενός εύκαμπτου, δηλαδή, τμήματος μονόκλωνου DNA με τέσσερα νουκλεοτίδια. Ο περιπατητήρας είναι ένα τμήμα DNA με έξι νουκλεοτίδια (που φαίνεται με κόκκινο χρώμα και υποδεικνύεται με το σύμβολο «*»), που είναι αρχικά τοποθετημένος στο στηρίγμα A. Οι αριθμοί δίνουν το μήκος των τμημάτων DNA, σε βάσεις.

δρόμου, με τα πόδια του περιπατητήρα να είναι υβριδοποιημένα στα δύο πρώτα βήματα του δρόμου. Έπειτα, όπως απεικονίζεται στο **σχήμα 4.13**, ο περιπατητήρας ξεκίνησε να προχωράει με διαδοχικές κινήσεις κατά μήκος του δρόμου. Στην αρχή κάθε βήματος, τα πόδια του περιπατητήρα είναι



Σχήμα 4.13: Μία αυτόνομη αυτοσυναρμολογούμενη από το DNA συσκευή που περπατάει [6, 10]. Στο πάνω μέρος του σχήματος: Οι θέσεις αναγνώρισης (recognition sites) και οι δομές περιορισμού (restriction patterns) των PfuI και BstAP I. Οι βάσεις που είναι σημαντικές για την αναγνώριση των PfuI και BstAP I φαίνονται με έντονο πράσινο χρώμα και με ροζ χρώμα, αντίστοιχα. Το «N» υποδεικνύει τη θέση μιας βάσης που δεν επηρεάζει την αναγνώριση. Στο κάτω μέρος του σχήματος: Η λειτουργία της συσκευής. Στο αριστερό τμήμα

φαίνονται οι διαδοχικές δομικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της λειτουργίας της συσκευής. Στο δεξί τμήμα περιγράφονται οι συνοδευτικές δράσεις των ενζύμων και φαίνεται πώς αυτές επηρεάζουν τα άκρα των στηριγμάτων. Στο τμήμα του σχήματος που φέρει στα αριστερά του τον αριθμό «0» αναπαρίσταται η συσκευή στην αρχική της κατάσταση.

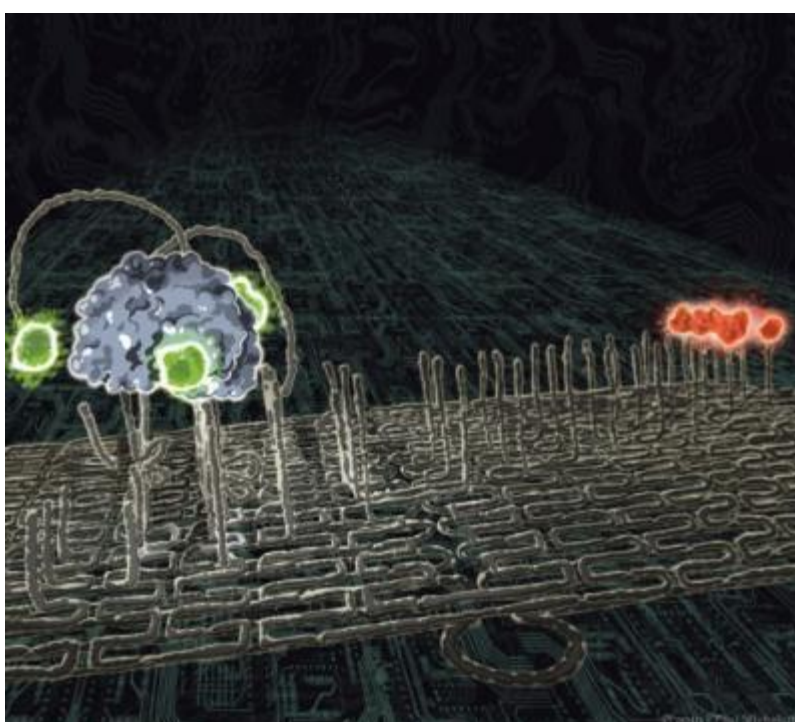
υβριδοποιημένα σε δύο επακόλουθα βήματα του δρόμου. Ακολούθως, ένα περιοριστικό ένζυμο κόβει την έλικα του DNA στο σημείο όπου είναι συνδεδεμένο το πίσω πόδι, αφήνοντας εκτεθειμένο ένα νέο κολλώδες άκρο που σχηματίζει ένα νέο πόδι, το οποίο μπορεί να υβριδοποιηθεί στο επόμενο βήμα που είναι ελεύθερο, που μπορεί να είναι το βήμα αμέσως μετά το βήμα στο οποίο είναι συνδεδεμένο το άλλο πόδι. Ένα περίπλοκο συνδυαστικό σχέδιο των αλληλουχιών από τις οποίες αποτελούνται τα βήματα και ο περιπατητήρας διασφαλίζει ότι η κίνηση κατά μήκος του δρόμου είναι μονοκατευθυντική.

Μία από τις πιο πρόσφατες κατασκευές είναι ένα μοριακό ρομπότ από DNA, μήκους μόλις τεσσάρων νανομέτρων, το οποίο μπορεί να περπατά σαν αράχνη κατά μήκος μιας τροχιάς που αποτελείται από τον χημικό κώδικα της ζωής [21]. Το ρομπότ αυτό, το οποίο κατασκευάστηκε από μια ομάδα ερευνητών με επικεφαλής τον χημικό μηχανικό Milan Stojanovic του πανεπιστημίου Κολούμπια της Ν. Υόρκης, ήταν το πρώτο που κατάφερε να διασχίσει 100 ολόκληρα νανόμετρα, δηλαδή περίπου 50 βήματα.

Στην κανονική ρομποτική, οι πληροφορίες για τις εντολές περιέχονται στο ίδιο το ρομπότ, αλλά αυτό δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί σε μεμονωμένα μόρια. Επομένως, οι επιστήμονες αποθήκευσαν τις απαραίτητες πληροφορίες στο περιβάλλον του μορίου. Κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα τέτοιο προγραμματισμένο περιβάλλον χρησιμοποιώντας το DNA οριγκάμι. Το οριγκάμι που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση, ήταν ένα τετράγωνο που είχε πάχος 2 nm και η κάθε του πλευρά ήταν περίπου 100 nm. Οι ερευνητές κατασκεύασαν ένα μονοπάτι από μοριακά «ψίχουλα ψωμιού» στο δρόμο από το DNA οριγκάμι, συνδέοντας επιπρόσθετα μόρια μονόκλωνου DNA ή ολιγονουκλεοτίδια στα άκρα των «συνδετικών κλώνων» (staple strands). Αυτά τα

«ψίχουλα ψωμιού» δίνουν τις εντολές στα μοριακά ρομπότ για το τι θα κάνουν – να ξεκινήσουν, να περπατήσουν, να στρίψουν αριστερά, να στρίψουν δεξιά ή να σταματήσουν, για παράδειγμα.

Για την κατασκευή του μοριακού ρομπότ διαμέτρου τεσσάρων νανομέτρων, που φαίνεται στο **σχήμα 4.14**, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μία κοινή πρωτεΐνη, τη στρεπταβιδίνη, η οποία έχει τέσσερις συμμετρικά τοποθετημένες θέσεις πρόσδεσης της βιοτίνης [194]. Καθένα από τα πόδια του ρομπότ είναι ένας



Σχήμα 4.14: Το πρώτο μοριακό ρομπότ από DNA που περπατάει [194]

μικρός κλώνος DNA επισημασμένος με βιοτίνη. Έτσι, μπόρεσαν να συνδέσουν τέσσερα πόδια στο σώμα του ρομπότ. Τρία από τα πόδια αυτά αποτελούνται από ενζυμικό DNA (enzymatic DNA), το οποίο είναι DNA που προσδέεται σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA και την κόβει. Η αράχνη είναι, επίσης, εξοπλισμένη με έναν «κλώνο εκκίνησης» - το τέταρτο πόδι – που δένει την αράχνη στη θέση εκκίνησης (σε ένα συγκεκριμένο, δηλαδή, ολιγονουκλεοτίδιο στο δρόμο από το DNA οριγκάμι. Αφού το ρομπότ αποδεσμευτεί από τη θέση

εκκίνησης, ακολουθεί το δρόμο προσδεμένο στους κλώνους DNA που προεξέχουν από τους συνδετικούς κλώνους και ύστερα κόβοντάς τους. Μετά τη διάσπαση αυτή, το πόδι ξεκινάει την αναζήτηση του επόμενου υποστρώματος. Με τον τρόπο αυτό, η αράχνη διασχίζει το προκαθορισμένο από τους επιστήμονες μονοπάτι. Τελικά, το ρομπότ σταματάει όταν συναντήσει ένα κομμάτι DNA στο οποίο μπορεί να προσδεθεί, αλλά δεν μπορεί να το κόψει.

