

DNA Origami – Die Herstellung einer Nanofigur

Ines Kast, 6d

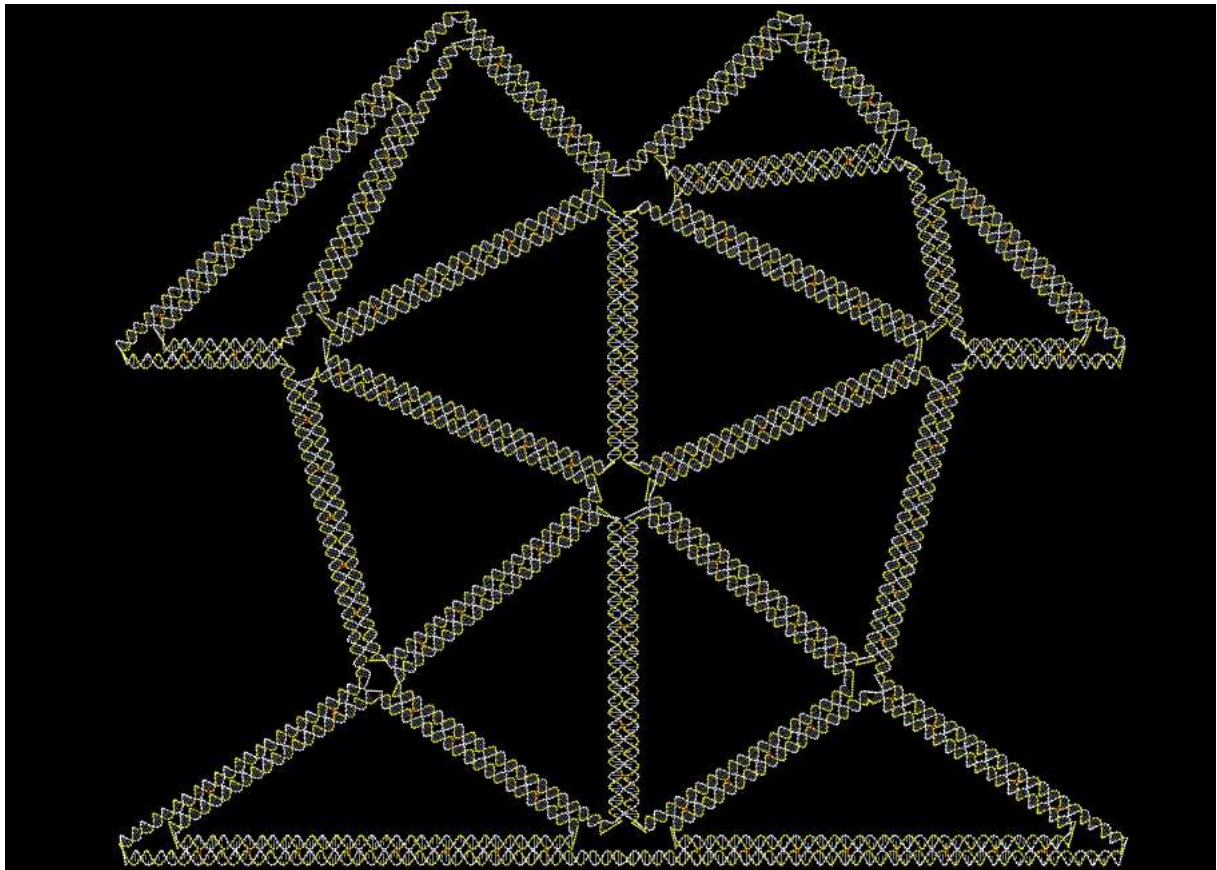
Kantonsschule Hohe Promenade

Gymnasium, Zürich

Schuljahr 2018/2019

Betreuende Lehrperson: Christian Bürkli

Korreferent: Dominique Grüter



1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	MOTIVATION UND THEMENFINDUNG	2
2.2	FRAGESTELLUNG	3
3	VORARBEITEN	4
3.1	COMPUTERPROGRAMME	4
3.1.1	<i>CaDNano und Maya</i>	4
3.1.2	<i>DAEDALUS und Meshlab</i>	4
3.1.3	<i>PERDIX und FreeCad</i>	4
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE PROTOKOLLE	6
3.3	ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM)	6
3.4	EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNGSORTE	7
3.5	SPONSORENANFRAGEN	7
4	MATERIAL UND METHODEN	8
4.1	COMPUTERPROGRAMME	8
4.2	OLIGOMIX	8
4.3	THERMOCYCLER	8
4.4	AGAROSEGEL	9
4.5	SEPHADEX-REINIGUNG	10
4.6	AFM	10
5	ERGEBNISSE	12
5.1	THEORETISCHE ARBEIT	12
5.1.1	<i>Design am Computer</i>	12
5.2	PRAKTISCHE ARBEIT	12
5.2.1	<i>Hybridisierung und Gel der ersten und zweiten Runde</i>	13
5.2.2	<i>AFM-Session 1</i>	16
5.2.3	<i>Hybridisierung und Gel der dritten Runde</i>	19
5.2.4	<i>AFM-Session 2</i>	22
5.2.5	<i>AFM-Session 3</i>	25
6	DISKUSSION	26
7	ZUSAMMENFASSUNG	29
8	DANK	30
9	QUELLENVERZEICHNIS	31
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	31
9.2	PUBLIKATIONEN	31
9.3	INTERNETQUELLEN	32
9.4	PROGRAMME UND VERSIONEN	32
10	ANHANG	33
10.1	OLIGONUKLEOTID-SEQUENZEN	33
10.2	PROTOKOLL FÜR PERDIX-FIGUREN (JUN ET AL., 2018)	41
10.3	SPONSOREN RECHNUNGEN	42
10.4	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	48

2 Einleitung

2.1 Motivation und Themenfindung

Schon anfangs Jahr habe ich mir Gedanken über das Thema meiner Maturarbeit gemacht. Mein Ziel war es, eine schöpferische Arbeit im Bereich der Naturwissenschaften auszuführen und etwas Eigenes einbringen zu können. Von mathematischen Begründungen für optische Täuschungen über die Knotentheorie (Dr. Meike Akveld, Departement für Mathematik, ETH Zürich) und verknotete Moleküle (Adams, 2004), (Kočar et al., 2016), (Savage, 2017) bin ich zu DNA Origami gekommen. Das Realisieren der Knotentheorie hat sich als eher schwierig erwiesen und entsprach nicht meiner Vorstellung von einer kreativen praktischen Arbeit. Der TED Talk von Paul Rothemund (Rothemund TED Talk, 2007), dem Erfinder von DNA Origami, hat mich schliesslich überzeugt. Mit einer eigenen DNA Figur könnte ich etwas machen, was zuvor noch nie jemand gemacht hat. Mein Wunsch, eine Eigenkreation herzustellen, wäre also erfüllt.

Die Figur, die ich gewählt habe, ist die Abstrahierung einer Zeichnung, die mein Grossvater früher immer gemalt hat, der Gwaggi (Abb. 1 und 2). Dieses Motiv gab mir eine riesige Motivation, das Projekt durchzuziehen und eine interessante Arbeit hervorbringen zu wollen.

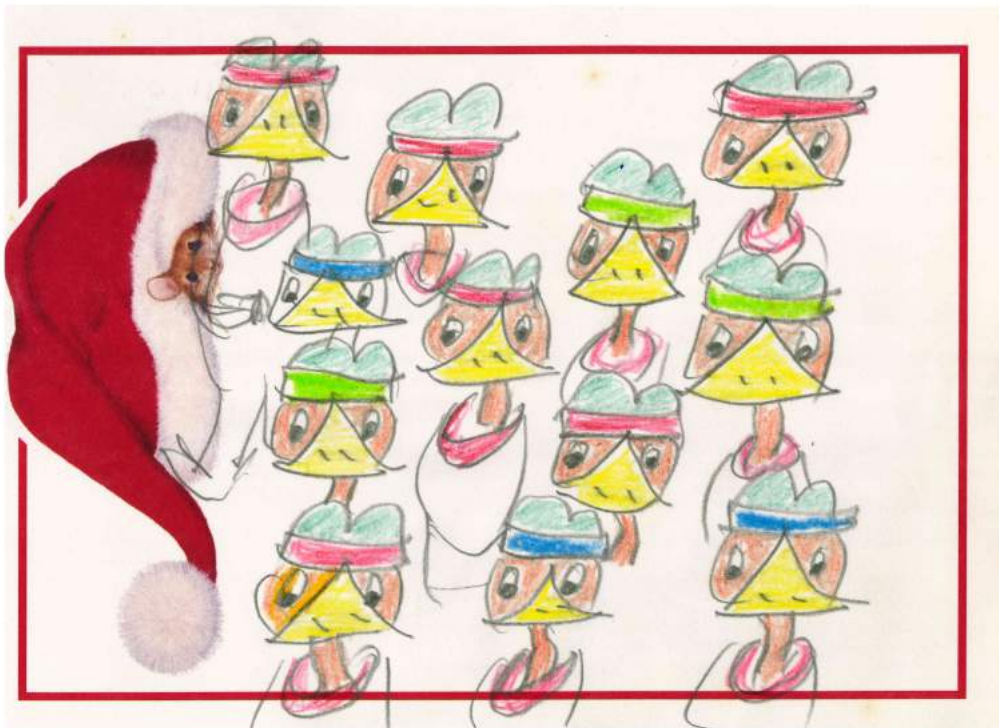


Abb. 1: Originalgwaggi, gezeichnet von meinem Grossvater (2003).

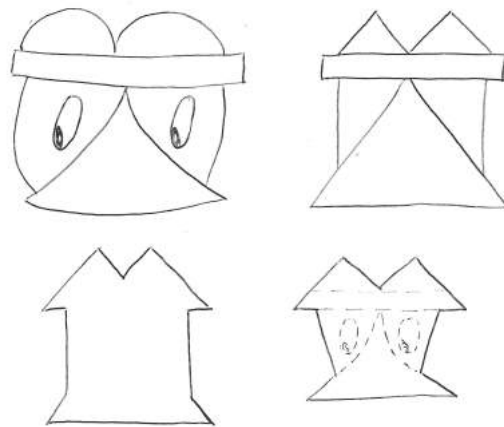


Abb. 2: Abstrahierung des Gwaggis: Die Verwandlung des ursprünglichen Gwaggis zur Vorlage meiner Figur.

2.2 Fragestellung

DNA Origami funktioniert so, dass die lange einzelsträngige DNA eines Bakteriophagen (in meinem Fall M13mp18) mithilfe von sogenannten Oligonukleotiden (Oligos) gefaltet wird. Diese Oligos sind kurze einzelsträngige DNA-Sequenzen (single-stranded DNA oder ssDNA), die mit der einen Hälfte an einen Teil der Phagen-DNA und mit der anderen Hälfte an einen anderen Teil der Phagen-DNA binden. So kann die DNA, für die es bei tiefen Temperaturen energetisch günstiger ist, zweisträngig zu sein, mit den richtigen Oligos gefaltet werden (Abb. 3).

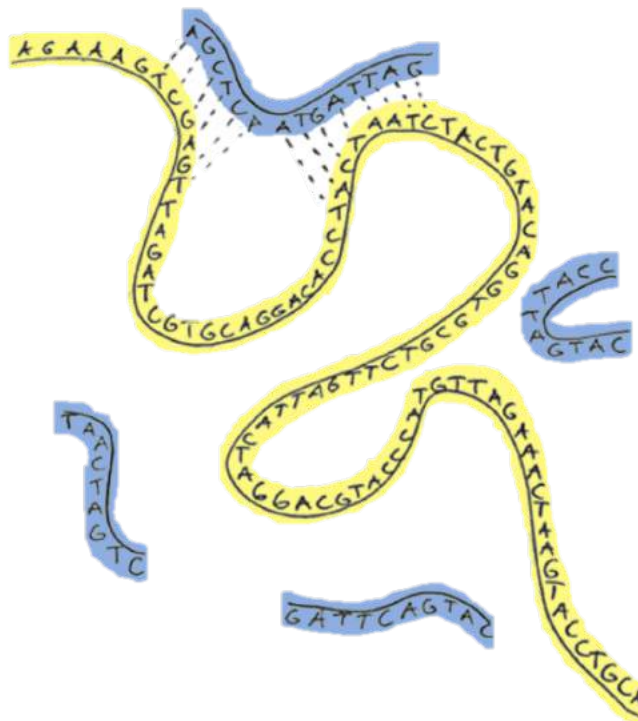


Abb. 3: Faltung der DNA. Die Basen der Oligos (blau) lagern sich an die komplementären Basen der ssDNA des M13mp18 Phagen (gelb) und falten ihn so.

Nun besteht die Frage, ob das Falten der Figur zum Gwaggi mit den in dieser Arbeit vorgeschlagenen Oligos vollständig gelingt.

3 Vorarbeiten

3.1 Computerprogramme

Zunächst habe ich versucht, anhand von Publikationen in Fachzeitschriften (*Rothemund, 2006*), (*Douglas et al., 2009*) und diversen Internetseiten (*DNA Origami Wikipedia, 2018*), (*Ten years of DNA origami, 2016*), (*How to Design 3D Origami, 2015*) herauszufinden, wie DNA Origami funktioniert. Ich bin auf die Programme CaDNAno und Maya gestossen und habe versucht, eine Figur zu designen. Jedoch war das eher schwierig, zumal ich keine Erfahrung mit diesen Programmen hatte. Parallel wurde ich durch ein anderes Paper (*Veneziano et al., 2016*) auf das Programm DAEDALUS aufmerksam, welches auf den ersten Blick mit meinem Wissen einfacher zugänglich erschien, es aber wider Erwarten recht kompliziert war. Ich war auf externe Hilfe angewiesen:

3.1.1 CaDNAno und Maya

Prof. Paul Rothemund (Caltech), der Erfinder von DNA Origami, schlug mir als für meine Kenntnisse geeignet vor, die CaDNAno legacy Version zu benutzen, die jedoch auf meinem Betriebssystem nicht mehr funktionierte. Die neuere Version CaDNAno2 braucht das Programm Maya, um die Figur zu designen. Ich habe beide Programme installiert und auch gleich mehrere Versuche gestartet, eine einfache Figur zu konstruieren. Das hat sich als ziemlich schwierig herausgestellt, da die YouTube Tutorials, die ich mir zur Hilfe genommen habe (*Cadnano tutorial 1, 2012*), (*Cadnano tutorial 2, 2012*), (*Rendering cadnano models in Maya, 2016*), (*Cadnano Example, 2013*), nicht mit der gleichen Version von CaDNAno gearbeitet haben.