Τα μοριακά ρομπότ ελκύουν μεγάλο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα, λόγω της δυνατότητάς τους να προγραμματιστούν έτσι ώστε να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον τους και να αντιδρούν σε αυτό. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να αντιληφθούν τις ενδείξεις της ασθένειας (όπως, για παράδειγμα, του καρκίνου) σε ένα κύτταρο, να αποφασίσουν ότι το κύτταρο αυτό είναι επικίνδυνο και πρέπει να καταστραφεί και, τελικά, να απελευθερώσουν την κατάλληλη χημική ουσία που θα εξοντώσει τον «εχθρό». Η ανακάλυψη αποτελεί ένα ακόμα βήμα στην προσπάθεια της νανοτεχνολογίας να δημιουργήσει στρατιές νανο-ρομπότ που μια μέρα θα καθαρίζουν από μέσα τις αρτηρίες και θα αποκαθιστούν τις βλάβες στους ιστούς ενός οργανισμού.

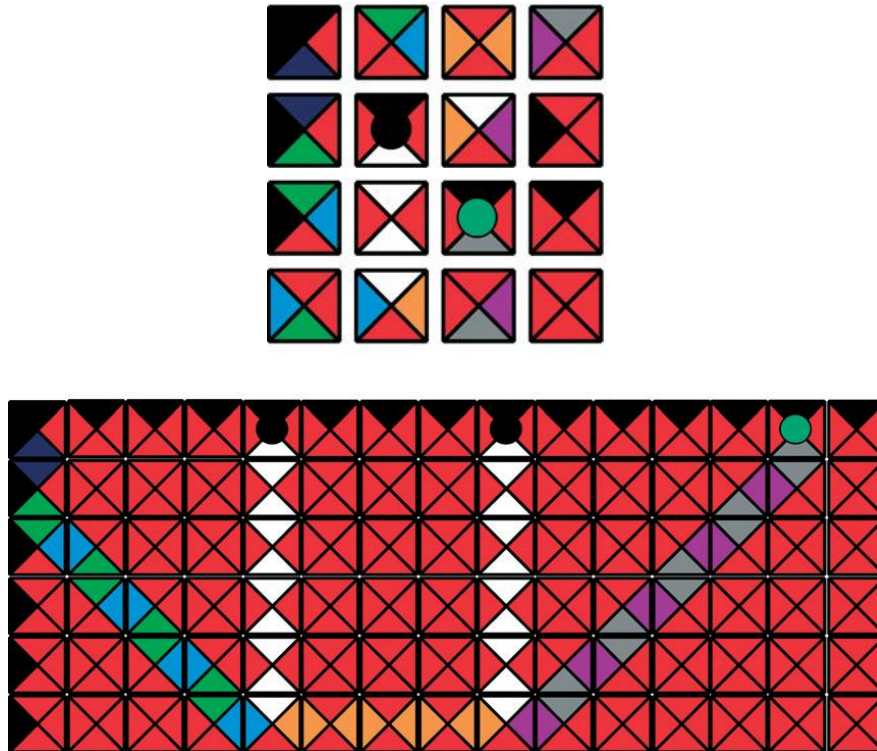
4.6 Χρήση των DNA νανοδομών για υπολογισμούς (computation)

Οι DNA νανοδομές χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά για υπολογισμούς (computation) το 1994 από τον Leonard Adleman [52]. Ο Adleman συνδύασε τις πληροφορίες στα μόρια DNA μεταξύ τους, χρησιμοποιώντας κοινές βιοτεχνολογικές μεθόδους [σύνδεση (ligation), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ηλεκτροφόρηση πήγματος και πρόσδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (sequence-specific binding)] για να επιλύσει ένα πρόβλημα Χαμιλτονιανού μονοπατιού (Hamiltonian path problem). Αυτό είναι ένα πρόβλημα που σχετίζεται με το πρόβλημα του πλανόδιου πωλητή (ποια είναι η βέλτιστη διαδρομή για να επισκεφτεί ένας πωλητής N πόλεις;). Στο πρόβλημα του Χαμιλτονιανού μονοπατιού που επέλυσε ο Adleman, υπάρχει ένα καθορισμένο σημείο εκκίνησης (start-point) και ένα καθορισμένο σημείο τερματισμού (end-point) και ένα ημιτελές σύνολο διαδρομών μεταξύ των πόλεων. Το πρόβλημα είναι να εξακριβωθεί εάν υπάρχει κάποιο μονοπάτι

μεταξύ του σημείου εκκίνησης και του σημείου τερματισμού που περνάει από όλες τις πόλεις. Η ιδέα πίσω από τους βασιζόμενους στο DNA υπολογισμούς (DNA-based computation) είναι ότι υπάρχουν ορισμένες κατηγορίες υπολογιστικών προβλημάτων για τις οποίες ο παραλληλισμός της μοριακής συναρμολόγησης υπερνικά τη χαμηλή ταχύτητα των απαιτούμενων μακροσκοπικών χειρισμών [72]. Έχει προταθεί μια μεγάλη ποικιλία τέτοιων υπολογισμών και κάποιοι από αυτούς έχουν δοκιμαστεί πειραματικά.

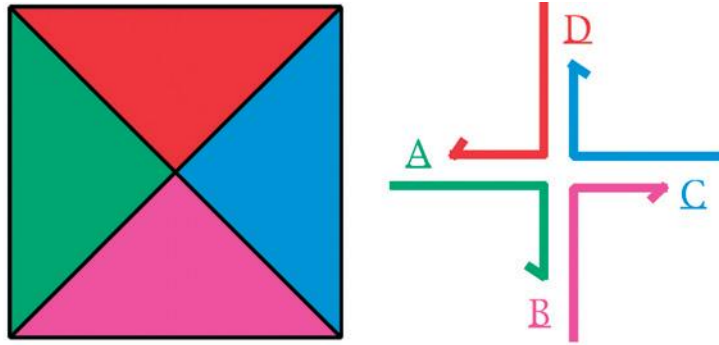
Έχουν αναπτυχθεί δύο βασικές προσεγγίσεις για βασιζόμενους στο DNA υπολογισμούς. Η πρώτη ήταν μία μέθοδος που προτάθηκε από τον Winfree, ο οποίος παρατήρησε ότι το σύστημα που περιέχει διακλαδούμενους συνδέσμους με κολλώδη άκρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση υπολογισμών από «πλακίδια Wang» (“Wang tiles”) σε μοριακή κλίμακα [67]. Αυτό είναι ένα σύστημα πλακιδίων των οποίων οι πλευρές μπορεί να περιέχουν μία ή περισσότερες διαφορετικές επισημάνσεις· τα πλακίδια αυτοσυναρμολογούνται σε ένα μωσαϊκό σύμφωνα με τον τοπικό κανόνα ότι η κάθε πλευρά του μωσαϊκού αποτελείται από πλακίδια με την ίδια ακριανή επισημάνση. Μία τέτοια μορφή διάταξης μπορεί να εξομοιώσει τη λειτουργία μιας μηχανής Turing, δηλαδή ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή γενικής χρήσης. Ένα συγκρότημα πλακιδίων Wang φαίνεται στο πάνω μέρος του **σχήματος 4.15** και στο κάτω μέρος του ίδιου σχήματος απεικονίζεται ένα μωσαϊκό που σχηματίστηκε από το συγκρότημα αυτό. Η σχέση μεταξύ των κολλωδών άκρων ενός διακλαδούμενου συνδέσμου και των επισημάνσεων ενός πλακιδίου Wang αποτυπώνεται στο **σχήμα 4.16**.

Αυτή η μορφή βασιζόμενου στο DNA υπολογισμού έχει προτυποποιηθεί με επιτυχία σε έναν αθροιστικό υπολογισμό XOR τεσσάρων δυαδικών ψηφίων (4-bit cumulative XOR calculation) [48]. Ο υπολογισμός XOR δίνει αποτέλεσμα 1 αν τα δύο δεδομένα εισόδου (inputs) είναι διαφορετικά και 0 αν είναι τα ίδια. Στο **σχήμα 4.17 (α)** απεικονίζονται οι συνιστώσες αυτού του υπολογισμού. Η κάθε συνιστώσα είναι ένα μόριο TX, που αναπαρίσταται ως τρία ορθογώνια με γεωμετρικά σχήματα στις άκρες τους που αντιπροσωπεύουν τη συμπληρωματικότητα. Τα δυαδικά ψηφία εισόδου (input bits) είναι πλακίδια «x» (πάνω αριστερά) και τα δυαδικά ψηφία εξόδου (output bits) είναι πλακίδια



Σχήμα 4.15: Πλακίδια Wang (Wang tiles) [14, 72]. Στο πάνω μέρος του σχήματος φαίνονται 16 πλακίδια Wang διαφόρων τύπων. Στο κάτω μέρος φαίνεται ένα μωσαϊκό που σχηματίστηκε από αυτά με την εφαρμογή του κανόνα ότι η κάθε πλευρά του μωσαϊκού θα πρέπει να αποτελείται από πλακίδια που έχουν όλα ίδιο χρώμα «εξωτερικής πλευράς». Το μωσαϊκό αναπαριστά έναν υπολογισμό, την πρόσθεση των αριθμών 4 και 7 για να προκύψει 11. Οι δύο προσθετέοι βρίσκονται στην πάνω σειρά, στην τέταρτη και έβδομη στήλη. Το «μονοπάτι» διαμέσου του οποίου πραγματοποιείται ο υπολογισμός ξεκινάει στην πάνω αριστερή γωνία και συνεχίζει διαγωνίως έως ότου συναντήσει την τέταρτη στήλη. Το μονοπάτι μετά μετατρέπεται σε οριζόντιο μέχρι την έβδομη στήλη και μετά μετατρέπεται πάλι σε διαγώνιο, τερματίζοντας στην ενδέκατη στήλη.

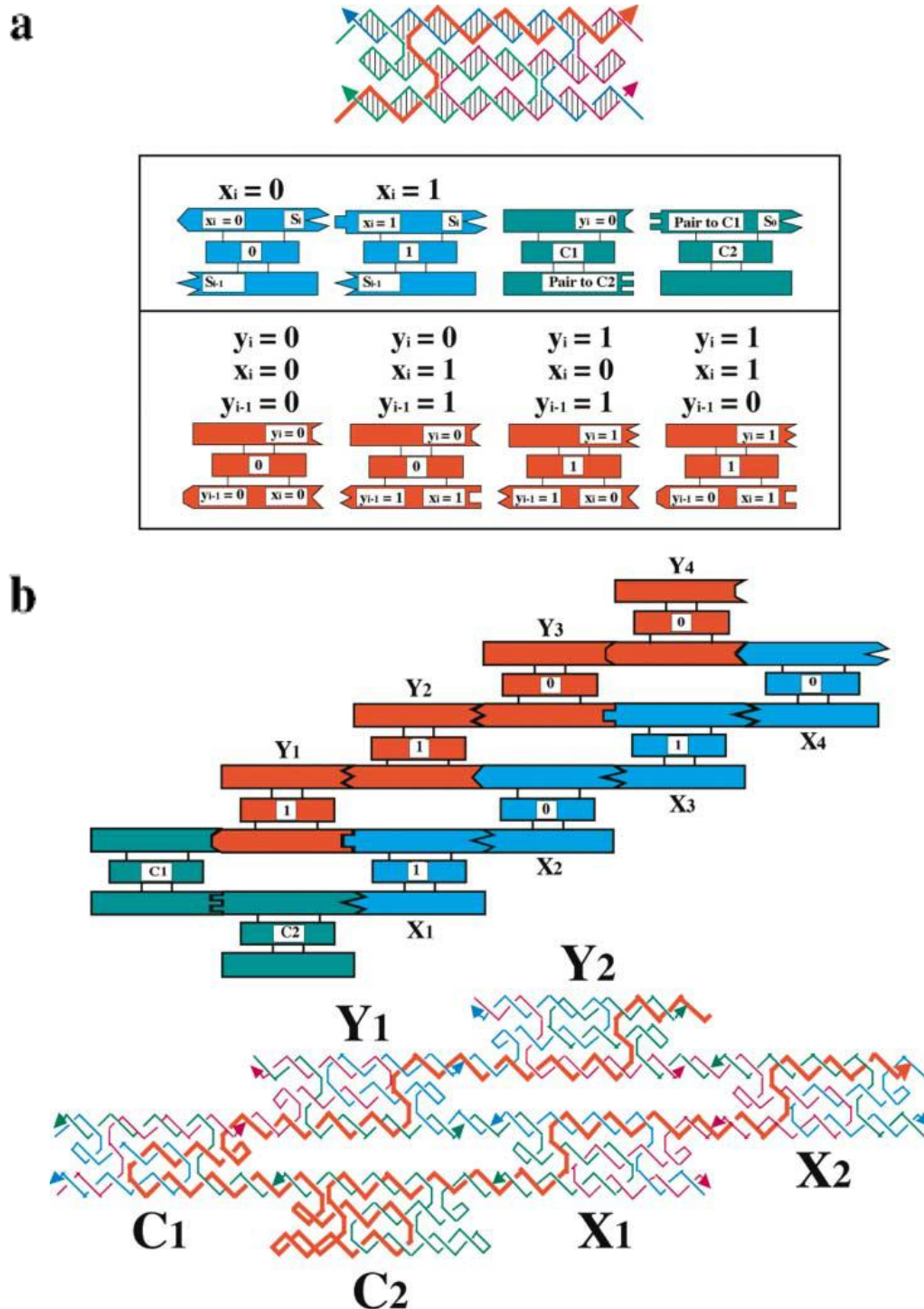
« y » (κάτω) και υπάρχουν, επίσης, δύο πλακίδια εκκίνησης (initiator tiles), τα **C1** και **C2** (πάνω δεξιά). Στο πάνω μέρος του [σχήματος 4.17\(a\)](#) φαίνεται η δομή των κλώνων των πλακιδίων TX. Κάθε κλώνος περιέχει έναν «κλώνο αναφοράς» (“reporter strand”), ο οποίος είναι σχεδιασμένος με πιο παχιά γραμμή. Τα πλακίδια x και y παίρνουν την τιμή 0 ή 1 ανάλογα με το εάν περιέχουν θέση



Σχήμα 4.16: Στο δεξί μέρος του σχήματος φαίνεται ένας δια χρώματος κωδικοποιημένος διακλαδούμενος σύνδεσμος, ο οποίος συγκρινόμενος με το μεγεθυμένο πλακίδιο στα αριστερά δείχνει τη σχέση μεταξύ πλακιδίων Wang και διακλαδούμενων συνδέσμων με κολλώδη άκρα [14].

περιορισμού του Pvu II ή του EcoR V, αντίστοιχα. Τα πλακίδια y_i εκτελούν τη συνάρτηση πύλης (gating function). Υπάρχουν τέσσερα τέτοια πλακίδια, που αντιστοιχούν στους τέσσερις δυνατούς συνδυασμούς των δεδομένων εισόδου 0 και 1. Τα δεδομένα εισόδου περιλαμβάνουν την κάτω περιοχή (**σχήμα 4.17(a)**). Η συναρμολόγηση των περιοδικών συστοιχιών που περιγράφηκαν στην παρούσα εργασία συνεπάγεται τον ανταγωνισμό μεταξύ σωστών και λάθος πλακιδίων για συγκεκριμένες θέσεις. Αντιθέτως, στην προκειμένη περίπτωση, ο ανταγωνισμός υφίσταται μεταξύ σωστών και εν μέρει σωστών πλακιδίων. Για παράδειγμα, το κολλώδες άκρο $y_{i-1} = 0$ στο πλακίδιο που βρίσκεται τέρμα αριστερά είναι το ίδιο με το κολλώδες άκρο y_{i-1} στο πλακίδιο που βρίσκεται τέρμα δεξιά. Στον αθροιστικό υπολογισμό XOR, ισχύει η ισότητα $y_i = XOR(x_i, y_{i-1})$. Η εφαρμογή του τύπου αυτού φαίνεται στο **σχήμα 4.17(b)**. Στα πλακίδια x_i και στους εκκινήτες δίνονται μακρύτερα κολλώδη άκρα από ό,τι στα πλακίδια y_i , έτσι ώστε να συναρμολογούν πρώτα ένα εκμαγείο όταν τα πλακίδια ψύχονται. Αυτό δημιουργεί μία διπλή θέση (double site) στην οποία μπορεί να προσδεθεί το πλακίδιο y_1 . Η πρόσδεση αυτή δημιουργεί τη διπλή θέση όπου μπορεί να προσδεθεί το πλακίδιο y_2 και ούτω καθεξής. Όταν η συναρμολόγηση ολοκληρωθεί, οι κλώνοι αναφοράς συνδέονται μεταξύ τους, δημιουργώντας έναν μακρύ κλώνο, ο οποίος συνδέει τα δεδομένα εισόδου με τα δεδομένα εξόδου διαμέσου των πλακιδίων εκκίνησης. Η ανάλυση του μερικού

περιορισμού (partial restriction analysis) του προκύπτοντος κλώνου αποκαλύπτει ότι λαμβάνεται η σωστή απάντηση σχεδόν αποκλειστικά.