Prof. Shawn Douglas (UCSF), der Designer des Programms CaDNAno, meinte dann auf meine Nachfrage hin, die Figur sei zu kompliziert und das Projekt sei zu schwierig, um es alleine zu machen. Jedoch gab ich nicht auf und versuchte an anderen Stellen weiterzukommen, zumal ich mittlerweile schon viele Kontakte zu Experten mit DNA-Origami-Erfahrung geknüpft hatte.

3.1.2 DAEDALUS und Meshlab

Prof. Mark Bathe (MIT) und seine Gruppe haben das Programm DAEDALUS (*DNA Origami Sequence Design Algorithm for User-defined Structures*) erstellt. Als Input wird eine .ply Datei der Figur, die Mindestkantenlänge und die Sequenz der langen einzelsträngigen DNA eingegeben. Die Outputs (DNA-Sequenzen der Oligos, Modellbilder) werden dann per Mail zugeschickt. Die .ply Datei kann mit dem Programm Meshlab generiert werden. Jedoch bereitete mir schon das Herstellen eines ganz einfachen Quaders einige Schwierigkeiten und ich reüssierte nicht. Ausserdem müsste der Input eine 3D-Figur sein – mein Gwaggi war jedoch nur zweidimensional. Prof. Bathe hat mich auf ein Programm namens PERDIX aufmerksam gemacht, welches seine Gruppe noch am Entwickeln ist und besser für 2D-Figuren sein soll.

3.1.3 PERDIX und FreeCad

Das Programm PERDIX steht für *Programmed Eulerian Routing for DNA Designs using X-overs* und funktioniert im Prinzip gleich wie DAEDALUS. Als Input gibt man eine CAD Datei der zweidimensionalen Figur (.ply, .iges/.igs, .geo) ein, die Mindestkantenlänge, die Maschendichte (zwischen 0 und 1, je grösser desto grösser die Leerräume) und optional die einzelsträngige DNA-Sequenz. Die Datei für den Input kann im Programm FreeCad entworfen

werden. Man erstellt dort ein Drahtmodell der Figur (Abb. 4) und exportiert es als .iges Datei, damit man es im richtigen Format beim PERDIX Terminal eingeben kann. Als Output bekommt man verschiedene Modelle der Figur und die dafür nötigen Sequenzen.

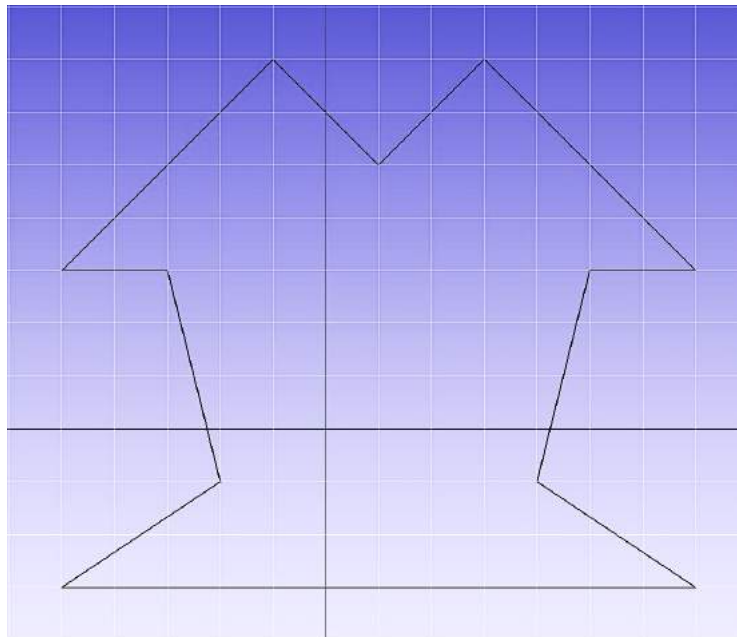


Abb. 4: Drahtmodell im Programm FreeCad (Farben bearbeitet).

Nun gab es hier natürlich auch wieder einige Komplikationen. Je nachdem, wie genau das Drahtmodell aussah, hatte die Figur mehr als 7249 Basen (Länge der ssDNA des M13mp18-Phagen), was sehr ungünstig war, denn erstens würden mit mehr Basen mehr teure Oligos benötigt werden und zweitens müsste ich eine andere Phagen DNA benutzen. Die M13mp18 DNA eignet sich besonders gut, da sie nicht allzu lang ist, aber doch genügend lang, um eine Figur zu falten. Zudem kommt sie schon natürlicherweise als ssDNA vor.

Das andere Problem waren die Oligos. Die Oligonukleotide sollten optimalerweise etwa 30-mere sein, da sie sonst mit einer Länge von über 35 Nukleotiden (nt) eine spezielle Reinigung bräuchten, die noch teurer wäre. Eine zu kleine Länge wäre auch eher ungünstig, da die Oligos dann nicht gut genug an die lange Phagen-DNA binden können. Die Grundeinstellung des Programms war, dass das Maximum bei 60 nt, das Optimum bei 40 nt und das Minimum bei 20 nt lag. Damit gab mir das Programm zwar eher weniger, dafür aber extrem lange Oligos an (128 Oligos über 35 nt). Dr. Hyungmin Jun (MIT), der PERDIX programmiert hatte, riet mir, ich solle diese Einstellung im source code bei „Para.f“ anpassen. Zum Glück kannte ich jemanden, der mit source codes vertraut war, Dr. Werner Wolz (IT Support, UZH). Er hat mir das Programm mehrfach mit verschiedenen Parametern angepasst: Mit der Einstellung 20-30-35 hat es mir nur 12 Oligos ausgegeben, die grösser als 35-mere waren, und 95 Oligos, die maximal 20 nt hatten. Das waren aber zu viele kurze Oligos. Dann hat er die Einstellungen auf 25-30-35 erhöht und ich habe 93 Oligos über 35-mere und 21 Oligos kleiner oder gleich 20-mere bekommen, was wiederum zu viele lange Oligos waren. Mit der darauf folgenden Einstellung von 22-30-35 waren 89 Oligos über 35-mere und 21 kleiner oder gleich 20-mere.

Die verschiedenen Versionen habe ich mit der Firma Microsynth AG (Balgach SG) besprochen. Microsynth AG hat die Oligos hergestellt und eingewilligt, alle zu sponsern. Mit meinen Daten der Versionen 25-30-35 und 22-30-35 konnten sie einige Oligos der 20-30-35er Liste zusammensetzen und längere daraus machen (siehe Anhang 10.1).

3.2 Molekularbiologische Protokolle

Um meine Figur auch experimentell zusammenbauen zu können, brauchte ich ein Protokoll mit den nötigen Parametern, das ich verfolgen konnte. In verschiedenen Publikationen (Rothmund, 2006), (Veneziano et al., 2016), (Douglas et al., 2009) hatte es ganz unterschiedliche Herangehensweisen, und da das Programm PERDIX, welches ich benutzt habe, noch nicht publiziert war, wusste ich nicht, welches Protokoll ich jetzt nehmen sollte. Die Hersteller des Programmes schickten mir auf meine Anfrage hin ihr noch nicht publiziertes Protokoll (Jun et al., 2018) (siehe Anhang 10.2) und beantworteten Unklarheiten.

Einige Parameter wurden in meinen Experimenten trotzdem noch variiert, um möglichst gute Konditionen für meine Gwaggifigur herauszufinden und damit bessere Ergebnisse zu erzielen (siehe Ergebnisse, Kapitel 5). Aufgrund der Resultate wurden die Konditionen bei der nächsten Experimentenrunde angepasst.

3.3 Atomic Force Microscopy (AFM)

Um zu sehen, ob meine Figur sich korrekt gefaltet hat, wurde ein Elektronenmikroskop benötigt. Das Atomic Force Microscope (AFM) ist ein Elektronenmikroskop, welches sehr kleine Objekte untersuchen und veranschaulichen kann. Doppelsträngige DNA mit einer Dicke von 1.8 bis 2.2 nm sollte damit gut erkennbar sein. Das AFM fährt die Probe mit der Spitze Reihe für Reihe ab. Ein Laser wird an der Spitze reflektiert und je nach Höhe der Spitze empfängt der Rezeptor (Quadrant Photodetektor) den Laser an einer anderen Position (Abb. 5). So kann vom Computer ein Höhenbild zusammengestellt werden: je höher die Oberfläche, desto heller das Bild.

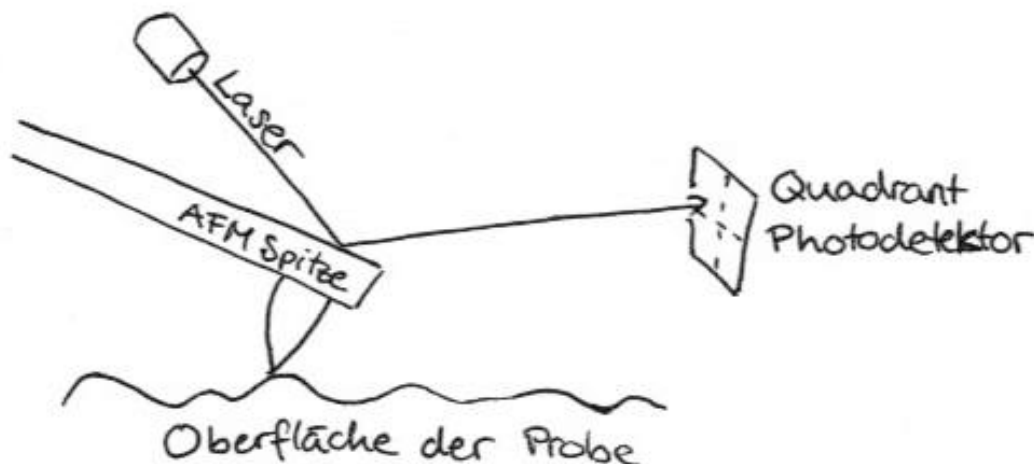


Abb. 5: AFM Skizze: Die AFM Spitze fährt der Oberfläche der Probe entlang und wird dabei von einem Laser bestrahlt. Je nach Neigung der Spitze wird der Laserstrahl in einem anderen Winkel reflektiert und trifft den Quadrant Photodetektor an einer anderen Position.

Das AFM hat zwar eine sehr dünne Spitze mit einem Durchmesser von nur etwa 10 nm, doch da meine Figur teilweise schmalere Löcher hat, sieht man diese nicht – die Spitze kommt gar nicht so tief nach unten (Abb. 6). Es kann also sein, dass man nur die grobe Form des Gwaggis als Fläche ohne Einbuchtungen erkennen würde.

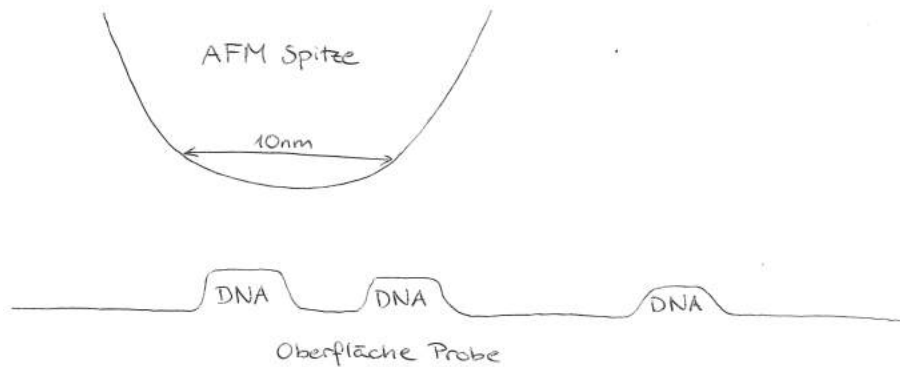


Abb. 6: AFM-Spitzendicke im Vergleich zur DNA. Die Doppelstrang-DNA hat einen Durchmesser von 1.8 bis 2.2 nm.

Es gibt verschiedene Messarten: in Flüssigkeit oder in Luft, mit verschiedenen Spitzen und mit unterschiedlichen Modi. Der Tastmodus in Flüssigkeit hat im Gegensatz zum Tastmodus im Trockenen den Vorteil, dass die DNA-Figuren nicht durch das Trocknen beschädigt werden. Dadurch, dass alles im Flüssigen ist und keine Verzerrung durch die Kapillarkraft stattfindet, werden die Bilder schärfer. Der Nachteil ist aber, dass die AFM Spitzen teurer sind und durch die Flüssigkeitsschicht sich mehrere Partikel überlagern können. Je nach Probe ist die eine Messart besser als die andere (Ankita Ray, ETH Zürich, persönliche Mitteilung).

3.4 Experimentelle Durchführungsorte

Für das Durchführen meiner Arbeit brauchte ich ein Labor mit entsprechenden Apparaturen. Prof. Alessandra Baumer war bereit, mir in ihrem Labor (Institut für Medizinische Genetik, UZH, Schlieren) Platz zu geben und mich bei meinen Experimenten zu unterstützen. Da dort mit DNA geforscht wird, waren Fachwissen und alle Geräte vorhanden, die ich benötigte.

An der ETH Zürich waren Ankita Ray (D-CHAB) und Dr. Shivaprakash Ramakrishna (Professur für Oberflächentechnik, D-MATL) bereit, mir mit dem AFM zu helfen. Ankita Ray hatte sogar schon eigene DNA-Origami-Erfahrung und konnte ihr Fachwissen gut einbringen.

3.5 Sponsorenanfragen

Um meine Arbeit durchziehen zu können, musste ich Sponsoren überzeugen. Meine Arbeit war sehr kostenaufwändig und alleine konnte ich nicht alles finanzieren.

Zunächst habe ich unterschiedliche Firmen angeschrieben, die mich mit einem Betrag oder mit Material unterstützen könnten. Von vier Organisationen, die ich angefragt habe, haben drei zugesagt: Microsynth AG (hat alle Oligos im Wert von CHF 5'394.09 gesponsert), die Naturwissenschaftliche Gesellschaft Winterthur, kurz: NGW (war bereit, CHF 1000.- an die Arbeit zu zahlen) und BioConcept (schenkte mir $4 \times 10 \mu\text{g}$ der ssDNA des M13mp18 Phagen im Wert von CHF 284.-) (siehe Anhang 10.3). Schweizer Jugend Forscht, die vierte Anlaufsstelle, die ich hatte, unterstützt Maturarbeiten nicht mit Geldbeträgen.

Die Beträge, die ich aufgrund der Vorhersagen von Prof. Rothmund (Caltech) und Prof. Douglas (UCSF) kalkuliert hatte, lagen weit unter den tatsächlichen Kosten. Dies bereitete mir einige Schwierigkeiten bei der Organisation des Geldes. Nachdem P. Lippuner (Präsident der NGW) mir CHF 1000.- zugesichert hatte, war ich hoch erfreut und dachte, alle Kosten wären schon gedeckt. Aber bald wurde klar, dass die Preise für Oligos in der Schweiz höher als in den USA sind und ich trotz der CHF 1000.- viel zu wenig Geld zur Verfügung hatte.

Schliesslich hat mir Microsynth aber alle Oligos gesponsert. Mit dieser Entwicklung brauchte ich die CHF 1000.- der NGW nicht mehr und werde sie jetzt, nach Abschluss der Arbeit wieder zurückgeben. Dennoch haben mir die Zusprüche der NGW sehr geholfen. Sie haben mich in meinem Projekt bestärkt und mir bei den Verhandlungen mit den Firmen viele Türen geöffnet.

4 Material und Methoden

4.1 Computerprogramme

Die Figur wurde nach der handgezeichneten Vorlage meines Grossvaters (Abb. 1) mit dem Zeichnungsprogramm FreeCAD abstrahiert und entworfen. Das daraus entstandene Drahtmodell wurde in das Terminal des Programmes PERDIX eingesetzt. PERDIX schlug aufgrund verschiedener Parameter (Mindestkantenlänge, Maschendichte) die für die Figur notwendigen DNA-Sequenzen (Oligonukleotide) vor und generierte Modelle daraus.

4.2 Oligomix

Die Oligos (siehe Anhang 10.1) wurden bestellt und als Gemisch im richtigen Verhältnis zusammenpipettiert, da es unmöglich war, für jedes Experiment von jedem Oligo winzig kleine Mengen zu pipettieren. Von den 251 Oligos wurden je 20 µl zusammengemischt.

Um die DNA Stränge korrekt aneinanderzulagern, mussten die Oligos (erhalten von Microsynth AG, Balgach SG) mit der ssDNA des M13mp18-Phagen (gesponsert von BioConcept, Allschwil BL) im richtigen Verhältnis und in der richtigen Pufferlösung zusammengemischt, aufgeheizt (denaturiert) und langsam wieder abgekühlt (hybridisiert) werden. Um gute Ergebnisse zu bekommen, wurden in verschiedenen Ansätzen Oligokonzentration, Salzkonzentration der Pufferlösung und Abkühlungszeit (Hybridisierungszeit) variiert (siehe Ergebnisse, Kapitel 5).

Die Pufferlösung war der 5x TAE Mg²⁺ Puffer. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt:

- 200 mM TRIS, pH 8
- 100 mM Essigsäure
- 10 mM EDTA, pH 8
- 62.5 mM Mg²⁺ Acetat, pH 8

4.3 Thermocycler

Damit die Temperaturänderung für das Aneinanderlagern der DNA exakt verläuft, wird in einem sogenannten Gradienten-Thermocycler (*SensoQuest Labcycler, Labcycler 48 Gradient Thermocycler with non-removable 48-well aluminium block*) ein Programm erstellt, das die Temperatur stetig sinken lässt. Darin wurden 84 µl Ansätze zuerst auf 94 °C erhitzt, damit allfällig gebildete doppelsträngige Strukturen vollständig denaturierten. Anschliessend wurden sie in kleinen Schritten von 90 °C bis 25 °C langsam abgekühlt und schliesslich bei 4° C gehalten. Von den fertig hybridisierten Proben wurden je 20 µl weiterverwendet, um damit einerseits die DNA-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 4.4) zu trennen und zu visualisieren, und andererseits, um sie einer Sephadex-Reinigung (Kapitel 4.5) zu unterziehen.

4.4 Agarosegel

In einem Agarosegel werden die DNA-Moleküle nach ihrer Grösse aufgetrennt. Kleinere Fragmente laufen schneller und grössere brauchen mehr Zeit, um durch die Poren des Gels zu kommen. Das Agarosegel wird gebraucht, um zu sehen, welche Proben eher gelungen sind und welche eher nicht. Da mein Produkt ziemlich gross sein würde, aber dennoch durchkommen sollte, wurde ein sehr weiches Gel (grosse Poren) mit nur 0.3% Agarose gegossen (0.3 g Standard Agarose und 100 ml 1x TAE Mg²⁺ Puffer und 5 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid). Der 1x TAE Mg²⁺ Puffer erhielt man, indem man von der 5x TAE Mg²⁺ Stocklösung eine fünffach verdünnte Lösung vorbereitete: Man nahm zum Beispiel 20 ml 5x TAE Mg²⁺ Stocklösung und füllte mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) auf 100 ml auf.

Das Gel wurde nach dem Erstarren in die Apparatur (Abb. 7) gesetzt. Anschliessend wurde diese mit 1x TAE Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig überdeckt war. 20 µl der Proben wurden mit 20 µl vom Blue-Juice-Ladepuffer gemischt, der aus Folgendem besteht:

- 5 ml Glycerin
- 500 µl 2% BPB (Bromphenolblau)
- 500 µl 2% Xylencyanol
- 500 µl 0.5 M EDTA
- 500 µl 1 M TRIS-HCl, pH 7.4
- mit ddH₂O auf 10 ml auffüllen

Den Ladepuffer braucht man, damit die Proben in den Geltaschen absinken und um mit den Farbstoffen, die drin sind, zu zeigen, wie weit sich die Marker im elektrischen Feld bewegt haben.

Wenn man eine Spannung anlegt, bewegen sich die Proben im elektrischen Feld. Der 1x TAE Mg²⁺ Puffer leitet wegen seinen Ionen den Strom, und da DNA negativ geladen ist, läuft sie zum positiven Pol. Was nun noch ein Problem darstellte, war, dass das 0.3% Gel sehr weich war und bei erhöhter Temperatur, die durch den Strom (21 mA) entstand, schmelzen konnte. Die Lösung dafür war ein Eisbad um die Apparatur herum und eine tiefe Spannung von 70 V (Abb. 7).



Abb. 7: Agarosegel unter Spannung im Eisbad.

Nach einer gewissen Zeit wurde das Gel angehalten und in der Apparatur *ImageMaster VDS* (*Pharmacia Biotech*) unter UV fotografiert. Durch das fluoreszierende Ethidiumbromid wurden die DNA Banden unter UV-Bestrahlung sichtbar (siehe Ergebnisse, Kapitel 5).

4.5 Sephadex-Reinigung

Die Sephadex-Reinigung ist eine sanfte Reinigung. Sie bezweckt, dass DNA-Moleküle nach Grösse aufgetrennt werden. Kleine Moleküle wie Oligonukleotide bleiben in den Poren der Sephadexkügelchen stecken, während grosse Moleküle keinen Platz in den Poren haben und ausgewaschen werden.

Für die Herstellung der Sephadexsäule wurde das Sephadexpulver (Sephadex G-50 Superfine) in einer 96-Well-Platte mit ddH₂O über Nacht aufgeweicht. So entstand eine Gelartige Masse. Jedes Well hat unten ein feines Loch, sodass beim Zentrifugieren das übrige Wasser herauszentrifugiert werden kann (*Centrifuge 5430, Eppendorf*). Darauf wurden nun 20 µl der Proben geladen und mit 940 rcf (relative centrifugal force) fünf Minuten lang zentrifugiert. Dabei blieben kleine DNA-Moleküle wie die kurzen Oligos im Sephadexgel zurück. Was in der Auffangplatte herauskommen sollte, war also das, was nicht durch die Poren kommt, nämlich grössere und hoffentlich auch gefaltete Strukturen.

4.6 AFM

Die Proben für meine AFM Aufnahmen wurden auf eine Mica Platte deponiert (Abb 8) und für die beiden Messarten im Tastmodus unterschiedlich präpariert:

Für das Messen im Trockenen wurden die Proben wie folgt vorbereitet (Abb 9):

- Auf einer frisch klavierten Mica Platte (d.h., die oberste Schicht wurde mit Klebeband entfernt), die auf zwei Objektträgern festgemacht war, wurden 2 µl der zu analysierenden Probe platziert
- Dann wurde 1 µl 100 mM NiCl₂ in die Mitte hinzugefügt
- Anschliessend wurden 20 µl 1x TAE-Mg²⁺ Puffer ergänzt
- Nach 30 Sekunden wurde das ganze mit ddH₂O gewaschen, indem 40 µl in 10 µl Schritten auf die schräg gehaltene Probe (etwa 45°) getropft wurden. Anschliessend wurde die Flüssigkeit mit einem Tüchlein von unten abgesaugt
- Zum Schluss wurde die Probe mit N₂ getrocknet

Für das Messen in Flüssigkeit wurden die Proben wie folgt vorbereitet:

- Auf einer frisch klavierten Mica Platte, die auf zwei Objektträgern festgemacht war, wurden 2 µl der zu analysierenden Probe platziert
- Dann wurde 1 µl 100 mM NiCl₂ in die Mitte hinzugefügt
- Nach 30 Sekunden wurden, ohne dass die Probe schräg gehalten wurde, 80 µl 1x TAE-Mg²⁺ Puffer hinzugefügt
- An die AFM Spitze wurden zusätzlich 40 µl des Puffers pipettiert, damit Spitze und Probe in einem homogenen Milieu waren
- Vor dem Messen wurde die Probe mindestens für 10 Minuten zum Einwirken stehen gelassen

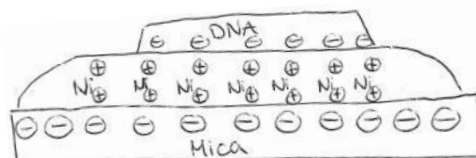


Abb. 8: Probe auf Mica: Die Mica Platte ist negativ geladen. Mit den positiven Ladungen des Nickels, das hinzugegeben wurde, konnte die negativ geladene DNA an die Oberfläche gebunden werden.

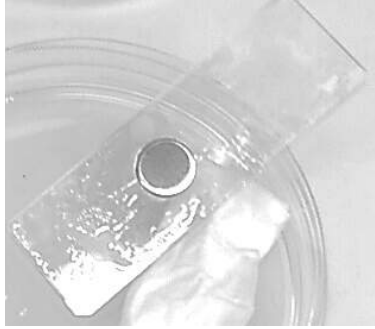


Abb. 9: getrocknete Probe auf einer Mica Platte.

Für die Proben nach der Lufttrocknung wurde das AFM so eingestellt:

AFM-Spitzen vom Typ RTESPA mit einer Federkonstante von 26 N/m wurden im Tastmodus mit luftgetrockneter Origami-DNA verwendet. Nach dem Scharfstellen auf die Oberfläche umfasste das abgebildete Feld eine Grösse von 500 nm. Nach dem ersten Kontakt wurde eine interessante Region ausgesucht. Wenn die Oberfläche gut abgetastet werden konnte, wurde die Scan-Grösse auf 2 μm erweitert und die Z-Achsenverschiebung des Piezoelements auf 2 μm reduziert, um eine bessere Auflösung zu bekommen. Die auf die Probe ausgeübte Kraft der Spitze wurde während der ganzen Messung auf unter 100 pN gehalten, um die Origami-Figur nicht zu stark zusammenzupressen. Die Bilder wurden mit einer Pixelgrösse von 512 x 512 und einer Scan-Rate von 1 Hz aufgenommen.

Für die Proben in Flüssigkeit wurde das AFM so eingestellt:

AFM-Spitzen vom Typ HIRS-SSB wurden mit einer Federkonstante von 0.1 N/m für die Messungen in Flüssigkeit verwendet. Die Kontakteinstellungen wurden auf 0.05 V gesetzt, um einen sanften Kontakt mit der DNA-Origami-Probe sicherzustellen. Für erste Testaufnahmen wurden jeweils die Instrumenten-Einstellungen 10 nm Scan-Grösse, maximale Kraft der Spitze 50 pN, gemessenes Feedback Signal 5 und maximale Auslenkung 10 nm gewählt, sodass die Spitze immer sehr nahe bei der Probe blieb. Wenn auf diese Art die Oberfläche gut abgetastet werden konnte, wurde die Scan-Grösse auf 2 μm erweitert und die Z-Achsenverschiebung des Piezoelements auf 2 μm reduziert, um eine bessere Auflösung zu bekommen. Die auf die Probe ausgeübte Kraft der Spitze wurde während der ganzen Messung auf unter 100 pN gehalten, um die Origami-Figur nicht zu stark zu komprimieren. Die Pixelgrösse der Bilder und die Scan-Rate waren gleich wie bei den luftgetrockneten Proben.

Das AFM der ETH Zürich, Departement für Materialwissenschaften, welches für die Messungen benutzt wurde, war ein *Bruker Dimension Icon with ScanAsyst* (Abb. 10).



Abb. 10: Probe unter dem AFM.