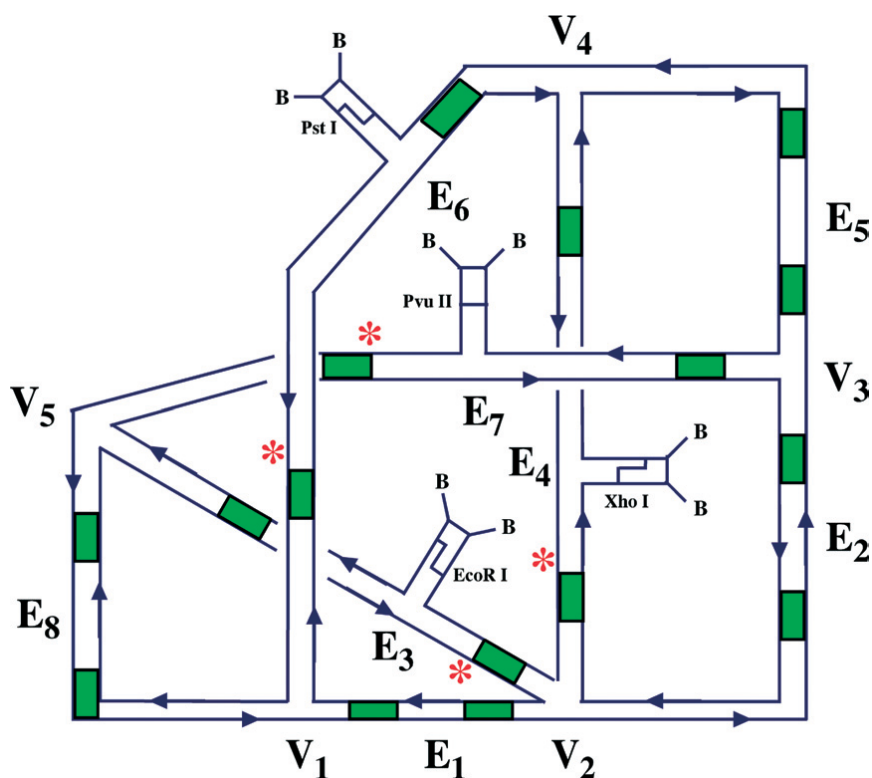


Σχήμα 4.17: (a) Στο πάνω μέρος του σχήματος φαίνεται η δομή των κλώνων των πλακιδίων TX, με τον κλώνο αναφοράς σχεδιασμένο με πιο παχιά γραμμή [12, 72]. Στο κάτω μέρος φαίνονται οι συνιστώσες ενός αθροιστικού

υπολογισμού XOR. Τα πλακίδια TX αναπαρίστανται ως ορθογώνια με κολλώδη άκρα στις άκρες τους που αναπαρίστανται με γεωμετρικά σχήματα. Τα πλακίδια x , που αντιστοιχούν σε δυαδικά ψηφία εισόδου, φαίνονται πάνω αριστερά (με μπλε χρώμα)· η τιμή του κάθε πλακιδίου φαίνεται στο κέντρο. Τα πλακίδια εκκίνησης **C1** και **C2** φαίνονται πάνω δεξιά (με πράσινο χρώμα) και τα τέσσερα πιθανά πλακίδια y φαίνονται στην κάτω σειρά (με πορτοκαλί χρώμα). **(b)** Τα αυτοσυναρμολογούμενα πλακίδια [12, 72]. Απεικονίζεται το «συναρμολόγημα» των πλακιδίων σε έναν πρότυπο υπολογισμό, χρησιμοποιώντας τις συνιστώσες που φαίνονται στο (a). Οι τιμές εισόδου 1, 1, 1, 0 παράγουν δεδομένα εξόδου με τιμές 1, 0, 1, 1, μέσω διαδοχικής πρόσδεσης των πλακιδίων y στις διπλές θέσεις που δημιουργούνταν καθώς η συστοιχία συναρμολογούταν.

Η δεύτερη προσέγγιση αναπτύχθηκε από τον Joposka και τους συναδέλφους του [66] και βρίσκει εφαρμογή στο πρόβλημα του χρωματισμού γραφημάτων (problem of coloring graphs). Εάν ένα γράφημα μπορεί να περιλαμβάνει τρία χρώματα (3-colorable graph), τότε μπορεί κανείς να χρωματίσει τους κόμβους του με τρία χρώματα έτσι ώστε να μην υπάρχει περίπτωση οι κόμβοι που «συνδέονται» από μία πλευρά να έχουν το ίδιο χρώμα. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να μετατραπεί σε όρους της δομικής νανοτεχνολογίας του DNA, αν οι πλευρές αναπαρασταθούν με διπλές έλικες και οι κορυφές με διακλαδούμενους συνδέσμους, όπως φαίνεται στο **σχήμα 4.18**. Καθεμία πλευρά έχει έξι διαφορετικές αναπαραστάσεις, που αντιστοιχούν σε έξι διαφορετικούς συνδυασμούς διαφορετικών χρωμάτων που μπορεί αυτή να περιλαμβάνει. Τα χρώματα είναι κωδικοποιημένα με κολλώδη άκρα. Ομοίως, τρία διαφορετικά αντίγραφα κάθε κορυφής βρίσκονται σε διάλυμα, εκτός από ένα ζεύγος εκκίνησης (initiating pair). Αν υπάρχει κάποια λύση στο πρόβλημα, τότε είναι δυνατή η σύνδεση των συνιστωσών προς σχηματισμό ενός κλειστού κυκλικού μορίου DNA. Ένα τέτοιο μόριο μπορεί να ανιχνευτεί είτε μέσω της κινητικότητάς του σε μία δισδιάστατη πηκτή πολυακρυλαμιδίου (2D polyacrylamide gel), είτε μέσω της αντίστασής του σε εξωνουκλεάσες.

Για να εκτελεστεί ένας τέτοιος υπολογισμός, είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι είναι δυνατόν να κατασκευαστεί το γράφημα από πραγματικά μόρια [48]. Η



Σχήμα 4.18: Ένα ακανόνιστο γράφημα (*irregular graph*) [14, 48]. Το γράφημα του σχήματος έχει εμφανείς πλευρές (E1-E8), όπως και κορυφές (V1-V5). Οι θέσεις των κολλωδών άκρων υποδεικνύονται με σκιασμένα ορθογώνια. Οι θέσεις περιορισμού υποδεικνύονται με τα ονόματα των περιοριστικών ενζύμων, οι ομάδες βιοτίνης με το γράμμα «B» και οι περιοχές ραδιενεργής επισήμανσης φαίνονται με αστερίσκους. Τα βέλη υποδεικνύουν τις πολικότητες των κλώνων. Στο σημείο αυτό, είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι αυτός είναι ένας πολυκόμβος, όχι κατενάριο.

πλευρά ενός γραφήματος δεν έχει πάχος, αλλά οι πλευρές μιας DNA αναπαράστασης ενός γραφήματος έχουν πάχος 2 nm. Το μήκος μιας πλευράς σε ένα γράφημα μπορεί να είναι αυθαίρετο, αλλά σε ένα DNA γράφημα πρέπει να ανατεθούν συγκεκριμένα μήκη, και τα μήκη και η τοποθέτηση των πλευρών πρέπει να είναι συμβατά με την ακαμψία ως προς τη συστρόφη και την κάμψη των DNA συνιστωσών. Έτσι, έχει προτυποποιηθεί ένας υπολογισμός στον οποίο είναι δυνατός ο χρωματισμός με τρία διαφορετικά χρώματα (*three-colorability calculation*) σε ένα «μονοχρωματικό» πείραμα. Εκτός από το ζήτημα της

δυνατότητας ή μη κατασκευής των μορίων από DNA συνιστώσες, αυτό το είδος συναρμολόγησης πρέπει, επίσης, να γίνει μια κι έξω σε διάλυμα. Τα κανονικά γραφήματα που είχαν προηγουμένως κατασκευαστεί από το DNA, ο κύβος και το κόλουρο οκτάεδρο, είχαν κατασκευαστεί με συγκεκριμένα βήματα και έτσι, η χημεία ήταν πολύ πιο απλή. Επομένως, δύο ήταν τα ζητήματα που έχρηζαν προσοχής σε αυτήν την αυτοσυναρμολόγηση. Μετά από την ταυτόχρονη σύνδεση όλων των συνιστωσών, οι ερευνητές «πέρασαν» τα προϊόντα από μία δισδιάστατη πηκτή και τελικά, εμφανίστηκαν ζώνες που υποδείκνυαν πλήρη σχηματισμό ενός κυκλικού μορίου. Η ανάλυση περιορισμού υπέδειξε ότι ήταν παρούσες όλες οι συνιστώσες και ότι ήταν και στη σωστή σειρά. Σφάλματα βρέθηκαν μόνο στο περίπου 2% των προϊόντων.