5 Ergebnisse

5.1 Theoretische Arbeit

5.1.1 Design am Computer

Abb. 11 zeigt, wie meine Figur aussehen soll, wenn sich alles perfekt faltet:

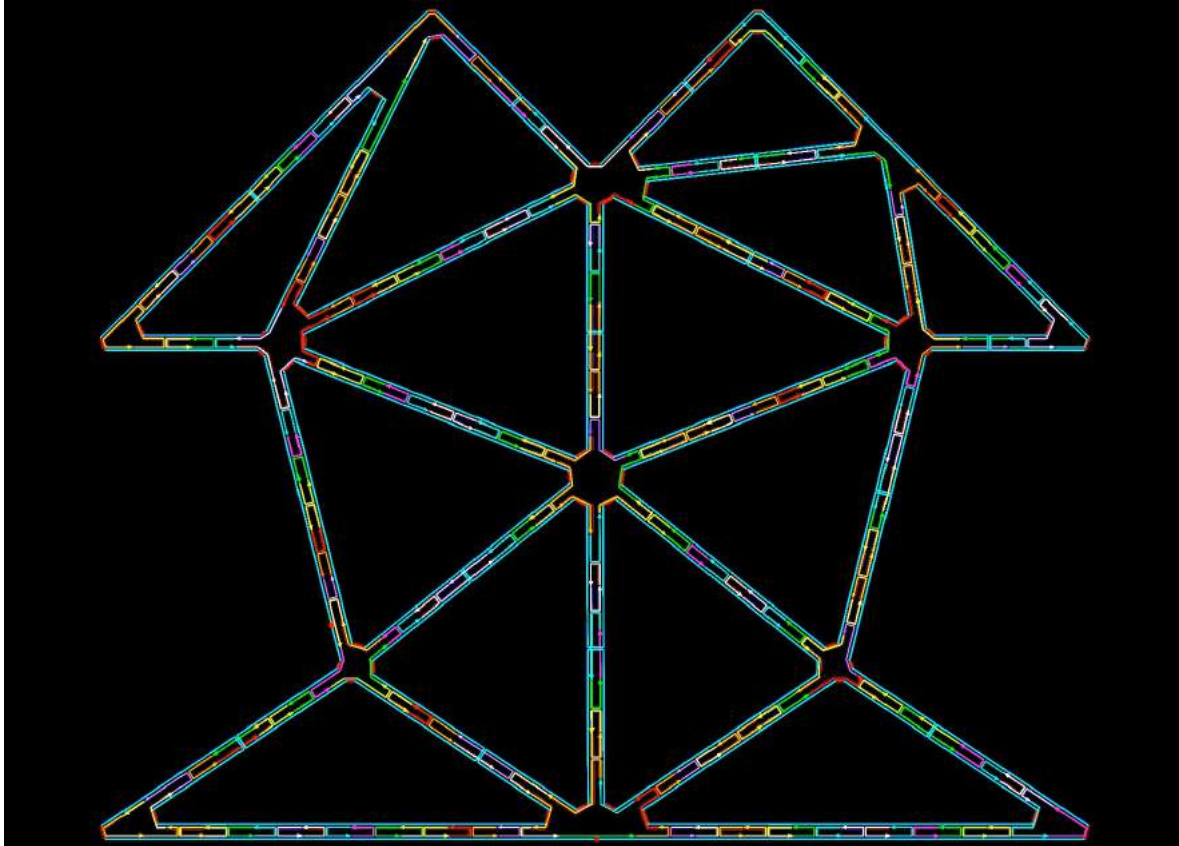


Abb. 11: PERDIX Output mit Mindestkantenlänge 38 nt, Maschendichte 0.99 und die ssDNA des M13mp18 Phagen als Gerüst, Version 20-30-35 (Farben bearbeitet).

5.2 Praktische Arbeit

Um die Chancen auf gute Ergebnisse zu erhöhen, wurden verschiedene Bedingungen ausprobiert. Beim Vorgehen hielt ich mich an das Protokoll des Manuskripts „Autonomously designed free-form 2D DNA origami“ (Jun et al., 2018).

5.2.1 Hybridisierung und Gel der ersten und zweiten Runde

Laut dem Protokoll musste der Gradient des PCR-Thermocyclers so programmiert werden, wie es in der Tabelle 1 zusammengestellt ist.

	Mittlere Intervalltemperatur in °C	Gradient +/- °C	Zeit hh:mm:ss
Start	90		
1. Intervall	88	-2	00:05:00
2. Intervall	78	-8	01:20:00
3. Intervall	55	-15	07:30:00
4. Intervall	32	-8	02:50:00
5. Intervall	4		∞

Tabelle 1: Temperaturregime im Thermocycler für die erste und zweite Runde: Von 90 °C bis 4 °C in etwa 12 Stunden: 90 °C bis 86 °C mit einer Temperaturabnahme von 4 °C pro 5 Minuten; 85 °C bis 70 °C mit einer Temperaturabnahme von 1 °C pro 5 Minuten; 70 °C bis 40 °C mit einer Temperaturabnahme von 1 °C pro 15 Minuten; 40 °C bis 25°C mit einer Temperaturabnahme von 1 °C pro 10 Minuten; am Schluss halten bei 4 °C. – Nach Protokoll (Jun et al., 2018).

Die zusammenpipettierten Proben 1 bis 9 (Tabellen 2 und 3), sowie die Negativkontrollproben OM und OO (Tabelle 3) wurden in Temperaturschritten, wie in Tabelle 1 gezeigt, hybridisiert.

5.2.1.1 Erste Runde

Beschriftung	1	2	3	4	5
	10x Oligos	10x Oligos, 2x Mg ²⁺ Ac.	10x Oligos, 3x Mg ²⁺ Ac.	3.5x Oligos	5x Oligos
M13mp18	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Oligomix	21 µl	21 µl	21 µl	7.3 µl	10.5 µl
5x TAE	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl
0.5 M Mg²⁺ Ac.	-	2.1 µl	4.2 µl	-	-
H₂O	38.2 µl	36.1 µl	34 µl	51.9 µl	48.7 µl
Endvolumen	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl

Tabelle 2: Erste Runde: Variation der Oligo- und Mg²⁺ Acetat-Konzentration. Die Ansätze bestehen aus der ssDNA des M13mp18 Phagen, dem Oligomix (mit allen 251 Oligos drin), dem 5 x TAE-Puffer, ddH₂O und allenfalls zusätzliches 0.5 M Mg²⁺ Acetat.

Nach Beendigung des Hybridisierungsprozesses, wurde ein Teil der Probe mit dem Blue-Juice gemischt, in die Taschen des Agarosegels gegeben und laufen gelassen. Nach einer Stunde wurde das Gel gestoppt und unter UV-Licht angeschaut. Durch das Ethidiumbromid, das im Gel enthalten war, leuchteten die verschiedenen DNA-Banden (Abb. 12).

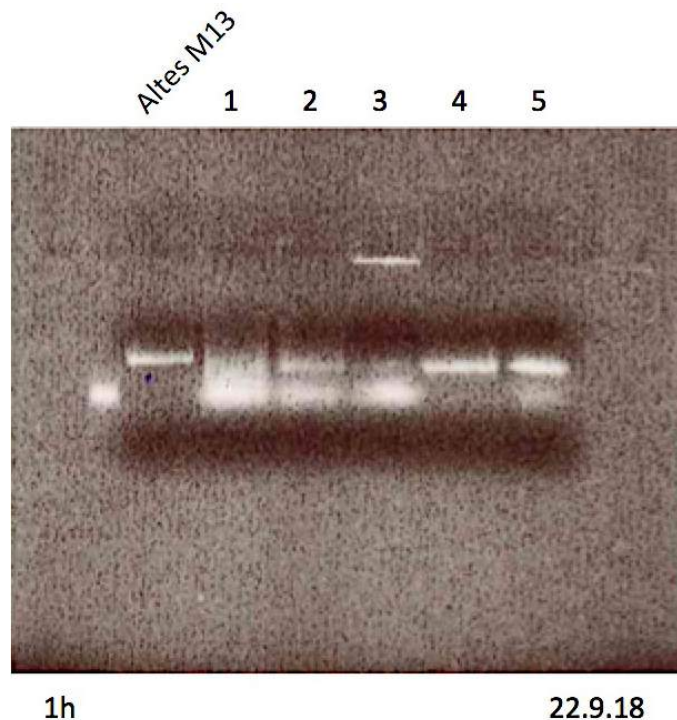


Abb. 12: Agarosegel nach der ersten Hybridisierungsrunde. Nummerierung der Proben: siehe Tabelle 2.

Die erste schmale Spur in der Abb. 12 zeigte eine Kontrollbande, die für mein Projekt irrelevant war. Die zweite Spur enthielt die DNA einer alten M13 Probe, die Dr. Wolz noch bei sich gefunden hatte. Wider Erwarten schien sie noch von guter Qualität und gab eine klare Bande. Die folgenden 5 Taschen wurden mit den Proben 1 bis 5 aus der Tabelle 2 gefüllt. Die zwei dunklen Streifen, die auf dem Gel klar erkennbar waren, waren die beiden Farbstoffe des Blue-Juice-Ladepuffers.

Im Gel sah man unerwarteter Weise ziemlich deutliche Banden. Jedoch war die Identität der Banden nicht klar. Die oberen Banden konnten die ungefalteten ssDNAs des M13mp18 Gerüsts gewesen sein und die unteren Banden die gefalteten Strukturen, da diese vielleicht kompakter waren und besser durch das Gel kamen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die oberen Banden die richtig gefalteten Figuren und die unteren Banden die kleineren ungefalteten Oligonukleotide waren, da die Oligos immer im Überschuss dazugegeben wurden und deswegen ein Teil übrig bleiben musste. Auf jeden Fall brauchte ich für das nächste Gel Kontrollbanden, die anzeigen würden, wo sich die ungefalteten Oligos und das Phagengerüst befänden.

Es war auch merkwürdig, dass in der Tasche der Probe 3 ein Teil zurückgeblieben war. Es konnte sein, dass da die Salzkonzentration zu hoch gewesen ist, das Salz ausgefallen und damit ein Teil der DNA nicht weitergekommen war.

Auffällig war, dass die 4. Probe mit der tiefsten Oligokonzentration fast keine untere Bande hatte. Die Intensität der unteren Bande und somit auch die Menge dieser DNA war proportional zur Oligokonzentration. Entweder wurden die Oligos der 4. Probe ganz aufgebraucht und es existierte deswegen kaum noch eine „Oligowolke“, oder es existierte keine vollständige Faltung, da die Oligos eine zu kleine Konzentration hatten und nicht den richtigen Platz an der langen einzelsträngigen DNA gefunden hatten. Interessant wäre es, die Probe 4 unter dem AFM anzuschauen, um zu sehen, was diese deutlich sichtbare Bande beinhaltet.

Zu berücksichtigen war, dass durch einen Rechnungsfehler, bei dem mit zweisträngiger statt mit einzelsträngiger DNA gerechnet wurde (*DNA & Nucleotide properties, 2016*), die Konzentration der Oligos nur halb so gross war, wie sie nach dem Standard-Protokoll eigentlich hätte sein sollen. Da der Fehler aber erkannt wurde, war es nicht weiter schlimm, diese Bedingungen auch ausprobiert zu haben. In der nächsten Runde wäre es dennoch interessant zu sehen, wie das Gel aussähe, wenn man genau nach dem Protokoll von Dr. Jun arbeiten würde, und was passieren würde, wenn mehr Salz dazugegeben wird oder die Oligokonzentration noch mehr erhöht wird (Tabelle 3).

5.2.1.2 Zweite Runde

Beschriftung	OM	OO	6	7	8	9
	Ohne M13	Ohne Oligos	Exakt nach Protokoll	30x Oligos	2x Mg ²⁺ Ac.	3x Mg ²⁺ Ac.
M13mp18	-	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Oligomix	21 µl	-	21 µl	31.5 µl	21 µl	21 µl
5x TAE	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl
0.5 M Mg ²⁺ Ac.	-	-	-	-	2.1 µl	4.2 µl
H ₂ O	46.2 µl	63.2 µl	42.2 µl	31.7 µl	42.1 µl	40 µl
Endvolumen	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl

Tabelle 3: Zweite Runde: Kontrollen ohne M13mp18 Phagen DNA, ohne Oligomix und Variationen 6 bis 9.

Gleich wie bei den Proben 1 bis 5 wurden die neuen Ansätze unter gleichen Konditionen im Thermocycler hybridisiert und anschliessend ein Teil davon mit dem Blue-Juice-Ladepuffer in die Geltaschen eingefügt. Das Gel lief auch wieder für eine Stunde, wurde dann gestoppt und im UV-Licht angeschaut (Abb. 13).

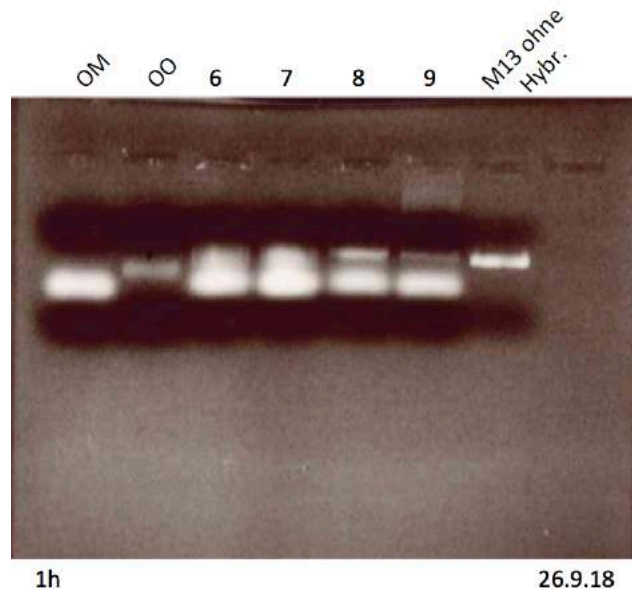


Abb. 13: Agarosegel nach der zweiten Hybridisierungsrunde. Nummerierung der Proben: siehe Tabelle 3.

Die erste Tasche wurde mit einer Probe gefüllt, die anzeigte, wo die ungefalteten Oligos wären. Da ich überall einen Überschuss an Oligos zugegeben hatte, erwartete ich, dass in jeder Probe 6 bis 9 eine solche Bande auftritt. Die OO Probe zeigte, wo die M13mp18 ssDNA wäre, wenn sie sich nur mit sich selbst und nicht mit den Oligos falten würde. Zum Glück hatte ich diese Bande sonst in keiner Probe. Daraus folgte, dass sich in jeder Probe 6 bis 9 die lange ssDNA mit Oligos gefaltet hatte. In die letzte Tasche wurde wie in der letzten Runde 5 µl der M13mp18 ssDNA mit 5 µl des Blue-Juice-Ladepuffers gegeben, ohne dass die DNA vorher mit den anderen Proben im Thermocycler war.

Sehr gut beobachten konnte man, dass die Intensitäten der unteren Banden proportional zur Zugabemenge der Oligos waren. Das unterstützte meine Theorie, dass es sich dabei um die ungefalteten Oligos handelte.

In diesem Gel sah man wieder ganz klar, dass die Probe 9 mit dem meisten Salz eine Ausschweifung gegen oben hatte. Wie in der letzten Runde vermutete ich auch hier, dass es sich um das Ausfallen des Salzes mit etwas DNA handelte. Die Spuren der Proben 6 und 7 wiesen einen Übergang zwischen der unteren und der oberen Bande auf. Dieser Übergang könnte teilgefaltete Figuren beinhaltet haben.

Die Probe 8 sah sehr interessant aus, da die zwei Banden klar getrennt waren. Wenn die obere Bande mein Produkt wäre, könnte man mit der Sephadex-Reinigung die untere Bande wegreinigen. Nach meiner Theorie würde dann unter dem AFM nur die entworfene Figur ohne übrige Oligonukleotide sichtbar sein.

5.2.2 AFM-Session 1

Für die erste AFM Runde durfte ich zwei Proben vorbereiten und beide Messarten, trocken und flüssig, ausprobieren. Da das Agarosegel zwei klare Banden hatte, die vielversprechend aussahen, wollte ich bei meiner begrenzten AFM Zeit möglichst gut wissen, was die Banden zu bedeuten haben, um für die nächste Runde die erfolgversprechendsten Proben auszuwählen. Dafür schienen mir die Proben 4 und die gereinigte Probe 8 am interessantesten und aufschlussreichsten.

5.2.2.1 Die Probe 4 im AFM

Die Probe 4 wurde trocken gemessen (Abb. 14 und 15). In Abb. 14 erkennt man, dass sich viele DNA Stücke an die Phagen-DNA gelagert hatten, sodass eine bienenwabenartige Struktur sichtbar war. Mein Gwaggi ist auch aus solchen Strukturen aufgebaut (Abb. 11), die man sieht, wenn sich nicht alle Oligos angelagert haben: Aus den Dreiecken werden Sechsecke. Die Länge und Breite der Figur in Abb. 14 entsprach ungefähr der, die ich für meine Figur erwartet hatte; der Mustergwaggi hätte die Masse $140\text{ nm} \times 120\text{ nm} \times 2\text{ nm}$. Die Dicke der Figur unterscheidet sich aber vom Mustergwaggi (Abb. 15) (siehe Diskussion, Kapitel 6). Andere Bilder dieser Probe haben grössere Figuren, die aber der Wabenstruktur dieser gleichen. Wahrscheinlich haben sich dort mehrere Phagen-DNAs die Oligos geteilt. Das heisst, das gleiche Oligonukleotid hat sich an seinen zwei Enden je an einen anderen Phagen angelagert. So kann eine grössere Figur aus zwei oder mehr Phagen-DNAs entstehen.

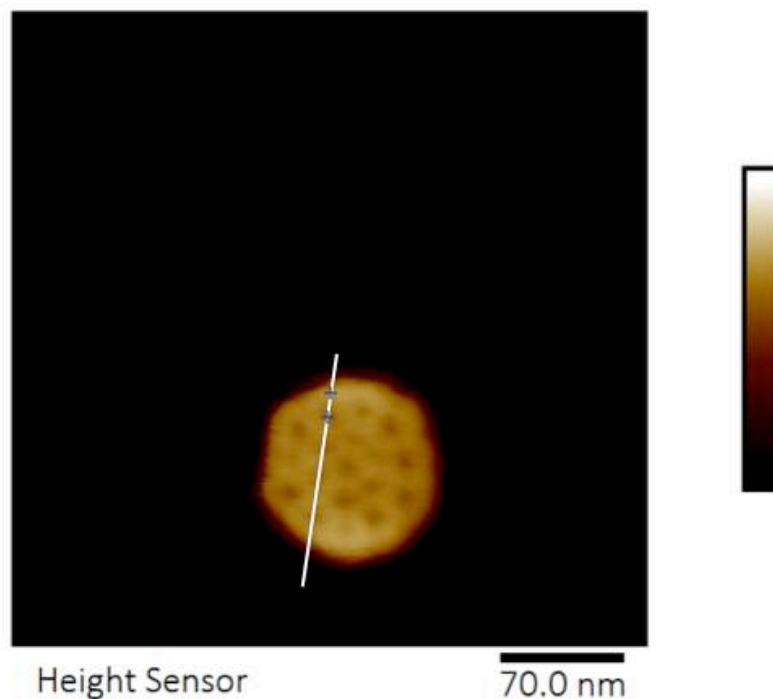


Abb. 14: Probe 4 unter dem AFM, Bild bearbeitet: Nullte Ebenenordnung. Der weisse Strich zeigt, von wo bis wo das Höhenprofil (Abb. 15) gemessen wurde. Die blauen Kreuze sind in der Abb. 15 vertikale blaue Linien.

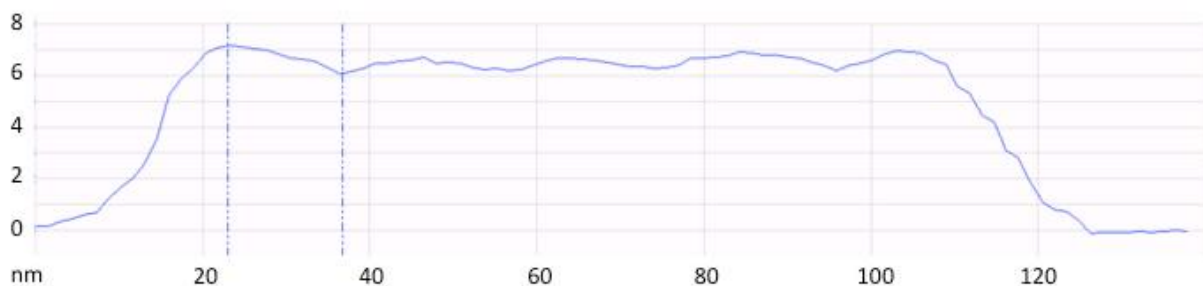


Abb. 15: Höhenprofil der Abb. 14: Der Höhenunterschied der beiden blauen Kreuze in der Abb. 14, hier markiert mit zwei vertikalen blauen Strichen, beträgt 1.066 nm . Die Höhe der Figur beträgt etwa 6 nm . Die Löcher, welche die Figur beinhaltet, waren zu eng für die AFM Spitze (siehe Abb. 6). Deswegen ist der Höhenunterschied nicht sehr extrem, aber dennoch sichtbar.

5.2.2.2 Die Probe 8 im AFM

Die Probe 8, die durch die Reinigung konzentriert wurde, habe ich in Flüssigkeit gemessen (Abb. 16 und 17). Diese Messung ergab nicht sehr schöne Bilder. Es könnte an verschiedenen Dingen gelegen haben. Womöglich waren die Einstellungen der AFM-Parameter nicht optimal. Man sah zwar ähnlich gefaltete DNA Strukturen wie bei der Probe 4, jedoch traten diese sehr viel seltener auf. Dies könnte einerseits daran gelegen haben, dass die Reinigung einiges an Produkt weggewaschen oder zerstört hatte, oder andererseits, von Anfang an nicht viele grosse Strukturen vorhanden waren.

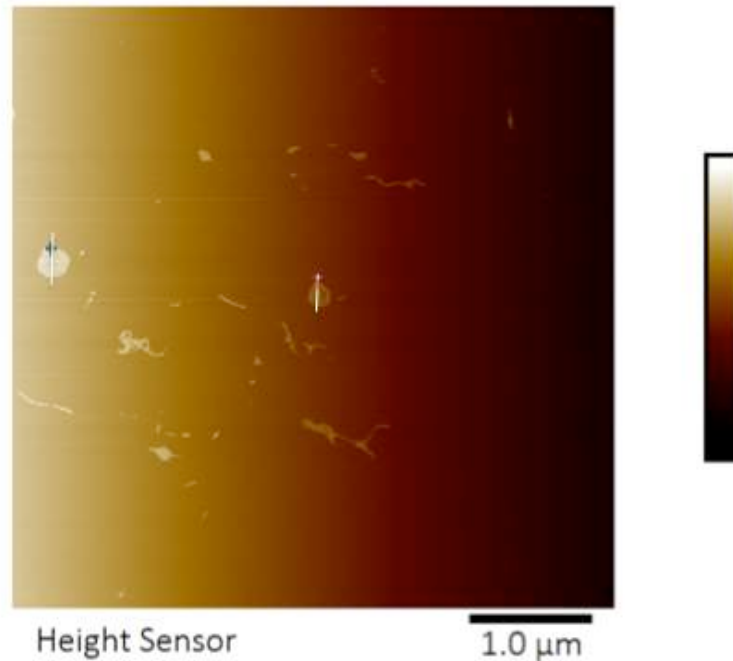


Abb. 16: Probe 8 unter dem AFM, Bild bearbeitet: Nullte Ebenenordnung. Die weissen Striche zeigen, von wo bis wo die Höhenprofile (Abb. 17) gemessen wurden. Die blauen Kreuze sind in der Abb. 17 vertikale blaue Linien und gehören zum blauen Graphen. Die roten Kreuze sind in der Abb. 17 vertikale rote Linien und gehören zum roten Graphen.

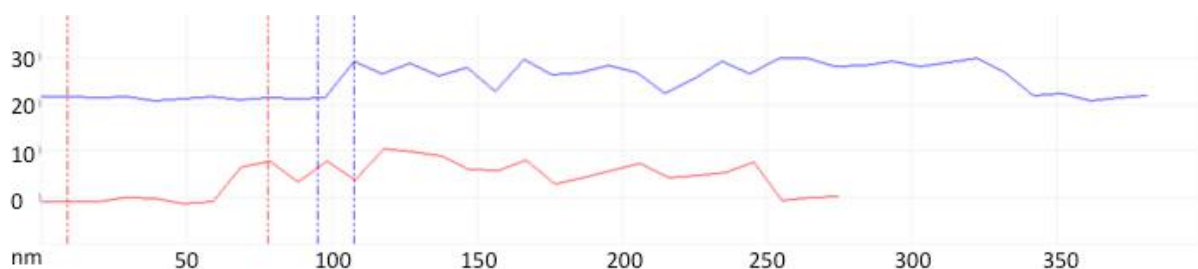


Abb. 17: Höhenprofil der Abb. 16: Der Höhenunterschied der beiden blauen Kreuze in der Abb. 16, hier markiert mit zwei vertikalen blauen Strichen, beträgt 7.842 nm. Die Höhe dieser Figur beträgt etwa 8 nm. Der Höhenunterschied der beiden roten Kreuze in der Abb. 16, hier markiert mit zwei vertikalen roten Strichen, beträgt 8.655 nm. Die Höhe dieser Figur beträgt etwa 9 nm.

Die nächsten Proben sollten wegen des eher schlechten Ergebnisses der Probe 8 nicht mehr gereinigt und wieder wie bei der ersten Messung im Trockenen gemessen werden. Da die Probe 4 ziemlich gute Ergebnisse hergab, wurde in der nächsten Runde mit ähnlichen Bedingungen experimentiert.

5.2.3 Hybridisierung und Gel der dritten Runde

Laut der MLPA-Methode (*multiplex ligation-dependant probe amplification*) werden mit einer längeren Hybridisierungszeit bessere Ergebnisse erzielt. Die Anlagerung erfolgt somit korrekter und kompletter (MRC-Holland, 2018). Aus diesem Grund wurde die Hybridisierungszeit für die dritte Runde verlängert (Tabelle 4).

	Mittlere Intervall-temperatur in °C	Gradient +/- °C	Zeit hh:mm:ss
Alles denaturieren:	95		00:10:00
Start	90		
1. Intervall	88	-2	00:05:00
2. Intervall	78	-8	02:00:00
3. Intervall	55	-15	12:00:00
4. Intervall	32	-8	02:50:00
5. Intervall	4		∞

Tabelle 4: Temperaturregime im Thermocycler für die dritte Runde (längere Hybridisierungszeit, MLPA Prinzip): Von 90 °C bis 4 °C in etwa 12 Stunden: 90 °C bis 86 °C mit einer Temperaturabnahme von 4 °C pro 5 Minuten; 85 °C bis 70 °C mit einer Temperaturabnahme von **2 °C pro 15 Minuten**; 70 °C bis 40 °C mit einer Temperaturabnahme von **1 °C pro 24 Minuten**; 40 °C bis 25°C mit einer Temperaturabnahme von 1 °C pro 10 Minuten; am Schluss halten bei 4 °C.

Die zusammenpipettierten Proben OH, MH und 10 bis 15 (Tabellen 5A und 5B) wurden in Temperaturschritten, wie in Tabelle 4 gezeigt, hybridisiert.