5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Το πεδίο της νανοτεχνολογίας του DNA, αν και βρίσκεται ακόμη σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης, έχει σημειώσει ραγδαία εξέλιξη τα τελευταία 15 περίπου χρόνια. Η μεγάλη ποικιλία δομικών μονάδων DNA πολλαπλών χρήσεων που έχουν κατασκευαστεί από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, έχει διευρύνει σημαντικά το γνωστικό υπόβαθρο των επιστημόνων σχετικά με το σχηματισμό πολύπλοκων DNA νανοδομών. Είναι βέβαιο ότι στο μέλλον, θα είναι δυνατόν να κατασκευαστεί ένα νανοϋλικό από DNA με σχεδόν οποιοδήποτε αυθαίρετο σχήμα.

Η ιστορία εξέλιξης των υλικών δείχνει ότι μόνο υλικά που έχουν εφαρμογές «στον πραγματικό κόσμο» και ωφελούν το ανθρώπινο είδος θα συνεχίσουν να ερευνούνται. Προς το παρόν, η δημιουργία τέτοιων DNA υλικών βρίσκεται σε αρχικό στάδιο. Τι επιφυλάσσει, όμως, το μέλλον για τα DNA υλικά; Αν και έχουν κατασκευαστεί έως τώρα αναρίθμητες DNA νανοδομές με αξιοσημείωτες εφαρμογές, πρέπει να σημειωθεί ακόμη μεγαλύτερη πρόοδος προκειμένου να υλοποιηθούν όλες οι δυνατές εφαρμογές της νανοτεχνολογίας του DNA. Από τη σκοπιά της παραγωγής, στους περιοριστικούς παράγοντες περιλαμβάνονται ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται για την παραγωγή των εν λόγω υλικών και το κόστος [74]. Από τη σκοπιά της «λειτουργικότητας», άλλα σημαντικά εμπόδια είναι η ανθεκτικότητα και η διάρκεια, η βελτιστοποίηση της αποτροπής σφαλμάτων, η διευκόλυνση του σχεδιασμού και της κατασκευής και η ικανότητα διασύνδεσης DNA νανοϋλικών με άλλα υλικά. Η υπερνίκηση των εμποδίων αυτών αναμένεται ότι θα είναι ο σκοπός των ερευνών που θα διεξάγονται στο άμεσο μέλλον. Παρόλα αυτά, η νανοτεχνολογία του DNA βρίσκεται σε πρώιμο ακόμη στάδιο και το μέλλον προδιαγράφεται λαμπρό και εντυπωσιακό όχι μόνο για την επιστήμη αυτή, αλλά και για την ανθρωπότητα διαμέσου αυτής!

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nadrian C. Seeman. Nanotechnology and the Double Helix. Scientific American, INC., 2004
2. Nadrian C. Seeman. DNA nanotechnology: Novel DNA Constructions. Duke university, March 2007
3. Paul W. K. Rothemund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, Nature, Vol 440, 16 March 2006
4. Jens Kopatsch. New motifs in DNA nanotechnology and their applications. September 2004
5. Zhaoxiang Deng, Yi Chen, Ye Tian, and Chengde Mao, A fresh look at DNA nanotechnology, Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907, USA
6. Hao Yan and Yan Liu. DNA Nanotechnology: an Evolving Field. Department of Chemistry and Biochemistry and The Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ 85287, USA
7. Jonas Berggren. Fundamentals and Limits of DNA Nanotechnology. Master's Thesis, Department of physics division of solid state physics
8. Shelley F. J. Wickham, Masayuki Endo, Yousuke Katsuda, Kumi Hidak, Jonathan Bath, Hiroshi Sugiyama and Andrew J. Turberfield. Direct observation of stepwise movement of a synthetic molecular transporter. Nature nanotechnology, 6 February 2011
9. Nathaniel Bryans. DNA nanotechnology, The science of assembly. April 11, 2011
10. John H Rei and Thomas H LaBean. DNA Nanotechnology and its Biological Applications. Wiley, USA, 2007
11. Faisal A. Aldaye and Hanadi F. Sleiman. Supramolecular DNA nanotechnology. Pure Appl. Chem., Vol. 81, No. 12, pp. 2157–2181, 2009
12. Nadrian C. Seeman. At the crossroads of chemistry, biology and materials; Structural DNA nanotechnology. Chemistry & Biology, Vol. 10, 1151–1159, December, 2003
13. Lin CX, Liu Y, Rinker S, Yan H. DNA tile based self-assembly: building complex nanoarchitectures. *ChemPhysChem* 2006, 7:1641–1647

14. Nadrian C Seeman and Philip S Lukeman. Nucleic acid nanostructures bottom-up control of geometry on the nanoscale. Institute of physics publishing, 2004
15. Nadrian C. Seeman. Nanomaterials Based on DNA. Annual Reviews, 2010
16. Seeman NC. Nucleic-Acid junctions and lattices. J Theor Biol 1982, 99:237–247
17. LaBean TH, Li HY. Constructing novel materials with DNA. Nano Today 2007, 2:26–35
18. Lin C, Liu Y, Yan H. Designer DNA nanoarchitectures. Biochemistry 2009, 48:1663–1674.
19. Feldkamp U, Niemeyer CM. Rational design of DNA nanoarchitectures. Angew Chem Int Edit 2006, 45:1856–876.
20. <http://www.scienceillustrated.gr/?p=4061>
21. <http://norfid.wordpress.com/category/επιστημη/νανοτεχνολογια/>
22. Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, Letsinger R L and Mirkin C A 1997 Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles Science 277 1078–81
23. Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng XG, Wilson T E, Loweth CJ, Bruchez MP and Schultz PG 1996 Organization of ‘nanocrystal molecules’ using DNA Nature 382 609–11
24. Mucic R C, Storhoff J J, Mirkin C A and Letsinger R L 1998 DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials J. Am. Chem. Soc. 120 12674–5
25. Shi J F and Bergstrom D E 1997 Assembly of novel DNA cycles with rigid tetrahedral linkers Angew. Chem. Int. Edn Engl. 36 111–13
26. Eckardt L H, Naumann K, Pankau WM, Rein M, Schweitzer M, Windhab N and von Kiedrowski G 2003 DNA nanotechnology: chemical copying of connectivity Nature 420 286–6
27. Marsh T C, Vesenka J and Henderson E 1995 A new DNA nanostructure, the G-wire, imaged by scanning probe microscopy Nucleic Acids Res. 23 696–700
28. Sondermann A, Holste C, M“oller R and Fritzsche W 2002 Assembly of G-quartet based DNA superstructures (G-wires) DNA-Based Molecular

- Construction: International Workshop ed W Fritzsche (Melville, NY: American Institute of Physics) pp 93–8
29. Niemeyer C M 2002 The development of semisynthetic DNA-protein conjugates *Trends Biotechnol.* 20 395–401
 30. http://www.nano.gr/nanobiotechnology_life_Sciences.asp
 31. <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=8048.php>
 32. <http://www.foresight.org/nanodot/?p=4511>
 33. <http://www.foresight.org/Conferences/MNT05/Papers/Seeman/>
 34. DNA Nanotechnology: 'Magic Bullets' Breakthrough Offers Promising Applications in Medicine, *ScienceDaily*, Apr. 9, 2010
 35. Pik Kwan Lo, Pierre Karam, Faisal A. Aldaye, Christopher K. McLaughlin, Graham D. Hamblin, Gonzalo Cosa & Hanadi F. Sleiman. Loading and selective release of cargo in DNA nanotubes with longitudinal variation. *Nature Chemistry*, 14 March 2010
 36. Kurt E. Geckeler, Hiroyuki Nishide. *Advanced Nanomaterials*. Wiley-VCH, December 2009
 37. Gwyneth Dickey. DNA on the move. *Science news*, September 11th, 2010; Vol.178 #6 (p. 18)
 38. Brandon Keim. DNA nanotech gains a third dimension. *Wired Science*, May 20, 2009
 39. <http://nextbigfuture.com/2009/05/dna-box-3d-dna-nanotechnology.html>
 40. <http://www.biotecharticles.com/Nanotechnology-Article/DNA-Nanotechnology-History-and-Applications-654.html>
 41. <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=9081.php>
 42. DNA electronics in nanotechnology, *Nanowerk*, December 28, 2007
 43. Maurice Ndashimye, DNA nanotechnology, African Institute for mathematical Sciences, January 21, 2011
 44. David Yu Zhang and George Seelig. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nature chemistry*, 24 January 2011
 45. Mansi Mavani, DNA nanobiotechnology
 46. Ariel Wang, DNA nanotechnology, Cluster 1: Biotechnology, 2009
 47. Nadrian C. Seeman. DNA nanotechnology: From topological control to structural control. World Scientific, 2000