5.2.3.1 Dritte Runde

Beschriftung	O	OH	M	MH	10	11
	Oligos ohne Hybr.	Oligos mit Hybr.	M13 ohne Hybr.	M13 mit Hybr.	1.75x Oligos	3.5x Oligos
M13mp18	-	-	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Oligomix	3.7 µl	3.7 µl	-	-	1.9 µl	3.7 µl
5x TAE	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl
0.5 M Mg²⁺ Ac.	-	-	-	-	-	-
H₂O	63.5 µl	63.5 µl	63.2 µl	63.2 µl	61.3 µl	59.5 µl
Endvolumen	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl

Tabelle 5A: Legende siehe Tabelle 5B.

Beschriftung	12	13	14	15
	3.5x Oligos, 2x Mg ²⁺ Ac.	5x Oligos	5x Oligos, 2x Mg ²⁺ Ac.	10x Oligos
M13mp18	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Oligomix	3.7 µl	5.2 µl	5.2 µl	10.5 µl
5x TAE	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl	16.8 µl
0.5 M Mg ²⁺ Ac.	2.1 µl	-	2.1 µl	-
H ₂ O	57.4 µl	58 µl	60.1 µl	52.7 µl
Endvolumen	84 µl	84 µl	84 µl	84 µl

Tabelle 5B: Dritte Runde: Kontrollen ohne M13mp18 (mit und ohne Hybridisierung im Thermocycler), ohne Oligomix (mit und ohne Hybridisierung im Thermocycler) und Variationen 10 bis 15.

Die Proben OH, MH und 10 bis 15 wurden nach der Hybridisierung zusammen mit den nicht aufgeheizten Proben O und M mit Blue-Juice-Ladepuffer versehen und in die Geltaschen eingefügt. Das Gel wurde laufen gelassen und nach eineinhalb Stunden gestoppt (Abb. 18).

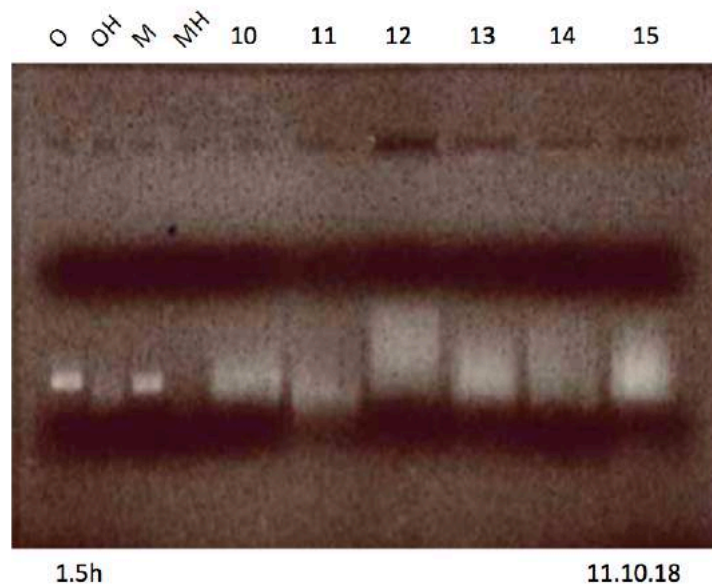


Abb. 18: Agarosegel der Proben nach der dritten Hybridisierungsrunde. Nummerierung der Proben: siehe Tabelle 5.

Die ersten vier Spuren auf dem Gel in der Abb. 18 waren Kontrollbanden. Die erste (O) zeigte, wo die Oligos liefen, wenn sie sich nicht untereinander zusammen gelagert hatten. Die zweite (OH) zeigte, wo die Oligos waren, wenn sie untereinander auch hybridisieren konnten, was in den Proben 10 bis 15 der Fall gewesen sein könnte. Sie zeigte das Gleiche wie die Probe OM der letzten Runde (Abb. 13) – bis auf die Oligokonzentration, die hier gesenkt wurde, um der Konzentration in den Proben 10 bis 15 möglichst nahe zu kommen. In der dritten Spur (M) sah man die ssDNA des M13mp18 ohne die Oligos. Sie zeigte, wo der M13mp18 gewesen wäre, wenn er nicht erhitzt und hybridisiert worden wäre. Die vierte Probe (MH) war nicht sehr gut sichtbar. Es handelte sich dabei um das gleiche Gemisch wie die Probe OO der letzten Runde (Abb. 13). Rein theoretisch müsste deswegen eine Bande oberhalb der Bande der zweiten Spur erschienen sein.

Dieses Gel hatte wider Erwarten sehr unklare Banden. Wieder sah man gut, dass die Proben mit mehr Salz (Proben 12 und 14) eine Ausschweifung gegen oben hatten. Eine dieser Proben wäre noch spannend anzusehen, denn vielleicht repräsentieren die höheren Banden auch eine grössere, besser gefaltete Figur und haben nichts mit dem Ausfallen des Salzes zu tun. Mit der AFM Analyse wollte ich sehen, ob sich meine Theorie bestätigte.

Die Probe 10 hatte eine so tiefe Oligokonzentration, dass es unwahrscheinlich war, dass alle diese wenigen Oligos sich richtig angelagert hatten. Die Bande dieser Probe sollte also anzeigen, wo die DNA Figuren eher nicht wären.

Die Probe 11 sollte interessant sein, da sie das gleiche Oligo/Phagen-Verhältnis wie die Probe 4 hatte. Durch die längere Hybridisierung sollte sich das Resultat eher verbessern. Diese Probe wollte ich deswegen unbedingt unter dem AFM anschauen.

Die Probe 15 hatte, wie die Probe 11, eine Bande, welche durch den Ladepufferfarbstoff ein bisschen überlagert wurde. Wenn also die Probe 11 erfolgreich wäre, hätte die Probe 15 auch eine hohe Wahrscheinlichkeit, erfolgreich zu sein.

5.2.4 AFM-Session 2

Dieses Mal reichte die AFM Zeit für drei Proben. Die Probe 11 wurde zuerst angeschaut.

5.2.4.1 Die Probe 11 im AFM

Die Probe 11 wurde im Trockenen gemessen (Abb. 19 und 20). In diesen Bildern sah man schon sehr viele gute Strukturen mit der richtigen Grösse. Die längere Hybridisierungszeit hatte also genützt, die Figuren waren kompletter. In der Abb. 19 sah man eher zu kleine Strukturen, dafür hatten diese die richtige DNA-Höhe von etwa 2 nm (Abb. 20). Die Löcher in diesen Figuren waren sehr eng zusammen, was bewirkte, dass die Figuren insgesamt kleiner waren und als gefüllte Flächen erschienen (siehe Abb. 6).

Da die Probe 11 gut gelungen war, könnte die Probe 15 interessant sein, da sie, wie die Probe 11, die untere Bande des Ladepufferfarbstoffs ein bisschen überdeckte (siehe Abb. 18).

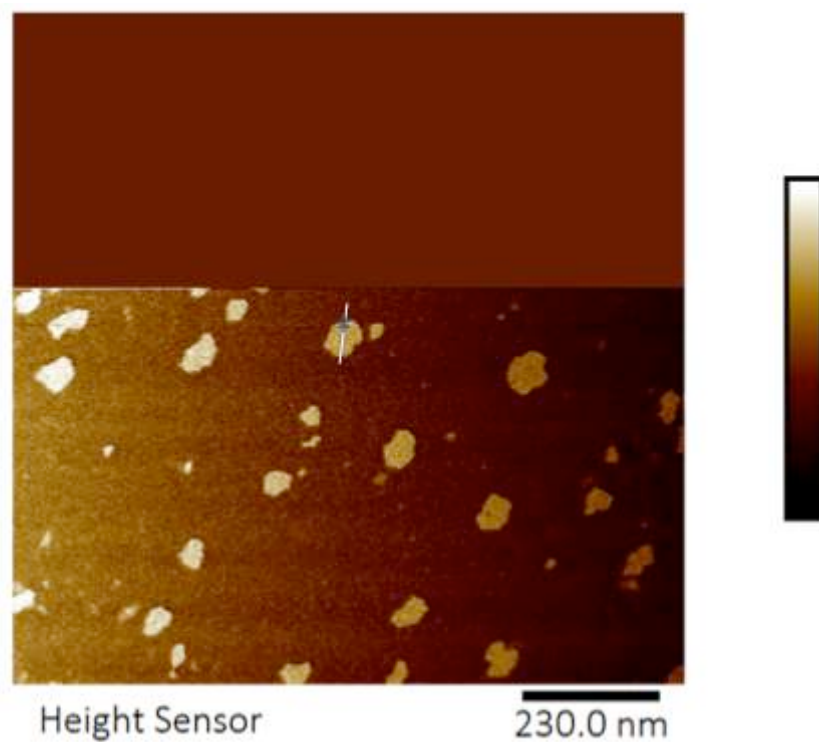


Abb. 19: Probe 11 unter dem AFM, Bild bearbeitet: Nullte Ebenenordnung. Der weisse Strich zeigt, von wo bis wo das Höhenprofil (Abb. 20) gemessen wurde. Die blauen Kreuze sind in der Abb. 20 vertikale blaue Linien.

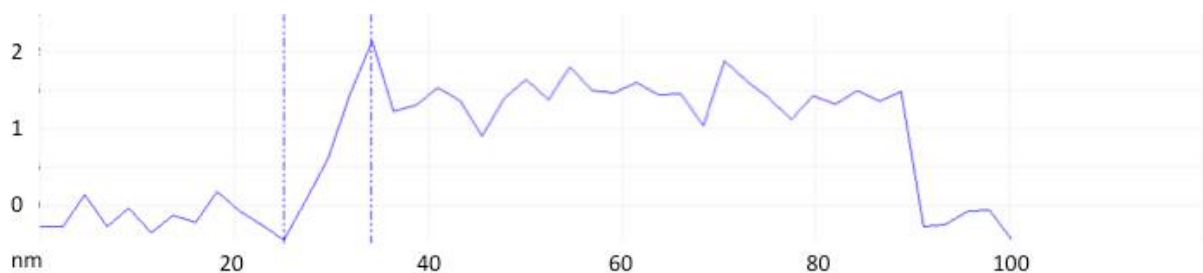


Abb. 20: Höhenprofil der Abb. 19: Der Höhenunterschied der beiden blauen Kreuze in der Abb. 19, hier markiert mit zwei vertikalen blauen Strichen, beträgt 2.595 nm. Die Höhe der Figur beträgt etwa 2 nm.

5.2.4.2 Die Probe 12 im AFM

Die Probe 12, ähnlich wie die Probe 11, nur mit ein bisschen mehr Salz, wurde auch im Trockenen gemessen (Abb. 21 und 22). Zur Folge davon wurde die DNA an vielen Stellen mit dem Salz überlagert. Man sah die DNA teilweise wegen der vielen Salzkristalle nicht mehr. Meine Theorie über den Salzgehalt hatte sich insofern bestätigt, dass die Konzentration des Salzes für die Probe 12 zu hoch war. Die langsamer laufende Bande (siehe Abb. 18) hatte deswegen mit dem Ausfallen des Salzes zu tun. In der Abb. 21 waren DNA-Faltungen sichtbar, diese waren jedoch weit entfernt von einem vollständigen Gwaggi. Das Höhenbild in der Abb. 22 zeigt, wie sich die Salzkristalle um die DNA angelagert hatten.

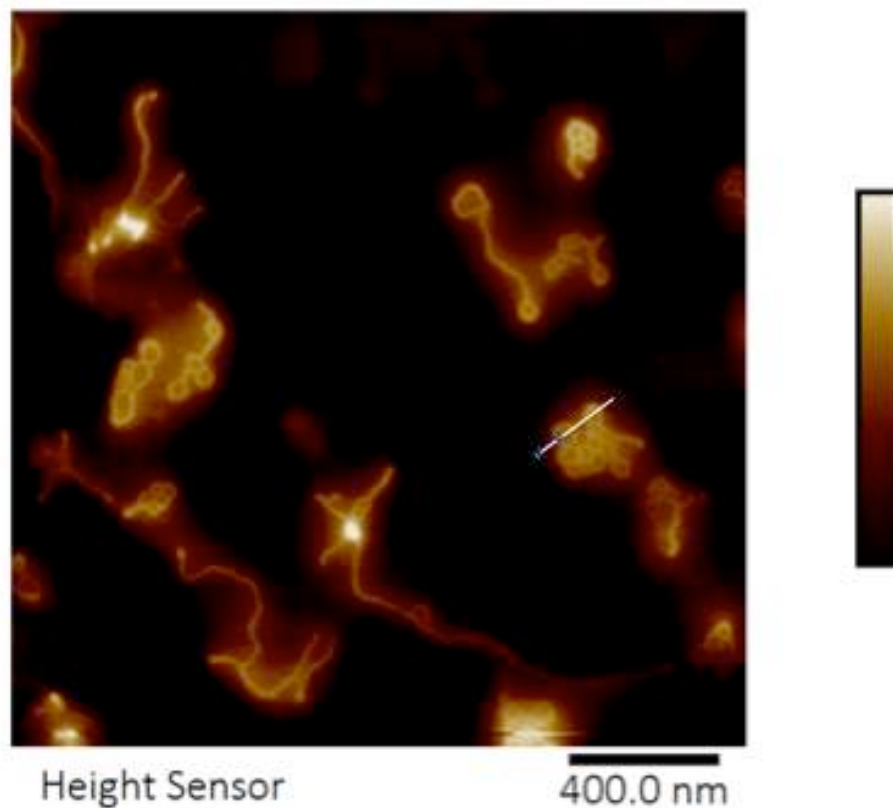


Abb. 21: Probe 12 unter dem AFM, Bild bearbeitet: Zweite Ebenenordnung. Der weiße Strich zeigt, von wo bis wo das Höhenprofil (Abb. 22) gemessen wurde. Die blauen Kreuze sind in der Abb. 22 vertikale blaue Linien.

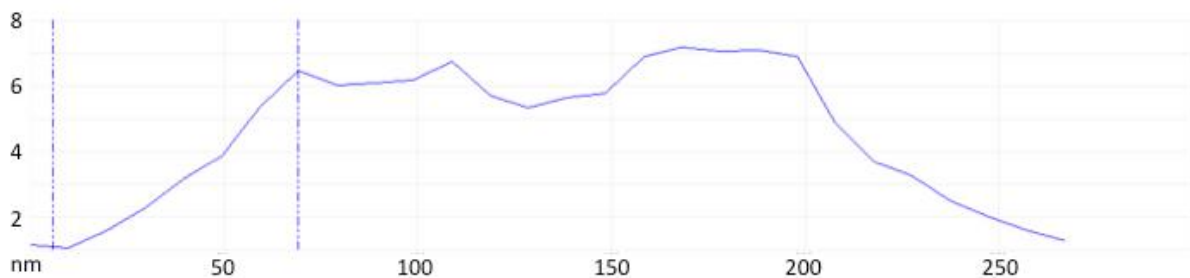


Abb. 22: Höhenprofil der Abb. 21: Der Höhenunterschied der beiden blauen Kreuze in der Abb. 21, hier markiert mit zwei vertikalen blauen Strichen, beträgt 5.400 nm. Die Höhe dieser Figur beträgt etwa 5.5 nm. Durch das viele Salz gibt es eine Abschrägung der Höhe an den Seiten.

5.2.4.3 Die Probe 15 im AFM

Die Probe 15 wurde im Trockenen gemessen (Abb. 23 und 24). Die Strukturen der Probe 15 waren nicht so deutlich definierbar wie bei der Probe 11. Für alle drei Proben dieser AFM-Session wurde die gleiche Spitze gebraucht. Deshalb war die Wahrscheinlichkeit gross, dass die Spitze sich mit der Zeit abgenutzt hatte und die Messungen bei der Probe 15 weniger genau wurden. In der Abb. 23 sah man die unterschiedlichen Grössen der DNA-Figuren. Da die Auflösung recht schlecht war, sah man die Strukturen nicht ganz – vermutlich waren sie aber wieder bienenwabenartig.

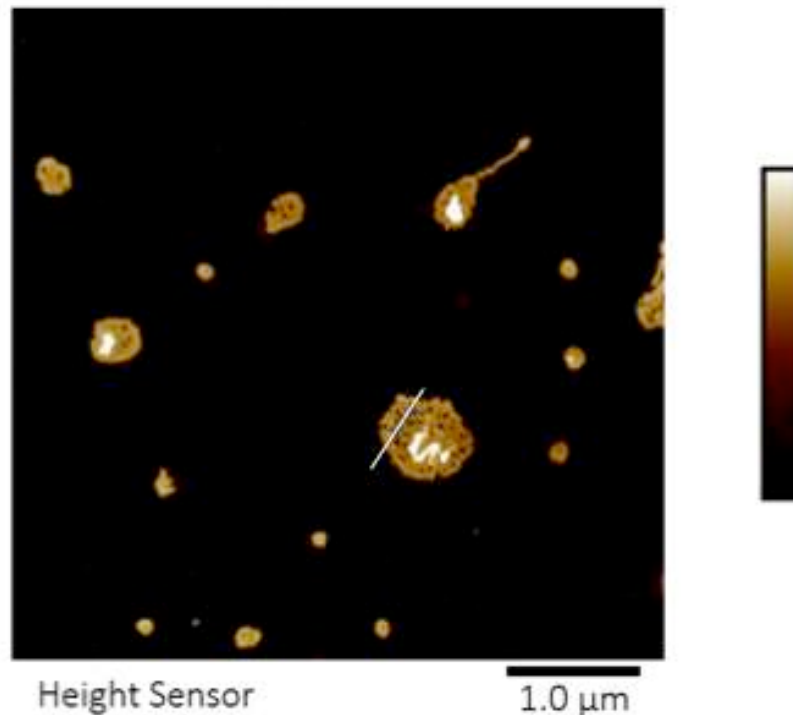


Abb. 23: Probe 15 unter dem AFM, Bild bearbeitet: Nullte Ebenenordnung. Der weisse Strich zeigt, von wo bis wo das Höhenprofil (Abb. 24) gemessen wurde. Die blauen Kreuze sind in der Abb. 24 vertikale Linien.

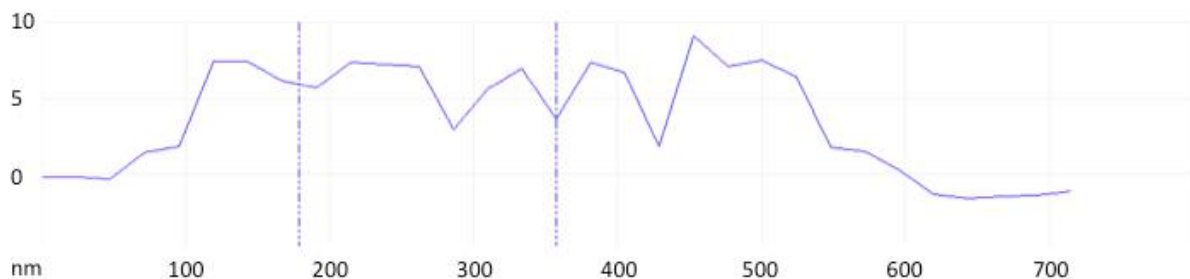


Abb. 24: Höhenprofil der Abb. 23: Der Höhenunterschied der beiden blauen Kreuze in der Abb. 23, hier markiert mit zwei vertikalen blauen Strichen, beträgt 2.090 nm. Die Höhe dieser Figur beträgt etwa 7.5 nm.

5.2.5 AFM-Session 3

Für die letzte Session hatte ich nur einen halben Tag zur Verfügung. Ich hatte die Probe nach Protokoll (Jun et al., 2018) immer noch nicht gemessen. Langsam wurde es Zeit.

5.2.5.1 Die Probe 6 im AFM

Als letztes wurde die Probe 6 im Trockenen gemessen (Abb. 25, 26 und 27). Das Protokoll sieht zwar eine Flüssigmessung vor (Jun et al., 2018), doch dank meiner Erfahrung war das trockene Messen erfolgsversprechender. Die Probe 6 ergab die schönsten Bilder. Obwohl viele freie Oligos wegen des hohen Überschusses herumlagen, gab es auch viele schöne, vollständig gefaltete Figuren. Die Figuren sahen zwar nicht ganz gleich aus wie das Computerprogramm sie angegeben hatte, aber mit einem einfachen Modell aus Schnur konnten die Figuren nachvollzogen werden (siehe Diskussion, Kapitel 6). In der Abb. 25 sieht man eine schöne Figur, die aber leider abgeschnitten ist. Der Rest der Figur sieht man verkleinert in der Abb. 26.

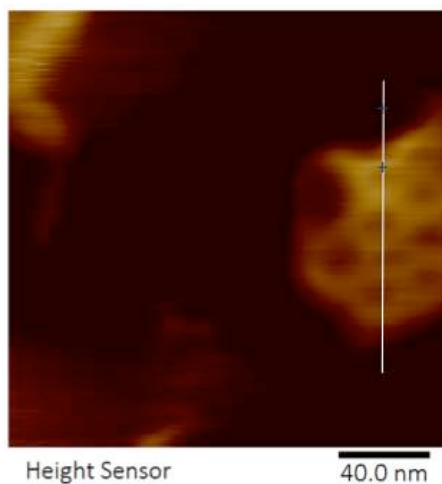


Abb. 25: Probe 6 unter dem AFM, Bild bearbeitet: Nullte Ebenenordnung. Der weisse Strich zeigt, von wo bis wo das Höhenprofil (Abb. 27) gemessen wurde. Die blauen Kreuze sind in der Abb. 27 vertikale Linien.

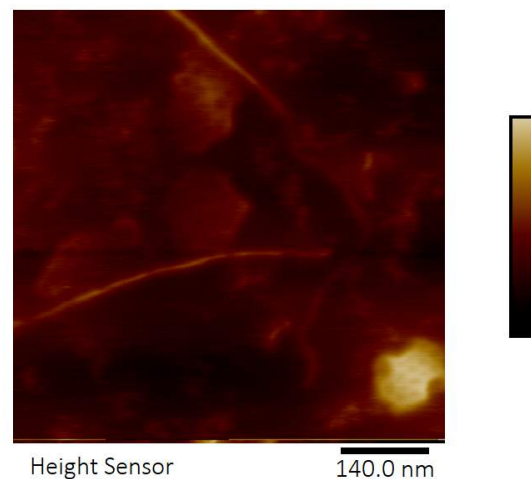


Abb. 26: Probe 6, Figur der Abb. 25 im grösseren Ausschnitt: Die Figur gleicht dem Gwaggi (siehe Diskussion, Kapitel 6).

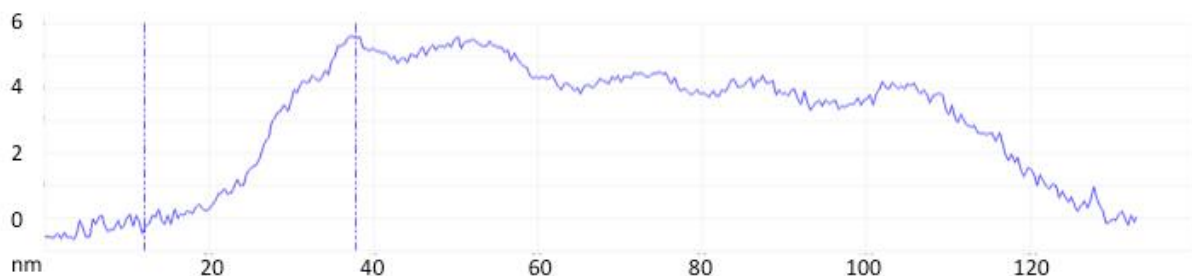


Abb. 27: Höhenprofil der Abb. 25: Der Höhenunterschied der beiden blauen Kreuze in der Abb. 25, hier markiert mit zwei vertikalen blauen Strichen, beträgt 5.779 nm. Die Höhe dieser Figur beträgt etwa 4 nm. Die Mica-Oberfläche scheint hier schräg zu sein.

6 Diskussion

Die ganze Arbeit kritisch betrachtet, denke ich, ist sie gelungen. Die Ergebnisse insbesondere der letzten Probe sind sehr überzeugend.

Ich habe beim Erstellen des Gwaggimodells auf dem Computer nur den Gwaggi in jener starren Form gesehen. Ich habe aber nicht damit gerechnet, wie es aussehen könnte, wenn die DNA flexibel ist. Genau dies kann beim Erkennen der Figur zu einem Problem werden. In Abb. 29 habe ich versucht, mit einem selbstgebastelten Modell aus Schnur (Abb. 28) das AFM-Bild der Abb. 26 nachzubauen.

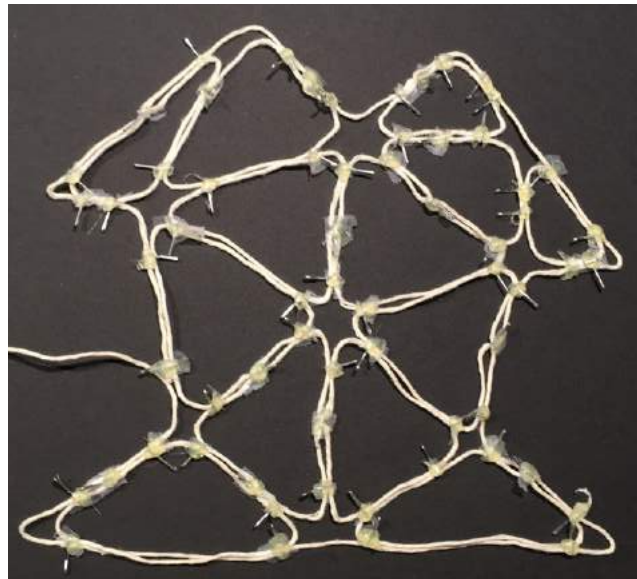


Abb. 28: Schnurbild nach der Abb. 11: Die Schnur stellt die durchgehende ssDNA des M13mp18 Phagen dar. Die Heftklammern markieren die äussersten Oligoüberkreuzungen (engl. Cross-overs) und wurden mit Heissleim befestigt.

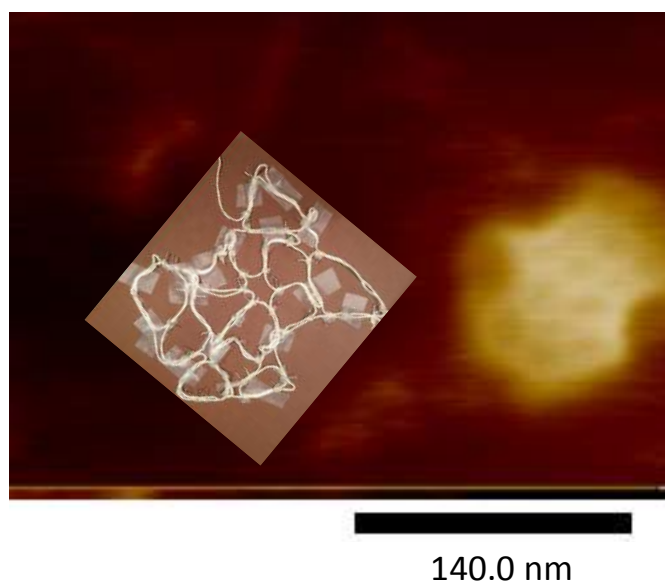


Abb. 29: Ausschnitt der Abb. 26 mit dem Schnurmodell: Die Figur wurde mit dem Schnurmodell nachgebaut.

Das ist ein Hinweis darauf, dass die Faltung der DNA vollständig stattgefunden haben könnte, auch wenn man dies nicht auf den ersten Blick sieht.

Einige der AFM-Bilder, die definitiv DNA zeigen, sind höher als 2 nm (Dicke einer doppelsträngigen DNA). Die Gründe dafür sind unterschiedlich: Einerseits können die Erhöhungen von Salzkristallen oder von anderen DNA-Strängen stammen oder die Mica-Platte ist uneben. Andererseits muss keine dieser Störungen vorliegen, denn meine Figur hat immer zwei Doppelstränge nebeneinander (Abb. 11), die gelegentlich auch übereinander zu liegen kommen können. Mit der Dicke dieser zwei Stränge, dem Abstand dazwischen und der 1.38 nm dicken Ni²⁺ Ionenschicht darunter (Abb. 8) kommt man auf 6 nm Höhe (wie zum Beispiel in Abb. 15 gemessen).