48. Cristian S. Calude, Gheorghe Paun and Grzegorz Rozenberg. Unconventional Computation: 4th International Conference, UC 2005, Sevilla, Spain, October 3-7, Proceedings (Lecture Notes in Computer Science / Theoretical Computer Science and General Issues) (Paperback). Springer
49. Institute of medicine and national research council. An International Perspective on Advancing Technologies and Strategies for Managing Dual-Use Risks: Report of a Workshop, The national academies press, 2005
50. Chengde Mao, Takashi Yokomori. DNA Computing: 12th International Meeting on DNA Computing, DNA12, Seoul, Korea, June 5-9, 2006, Revised Selected Papers. Springer
51. Hiroshi Umeo, Natural Computing: 4th International Workshop on Natural Computing, Himeji, Japan, September 2009, Springer
52. Adleman L M 1994 Molecular computation of solutions to combinatorial problems Science 266 1021-4
53. Mao C, Sun W, Shen Z and Seeman N C 1999 A DNA nanomechanical device based on the B-Z transition Nature 397 144-
54. Yan H, Zhang X, Shen Z and Seeman N C 2002 A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology Nature 415 62-5
55. Yang X, Vologodskii A, Liu B, Kemper B and Seeman N C 1998 Torsional control of double stranded DNA branch migration Biopolymers 45 69-83
56. Li J J and Tan W 2002 A single DNA molecule nanomotor Nano Lett. 2 315-18
57. Alberti P and Mergny J-L 2002 DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine Proc. Natl Acad. Sci. USA 100 1569-73
58. Fahlman R P, Hsing M, Sporer-Tuhten C S and Sen D 2003 Duplex pinching: a structural switch suitable for contractile DNA nanoconstructions Nano Lett. 3 1073-8
59. Liu D and Balasubramanian S 2003 A proton-fuelled DNA nanomachine Angew. Chem. Int. Edn Engl. 42 5734-6
60. Yurke B, Turberfield A J, Mills A P Jr, Simmel F C and Newmann J L 2000 A DNA-fuelled molecular machine made of DNA Nature 406 605-8
61. Sherman W B and Seeman N C 2004 A precisely controlled DNA bipedal walking device Nano Lett. 4 1203-7

62. Dittmer W U and Simmel F C 2004 Transcriptional control of DNA-based nanomachines *Nano Lett.* 4 689–91
63. Feng L, Park S H, Reif J H and Yan H 2003 A two-state DNA lattice switched by DNA nanoactuator *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 42 4342–6
64. Shen W, Bruist M F, Goodman S D and Seeman N C 2004 A protein-driven DNA device that measures the excess binding energy of proteins that distort DNA *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 43 4750–2
65. Chen Y, Wang M and Mao C 2004 An autonomous DNA nanomotor powered by a DNA enzyme *Angew. Chem.* 116 3638–41
66. Jonoska N, Karl S A and Saito M 1999 Three-dimensional DNA structure in computing *Biosystems* 52 143–53
67. Winfree E 1996 DNA Based Computers Proc. DIMACS Workshop on the Computational Power of DNA Annealing and Ligation (Princeton University, 4 April 1995) ed R J Lipton and E B Baum (Providence, RI: American Mathematical Society), pp 199–219
68. Rothmund P W K, Papadakis N and Winfree E Algorithmic self-assembly of DNA Sierpinski triangles *DNA Computing IX* ed J H Reif and J Chen (Berlin: Springer) at press
69. Mao C, LaBean T, Reif J H and Seeman N C 2000 Logical computation using algorithmic self-assembly of DNA triple crossover molecules *Nature* 407 493–6
70. Xiao S, Liu F, Rosen A, Hainfeld J F, Seeman N C, Musier-Forsyth K M and Kiehl R A 2002 Self-assembly of nanoparticle arrays by DNA scaffolding *J. Nanopart. Res.* 4 313–17
71. Zhu L, Lukeman P S, Canary J W and Seeman N C 2003 Nylon/DNA: single-stranded DNA with covalently stitched nylon lining *J. Am. Chem. Soc.* 125 10178–9
72. Nadrian C. Seeman. An Overview of Structural DNA Nanotechnology. Humana Press Inc. 2007
73. Nadrian C. Seeman. Structural DNA nanotechnology: Growing along with *Nano Letters*. *Nano Lett.* 10, 1971–1978, 2010
74. Dayong Yang, Michael J. Campolongo, Thua Nguyen Nhi Tran, Roanna C. H. Ruiz, Jason S. Kahn¹ and Dan Luo. Novel DNA materials and their

- applications. John Wiley & Sons, Inc., Volume 2, November/December 2010
75. Winfree E, Liu FR, Wenzler LA, Seeman NC. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* 1998, 394:539–544.
 76. Fu TJ, Seeman NC. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry* 1993, 32:3211–3220.
 77. Li XJ, Yang XP, Qi J, Seeman NC. Antiparallel DNA double crossover molecules as components for nanoconstruction. *J Am Chem Soc* 1996, 118:6131–6140.
 78. Liu FR, Sha RJ, Seeman NC. Modifying the surface features of two-dimensional DNA crystals. *J Am Chem Soc* 1999, 121:917–922.
 79. Reishus D, Shaw B, Brun Y, Chelyapov N, Adleman L. Self-assembly of DNA double-double crossover complexes into high-density, doubly connected, planar structures. *J Am Chem Soc* 2005, 127:17590–17591.
 80. LaBean TH, Yan H, Kopatsch J, Liu FR, Winfree E, et al. Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes. *J Am Chem Soc* 2000, 122:1848–1860.
 81. Liu Y, Lin CX, Li HY, Yan H. Protein nanoarrays—aptamer-directed self-assembly of protein arrays on a DNA nanostructure. *Angew Chem Int Edit* 2005, 44:4333–4338.
 82. Liu D, Park SH, Reif JH, LaBean TH. DNA nanotubes self-assembled from triple-crossover tiles as templates for conductive nanowires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:717–722.
 83. Shen ZY, Yan H, Wang T, Seeman NC. Paranemic crossover DNA: a generalized Holliday structure with applications in nanotechnology. *J Am Chem Soc* 2004, 126:1666–1674.
 84. Liu WY, Wang X, Wang T, Sha RJ, Seeman NC. PX DNA triangle oligomerized using a novel three-domain motif. *Nano Lett* 2008, 8:317–322.
 85. Andersen ES, Dong M, Nielsen MM, Jahn K, Subramani R, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 2009, 459:73–76.
 86. Seeman NC. DNA engineering and its application to nanotechnology. *Trends Biotechnol* 1999, 17:437–443.

87. Seeman NC. Nucleic acid nanostructures and topology. *Angew Chem Int Edit* 1998, 37:3220–3238.
88. Simmel FC. Three-dimensional nanoconstruction with DNA. *Angew Chem Int Edit* 2008, 47:5884–5887.
89. Endo M, Seeman NC, Majima T. DNAtube structures controlled by a four-way-branched DNA connector. *Angew Chem Int Edit* 2005, 44:6074–6077.
90. Yan H, Park SH, Finkelstein G, Reif JH, LaBean TH. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science* 2003, 301:1882–1884.
91. Fischler M, Simon U, Nir H, Eichen Y, Burley GA, et al. Formation of bimetallic Ag-Au nanowires by metallization of artificial DNA duplexes. *Small* 2007, 3:1049–1055.
92. Guan JJ, Lee J. Generating highly ordered DNA nanostrand arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:18321–18325.
93. Brennenman A, Condon A. Strand design for biomolecular computation. *Theor Comput Sci* 2002, 287: 39–58.
94. Mao CD, Sun WQ, Seeman NC. Designed twodimensional DNA Holliday junction arrays visualized by atomic force microscopy. *JAm Chem Soc* 1999, 121:5437–5443.
95. He Y, Chen Y, Liu HP, Ribbe AE, Mao CD. Selfassembly of hexagonal DNA two-dimensional (2D) arrays. *J Am Chem Soc* 2005, 127:12202–12203.
96. Zhang C, Su M, He Y, Zhao X, Fang PA, et al. Conformational flexibility facilitates self-assembly of complex DNA nanostructures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:10665–10669.
97. He Y, Tian Y, Ribbe AE, Mao CD. Highly connected two-dimensional crystals of DNA six-point-stars. *J Am Chem Soc* 2006, 128:15978–15979.
98. Chelyapov N, Brun Y, Gopalkrishnan M, Reishus D, Shaw B, Adleman L. DNA triangles and selfassembled hexagonal tilings. *JAm Chem Soc* 2004, 126:13924–13925.
99. He Y, Tian Y, Chen Y, Deng ZX, Ribbe AE, Mao CD. Sequence symmetry as a tool for designing DNA nanostructures. *Angew Chem Int Edit* 2005, 44:6694–6696.
100. Zhang C, Ko SH, Su M, Leng YJ, Ribbe AE, et al. Symmetry Controls the Face Geometry of DNA Polyhedra. *J Am Chem Soc* 2009, 131:1413–1415.

- 101.** Hamada S, Murata S. Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA Nanostructures. *Angew Chem Int Edit* 2009, 48:6820–6823.
- 102.** Sun XP, Ko SH, Zhang CA, Ribbe AE, Mao CD. Surface-Mediated DNA Self-Assembly. *J Am Chem Soc* 2009, 131:13248–13249.
- 103.** Zhao Z, Yan H, Liu Y. A route to scale up DNA origami using DNA tiles as folding staples. *Angew Chem Int Edit* 2010, 49:1414–1417.
- 104.** Chen JH, Seeman NC. Synthesis from DNA of molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 1991, 350:631–633.
- 105.** Zhang YW, Seeman NC. Construction of a DNA truncated octahedron. *J Am Chem Soc* 1994, 116: 1661–1669.
- 106.** Shih WM, Quispe JD, Joyce GF. A 1.7-kilobase singlestranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature* 2004, 427:618–621.
- 107.** Goodman RP, Schaap IAT, Tardin CF, Erben CM, Berry RM, et al. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science* 2005, 310:1661–1665.
- 108.** Goodman RP, Heilemann M, Doose S, Erben CM, Kapanidis AN, Turberfield AJ. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nat Nanotechnol* 2008, 3:93–96.
- 109.** Douglas SM, Dietz H, Liedl T, Hogberg B, Graf F, Shih WM. Self-assembly of DNA into nanoscale threedimensional shapes. *Nature* 2009, 459:414–418.
- 110.** Dietz H, Douglas SM, Shih WM. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science* 2009, 325:725–730.
- 111.** Feldkamp U, Sacca B, Niemeyer CM. Dendritic DNA building blocks for amplified detection assays and biomaterials. *Angew Chem Int Edit* 2009, 48: 5996–6000.
- 112.** Caminade AM, Turrin CO, Majoral JP. Dendrimers and DNA: combinations of two special topologies for nanomaterials and biology. *Chem Eur J* 2008, 14:7422–7432.
- 113.** Nilsen TW, Grayzel J, Prenskey W. Dendritic nucleic acid structures. *J Theor Biol* 1997, 187:273–284. 89. Wang J, Jiang M, Nilsen TW, Getts RC. Dendritic nucleic acid probes for DNA biosensors. *J Am Chem Soc* 1998, 20:8281–8282.

114. Wang J, Jiang M, Nilsen TW, Getts RC. Dendritic nucleic acid probes for DNA biosensors. *J Am Chem Soc* 1998, 120:8281–8282.
115. Li YG, Tseng YD, Kwon SY, D’Espaux L, Bunch JS, et al. Controlled assembly of dendrimer-like DNA. *Nat Mater* 2004, 3:38–42.
116. Um SH, Lee JB, Park N, Kwon SY, Umbach CC, Luo D. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. *Nat Mater* 2006, 5:797–801.
117. Lee JB, Roh YH, Um SH, Funabashi H, Cheng WL, et al. Multifunctional nanoarchitectures from DNA-based ABC monomers. *Nat Nanotechnol* 2009, 4:430–436.
118. Warner MG, Hutchison JE. Linear assemblies of nanoparticles electrostatically organized on DNA scaffolds. *Nat Mater* 2003, 2:272–277.
119. Nakao H, Shiigi H, Yamamoto Y, Tokonami S, Nagaoka T, et al. Highly ordered assemblies of Au nanoparticles organized on DNA. *Nano Lett* 2003, 3:1391–1394.
120. Patolsky F, Weizmann Y, Lioubashevski O, Willner I. Au-nanoparticle nanowires based on DNA and polylysine templates. *Angew Chem Int Ed* 2002, 41:2323–2327.
121. Li H, Park SH, Reif JH, LaBean TH, Yan H. DNA-templated self-assembly of protein and nanoparticle linear arrays. *J Am Chem Soc* 2004, 126:418–419.
122. Stearns LA, Chhabra R, Sharma J, Liu Y, Petuskey WT, et al. Template-directed nucleation and growth of inorganic nanoparticles on DNA scaffolds. *Angew Chem Int Ed* 2009, 48:8494–8496.
123. Xiao S, Liu F, Rosen AE, Hainfeld JF, Seeman NC, et al. Self-assembly of metallic nanoparticle arrays by DNA scaffolding. *J Nanoparticle Res* 2002, 4: 313–317.
124. Le JD, Pinto Y, Seeman NC, Musier-Forsyth K, Taton TA, Kiehl RA. DNA-templated self-assembly of metallic nanocomponent arrays on a surface. *Nano Lett* 2004, 4:2343–2347.
125. Pinto YY, Le JD, Seeman NC, Musier-Forsyth K, Taton TA, Kiehl RA. Sequence-encoded self-assembly of multiple-nanocomponent arrays by 2D DNA scaffolding. *Nano Lett* 2005, 5:2399–2402.

- 126.** Zhang J, Liu Y, Ke Y, Yan H. Periodic square-like gold nanoparticle arrays templated by self-assembled 2D DNA nanogrids on a surface. *Nano Lett* 2006, 6:248–251.
- 127.** Sharma J, Chhabra R, Liu Y, Ke Y, Yan H. DNA templated self-assembly of two-dimensional and periodical gold nanoparticle arrays. *Angew Chem Int Ed* 2006, 45:730–735.
- 128.** Zheng J, Constantinou PE, Micheel C, Alivisatos AP, Kiehl RA, Seeman NC. Two-dimensional nanoparticle arrays show the organizational power of robust DNA motifs. *Nano Lett* 2006, 6:1502–1504.
- 129.** Sharma J, Ke Y, Lin C, Chhabra R, Wang Q, et al. DNA-tile-directed self-assembly of quantum dots into two-dimensional nanopatterns. *Angew Chem Int Ed* 2008, 47:5157–5159.
- 130.** Maune HT, Han S-P, Barish RD, Bockrath M, Goddard WA III, et al. Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nat Nanotechnol* 2010, 5:61–66.
- 131.** Hung AM, Micheel CM, Bozano LD, Osterbur LW, Wallraff GM, Cha JN. Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami. *Nat Nanotechnol* 2010, 5:121–126.
- 132.** Park SH, Yin P, Liu Y, Reif JH, LaBean TH, Yan H. Programmable DNA self-assemblies for nanoscale organization of ligands and proteins. *Nano Lett* 2005, 5:729–733.
- 133.** Chhabra R, Sharma J, Ke Y, Liu Y, Rinker S, et al. Spatially addressable multiprotein nanoarrays template by aptamer-tagged DNA nanoarchitectures. *J Am Chem Soc* 2007, 129:10304–10305.
- 134.** He Y, Ribbe AE, Mao C. Antibody nanoarrays with a pitch of ~20 nanometers. *J Am Chem Soc* 2006, 128:12664–12665.
- 135.** Williams BAR, Lund K, Liu Y, Yan H, Chaput JC. Self-assembled peptide nanoarrays: an approach to studying protein-protein interactions. *Angew Chem Int Ed* 2007, 46:3051–3054.
- 136.** Numajiri K, Kuzuya A, Komiyama M. Asymmetric secondary and tertiary streptavidin/DNA complexes selectively formed in a nanometer-scale DNA well. *Bioconjugate Chem* 2010, 21:338–344.

- 137.** Voigt NV, Tørring T, Rotaru A, Jacobsen MF, Ravnsbæk JB, et al. Single-molecule chemical reactions on DNA origami. *Nat Nanotechnol* 2010, 5:200–203.
- 138.** Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 1996, 382:607–609.
- 139.** Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng X, Wilson TE, Loweth CJ, et al. Organization of ‘nanocrystal molecules’ using DNA. *Nature* 1996, 382:609–611.
- 140.** Loweth CJ, Caldwell WB, Peng X, Alivisatos AP, Schultz PG. DNA-based assembly of gold nanocrystals. *Angew Chem Int Ed* 1999, 38:1808–1812.
- 141.** Mastroianni AJ, Claridge SA, Alivisatos AP. Pyramidal and chiral groupings of gold nanocrystals assembled using DNA scaffolds. *J Am Chem Soc* 2009, 131:8455–8459.
- 142.** Mucic RC, Storhoff JJ, Mirkin CA, Letsinger RL. DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials. *J Am Chem Soc* 1998, 120: 12674–12675.
- 143.** Maye MM, Nykypanchuk D, van der Lelie D, Gang O. DNA-regulated micro- and nanoparticle assembly. *Small* 2007, 3:1678–1682.
- 144.** Nykypanchuk D, Maye MM, van der Lelie D, Gang O. DNA-guided crystallization of colloidal nanoparticles. *Nature* 2008, 451:549–552.
- 145.** Park SY, Lytton-Jean AKR, Lee B, Weigand S, Schatz GC, Mirkin CA. DNA-programmable nanoparticle crystallization. *Nature* 2008, 451: 553–556.
- 146.** Maye MM, Kumara MT, Nykypanchuk D, Sherman WB, Gang O. Switching binary states of nanoparticle superlattices and dimer clusters by DNA strands. *Nat Nanotechnol* 2010, 5:116–120.
- 147.** Cheng WL, Park N, Walter MT, Hartman MR, Luo D. Nanopatterning self-assembled nanoparticle superlattices by moulding microdroplets. *Nat Nanotechnol* 2008, 3:682–690.
- 148.** Cheng WL, Campolongo MJ, Cha JJ, Tan SJ, Umbach CC, et al. Free-standing nanoparticle superlattice sheets controlled by DNA. *Nat Mater* 2009, 8:519–525.

149. Cheng WL, Hartman MR, Smilgies D-M, Long R, Campolongo MJ, et al. Probing in real time the soft crystallization of DNA-capped nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2010, 49:380–384.
150. Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev* 2005, 105:1547–1562.
151. Lee JB, Campolongo MJ, Kahn JS, Roh YH, Hartman MR, Luo D. DNA-based nanostructures for molecular sensing. *Nanoscale* 2010, 2:188–197.
152. Li YG, Cu YTH, Luo D. Multiplexed detection of pathogen DNA with DNA-based fluorescence anobarcodes. *Nat Biotechnol* 2005, 23:885–889.
153. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 1997, 277:1078–1081.
154. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J Am Chem Soc* 1998, 120:1959–1964.
155. Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticlebased bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 2003, 301:1884–1886.
156. Lee JS, Han MS, Mirkin CA. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg²⁺) in aqueous media using DNAfunctionalized gold nanoparticles. *Angew Chem Int Edit* 2007, 46:4093–4096.
157. Stoeva SI, Lee JS, Thaxton CS, Mirkin CA. Multiplexed DNA detection with biobarcoded nanoparticle probes. *Angew Chem Int Edit* 2006, 45:3303–3306.
158. Nam JM, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc* 2004, 126:5932–5933.
159. Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 2000, 289:1757–1760.
160. Benveniste AL, Creeger Y, Fisher GW, Ballou B, Waggoner AS, Armitage BA. Fluorescent DNA nanotags: Supramolecular fluorescent labels based on intercalating dye arrays assembled on nanostructured DNA templates. *Am Chem Soc* 2007, 129:2025–2034.

161. Ozhalici-Unal H, Armitage BA. Fluorescent DNA nanotags based on a self-assembled DNA tetrahedron. *ACS Nano* 2009, 3:425–433.
162. DeVries JK, Zubay G. DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967, 57:1010–1012.
163. Kim DM, Choi CY. A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol Prog* 1996, 12:645–649.
164. Kim DM, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng* 1999, 66:180–188.
165. Kim DM, Swartz JR. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cellfree protein synthesis. *Biotechnol Bioeng* 2001, 74:309–316.
166. Kim DM, Swartz JR. Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2004, 85:122–129.
167. Ghosh D, Ramakanth M, Bhaumik A, Faure N, Rondelez F, Chatterji D. Transcription of T7 DNA immobilised on latex beads and Langmuir–Blodgett film. *J Biochem Biophys Methods* 2005, 62:51–62.
168. Yang J, Kanter G, Voloshin A, Michel-Reydellet N, Velkeen H, et al. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng* 2005, 89:503–511.
169. Donald Voet and Judith G. Voet. *Biochemistry*. Wiley, New York, 1990. 89-16727 Donald Voet, Judith G. Voet ; illustrators, Irving Geis, John and Bette Woolsey.
170. D. A. Marvin, M. Spencer, M. H. F. Wilkins, and L. D. Hamilton. New configuration of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 182(4632):387–388, 1958.
171. A. Rich, A. Nordheim, and A. H. J. Wang. The chemistry and biology of left-handed z-dna. *Annual Review of Biochemistry*, 53:791–846, 1984. Review.
172. M. Eriksson and P. E. Nielsen. Solution structure of a peptide nucleic acid dna duplex. *Nature Structural Biology*, 3(5):410–413, 1996. Letter MAY.

- 173.** Y. Wang and D. J. Patel. Solution structure of a parallel-stranded quadruplex dna. *Journal of Molecular Biology*, 234(4):1171–1183, 1993. Article DEC 20.
- 174.** Luo D. The road from biology to materials. *Mater Today* 2003, 6:38–43
- 175.** Hendrickson, E.R. et al. (1995) High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA labeled antibodies und polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 23, 522–529
- 176.** Sano, T. et al. (1992) Immuno-PCR: Very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258, 120–122
- 177.** Niemeyer, C.M. et al. (1997) Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates. *Anal. Biochem.* 246, 140–145
- 178.** Niemeyer, C.M. et al. (1999) Self-Assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Res.* 27, 4553–4561
- 179.** Niemeyer, C.M. et al. (2001) Hapten-functionalized DNA-streptavidin nanocircles as supramolecular reagents in a novel competitive immuno-PCR assay. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 40, 3169–3172
- 180.** S. 1. Rumney. E. T. Kool. *Angew. Chem.* 1992. 104, 1686; *Angew. Chem. Inr. Ed. Engl.* 1992. 31. 1617.
- 181.** H. Gao, N. Chidamabdrum, B. C. Chen, D. E. Pelham, R. Patel, R. Yang. A. Zhou. A. Cook, J S. Cohen, *Bioconjugak Chem.* 1994,5,445.
- 182.** JLH Chen. N. R Kallenbach, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. SOC.* 1989, 111, 6402
- 183.** Holliday R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5:282–304
- 184.** Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3240–44
- 185.** Qiu H, Dewan JD, Seeman NC. 1997. A DNA decamer with a sticky end: the crystal structure of d-CGACGATCGT. *J. Mol. Biol.* 267:881–98
- 186.** http://www.chem.uoa.gr/courses/Undergraduate/Biochem/Demopoulos/Biochemistry_Basic/bioch_Noukleinikai1.pdf

- 187.** Kallenbach N R, Ma R-I and Seeman N C 1983 An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides *Nature* 306 829–31
- 188.** Fu T-J and Seeman N C 1993 DNA double crossover structures *Biochemistry* 32 3211–20
- 189.** LaBean T, Yan H, Kopatsch J, Liu F, Winfree E, Reif J H and Seeman N C 2000 The construction, analysis, ligation and self-assembly of DNA triple crossover complexes *J. Am. Chem. Soc.* 122 1848–60
- 190.** Rothemund PWK. 2006. Scaffolded DNA origami for nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440:297–302
- 191.** Du SM, Stollar B D and Seeman N C 1995 A synthetic DNA molecule in three knotted topologies *J. Am. Chem. Soc.* 117 1194–200
- 192.** Wang H, Di Gate R J and Seeman N C 1996 An RNA topoisomerase *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93 9477–82
- 193.** Yin P, Hariadi RF, Sahu S, Choi HMT, Park SH, et al. Programming DNA tube circumferences. *Science* 2008, 321:824–826.
- 194.** Spiders at the Nanoscale: Molecules That Behave Like Robots, *ScienceDaily*, May 12, 2010