Rückblickend betrachtet wären viele Hürden einfach zu vermeiden gewesen. Zum Beispiel, wenn ich von Anfang an den vom Protokoll von Dr. Jun empfohlenen Weg verfolgt hätte, wäre ich wahrscheinlich schneller auf das beste Resultat gekommen. Mein Weg basierte aber auf einem Rechnungsfehler: In der ersten Probenrunde wurde das Molekulargewicht der doppelsträngigen DNA des M13mp18 Phagen statt der einzelsträngigen DNA genommen. Das führte dazu, dass die M13mp18 ssDNA in den Mischungen doppelt und die Oligos relativ dazu halb so konzentriert vorkamen, wie beabsichtigt. Dennoch habe ich eine interessante Probe der ersten Runde (Probe 4) für die erste Session am AFM ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Probe waren sogar besser als die der Probe mit Oligokonzentration nach vorgegebenem Protokoll (Probe 8). Deshalb wurden die Konditionen der Probe 4, die aus falschen Berechnungen entstanden ist, in der nächsten Runde weiterverfolgt. Was aber im Nachhinein wirklich der Grund für das Versagen der Probe 8 war, war entweder die unterschiedliche Salzkonzentration, die Reinigung oder die unterschiedliche Messart, aber nicht die Oligokonzentration. Die Proben weichten zu fest voneinander ab, doch die Messzeit am AFM war zu beschränkt, um jede Bedingung einzeln testen zu können. Schliesslich bin ich erst auf Umwegen zur erfolgreichsten Probe, Probe 6 gemäss Protokoll von Dr. Jun, gekommen, welche eigentlich die erste gemessene Probe hätte sein sollen. Zum Glück aber habe ich mir die Zeit eingeteilt und schon sehr früh angefangen.

Andere unvermeidliche Hürden bin ich froh, gemeistert zu haben. Immer wieder bin ich auf die Worte gestossen: „Du bist aber früh dran, um in die Molekularbiologie einzusteigen“ oder „Ist dieses Projekt nicht zu ambitiös für eine Maturarbeit?“ oder „Man könnte meinen, du willst eine Doktorarbeit machen“. Klar, meine Arbeit war ambitiös, doch umso mehr gab mir das den Ansporn, mein Ziel zu erreichen, eine individuelle und herausfordernde Arbeit zu meistern.

Prof. Rothmund hat die DNA-Origami-Technik auf eine andere Art und Weise wie ich praktiziert. Seine erste Technik war, die Flächen seiner zweidimensionalen Figuren ganz auszufüllen. Ein typisches Beispiel sind die Smileys aus DNA (*Rothmund, 2006*). Hätte ich diese Anwendung gebraucht, was eigentlich meine ursprüngliche Idee war, hätte ich eine längere Phagen-DNA und noch mehr Oligos benötigt, was dann eindeutig zu teuer gewesen wäre.

Später entwickelte er die Technik mit den „Haarnadeln“. Bei dieser hatte er eine DNA-Schicht als Grundlage, bei der immer wieder ein paar Maschen aus der Ebene herausstachen. Diese Maschen, oder Haarnadeln, ergaben dann schliesslich das Bild (*Rothmund, 2006*). Auch da musste wieder eine Ebene mit DNA gefüllt werden. Meine Figur wäre mit dieser Technik wahrscheinlich stabiler und schöner geformt, doch auch viel kleiner.

Ich hatte jetzt schon Mühe, meine Figur unter dem AFM zu finden. Viel kleiner als 200 nm hätte ich den Messausschnitt nicht wählen können.

Falls es aber bei meinen Versuchen trotzdem ganz schlecht herausgekommen wäre und ich nichts unter dem AFM gesehen hätte, hätte ich eine Notfalllösung gehabt, die ich mit dem NGW-Beitrag finanziert hätte: Ich hätte zwei Oligos, die in der Figur in unmittelbarer Nähe liegen, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Damit kann man ein FRET-Paar bilden (*Förster-Resonanzenergietransfer, kurz FRET, 2018*). Einer dieser Farbstoffe (A) wird durch das in dessen Nähe ausgestrahlte Licht des anderen Farbstoffes (B) angeregt, welcher wiederum von UV-Licht angeregt wird. Wenn man nun ein Agarosegel ohne Ethidiumbromid laufen lassen würde und dieses dann mit UV-Licht bestrahlen würde, sähe man an der Stelle, an der die Figur richtig gefaltet wäre (d.h., wenn sich die Oligos nahe beieinander befinden), die fluoreszierende Farbe des ersten Farbstoffes (A).

Unterschätzt habe ich die ganze Vorarbeit. Bis ich das richtige Programm hatte und dann die richtige Figur hat es länger gedauert, als ich erwartet hätte. Immer wieder war es nötig, Mails mit neuen Fragen an verschiedenste Personen zu schicken und Telefonate zu führen. Wenn ich mehr Zeit gehabt hätte und mit den Experimenten früher hätte anfangen können, hätte ich noch mehr Proben ausprobiert, die aus ähnlichen Bedingungen wie die Probe 6 hervorgegangen wären. Das zusätzliche Salz hätte ich weggelassen. Eine der Proben wäre sicher die Probe 6 gewesen, aber mit einer längeren Hybridisierungszeit. Wahrscheinlich hätte es dann noch mehr vollständige Figuren gehabt und vielleicht wären auch Figuren dabei, die wie echte Gwaggis aussähen, ohne Verzerrung.

7 Zusammenfassung

Zusammengefasst geht es in meiner Maturarbeit um das Erstellen einer DNA-Figur, dem Gwaggi, erfunden von meinem Grossvater. Die DNA-Figur besteht aus der langen einzelsträngigen DNA des M13mp18 Phagen und aus kurzen einzelsträngigen DNA-Sequenzen, den Oligonukleotiden. Das Ziel, dass das Aneinanderlagern der DNA zum Gwaggi vollständig gelingt, wurde erreicht. Dafür benötigte es mehrere Schritte: Zuerst wurde die Figur entworfen. Danach wurden die Oligonukleotid-Sequenzen, die von einem Computerprogramm ausgegeben wurden, bestellt. Die Oligonukleotide wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zusammengegeben, um die optimalen Bedingungen herauszufinden. Die gemischten DNA-Moleküle wurden zuerst vollständig denaturiert (erhitzt) und dann langsam abgekühlt. In diesem Prozess lagerte sich die DNA richtig aneinander und die Figur entstand. Um herauszufinden, in welcher Probe sich die meisten oder vollständigsten Figuren befanden, wurde jede Probe auf einem Agarosegel laufengelassen. Je nachdem wurde die Probe noch einer Reinigung unterzogen, um unerwünschte Partikel herauszufiltern. Die vielversprechendsten Proben wurden dann für die Elektronenmikroskopie an der ETH ausgewählt und dort mit dem so genannten AFM (Atomic Force Microscope) vermessen. Die Ergebnisse mit dem AFM zeigten DNA Figuren, die zwar nicht genau wie der Gwaggi aussahen, jedoch vollständig gefaltet waren. Aus einem Modell aus Schnur wurde die Figur nachgebaut und so verzogen, dass sie dem Bild des Elektronenmikroskops entsprach. So gelang mir die Herstellung einer Nanofigur mithilfe von DNA Origami.

8 Dank

Ich möchte allen wunderbaren Personen und Organisationen danken, die mir im Verlaufe dieser Arbeit geholfen haben:

- **Christian Bürkli** für die Betreuung und **Dominique Grüter** für das Korreferieren meiner Arbeit
- **Prof. Dr. Alessandra Baumer** (Institut für Medizinische Genetik, Universität Zürich) für ihre grosszügige Hilfsbereitschaft und Zeit im Labor und auch ausserhalb
- **Dr. Shivaprakash Ramakrishna** (Department of Materials, ETH Zurich) and **Ankita Ray** (Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zurich) for the support with knowledge, material and time at the AFM
- **Prof. Dr. Mark Bathe** (Department of Biological Engineering, MIT, USA) and his group in particular **Dr. Hyungmin Jun** and **Dr. Tyson Shepherd** and **Prof. Dr. Fei Zhang** (Biodesign Center for Molecular Design and Biomimetics, Arizona State University (ASU), USA) for answering a lot of questions and letting me use the program PERDIX although it hasn't been published yet
- **Dr. Werner Wolz** (Institute of Molecular Life Sciences, Universität Zürich) für das mehrmalige Anpassen des source codes von PERDIX
- **Prof. Dr. Paul Rothmund** (Computing & Mathematical Sciences, Caltech, USA) for inspiration, ideas and very good advice
- **Dr. Joakim Reuteler** (Department of Materials, ETH Zurich) and **Prof. Dr. Nicholas Spencer** (Department of Materials, ETH Zurich) for helping me find access to the AFM
- **Prof. Dr. Shawn Douglas** (Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco (UCSF), USA) for helpful information
- **Microsynth AG, Balgach SG** für ihr äusserst grosszügiges Sponsern aller Oligos im Betrag von CHF 5394.09, besonderer Dank gilt **Dr. Damian Ackermann**, **Dr. Rupert Hagg** und **Dr. Tobias Schmidheini** für persönliche Beratung und gute Ratschläge
- **Naturwissenschaftliche Gesellschaft Winterthur (NGW)** für die Bereitschaft 1000.- in meine Arbeit zu investieren, insbesondere **Peter Lippuner**, Präsident der NGW, für das erfreuliche Telefonat
- **BioConcept AG, Allschwil BL** für das bereitwillige Sponsern von vier Mal 10 µg M13mp18 ssDNA im Wert von CHF 284.-
- Meinen Eltern, **Peter Kast** und **Marianne Gamper**, für ihr Wissen, ihre Unterstützung und die Zuversicht, dass ich diese Arbeit meistern kann
- Meinem Grossvater, **Robert Gamper (Gigi)**, für all die wunderbaren Erinnerungen und die vielen schönen Gwaggi-Zeichnungen

Ohne die Hilfe von jedem einzelnen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.



Microsynth
THE SWISS DNA COMPANY



9 Quellenverzeichnis

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac.	Acetat
AFM	Atomic Force Microscope
ASU	Arizona State University
DAEDALUS	DNA Origami Sequence Design Algorithm for User-defined Structures
D-CHAB	Department of Chemistry and Applied Biosciences
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
D-MATL	Department of Materials
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
IT	Informationstechnik
MIT	Massachusetts Institute of Technology
NGW	Naturwissenschaftliche Gesellschaft Winterthur
nt	Nukleotide
Oligos	Oligonukleotide
PCR	polymerase chain reaction
PERDIX	Programmed Eulerian Routing for DNA Designs using X-overs
rcf	relative centrifugal force
ssDNA	single-stranded DNA
TAE-Puffer	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCSF	University of California, San Francisco
UV	Ultra Violett
UZH	Universität Zürich

9.2 Publikationen

Adams C. C. (2004), *The Knot Book: An Elementary Introduction to the Mathematical Theory of Knots*, The American Mathematical Society, Providence RI, pp: 181-201.

Douglas S. M., Marblestone A. H., Teerapittayanon S., Vazquez A., Church G. M., Shih W.M. (2009), Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5001-5006.

Jun H., Zhang F., Shepherd T., Ratanalert S., Qi X., Yan H., Bathe M. (2018), Autonomously designed free-form 2D DNA origami, *Sci. Adv.*, *in press*.

Kočar V., Schreck J., Čeru S., Gradišar H., Bašić N., Pisanski T., Doye J. P., Jerala R. (2016), Design principles for rapid folding of knotted DNA nanostructures, *Nat. Commun.*, **7**, 10803.

Rothemund P. W. K. (2006), Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature*, **440**, 297-302.

Sauvage J. P. (2017), From chemical topology to molecular machines (Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **56**, 11080-11093.

Veneziano R., Ratanalert S., Zhang K., Zhang F., Yan H., Chiu W., Bathe M. (2016), Designer nanoscale DNA assemblies programmed from the top down, *Science*, **352**, 1534.

9.3 Internetquellen

Cadnano Example. (2013). Abgerufen am 12. 12. 2018 von <https://www.youtube.com/watch?v=9ap8MpzUT2g>

Cadnano tutorial 1. (2012). Abgerufen am 12. 12. 2018 von <https://www.youtube.com/watch?v=cwj-4Wj6PMc&t=5s>

Cadnano tutorial 2. (2012). Abgerufen am 12. 12. 2018 von <https://www.youtube.com/watch?v=EabqNaYAI7o>

DNA & Nucleotide properties. (2016). Abgerufen am 12. 12. 2018 von http://www.geneinfinity.org/sp/sp_dnaprop.html#nucmw

DNA Origami Wikipedia. (2018). Abgerufen am 12. 12. 2018 von <https://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Origami>

Förster-Resonanzenergietransfer, kurz FRET. (2018). Abgerufen am 19. 12. 2018 von <https://de.wikipedia.org/wiki/F%C3%B6rster-Resonanzenergietransfer>

How to Design 3D Origami. (2015). Abgerufen am 12. 12. 2018 von <http://slideplayer.com/slide/5715388/>

MRC-Holland. (2018). Abgerufen am 12. 12. 2018 von www.mlpa.com

Rendering cadnano models in Maya. (2016). Abgerufen am 12. 12. 2018 von <https://www.youtube.com/watch?v=DI0YCOpgInA>

Rothmund TED Talk. (2007). Abgerufen am 1. 12. 2018 von https://www.ted.com/talks/paul_rothemund_details_dna_folding?language=de#t-525418

Ten years of DNA origami. (2016). Abgerufen am 12. 12. 2018 von https://www.youtube.com/watch?v=Trg2__Lgnc0

9.4 Programme und Versionen

- CaDNAno (legacy Version: 0.2.3, <http://cadnano.org/legacy.html>, 20.12.2018)
- CaDNAno (Version: 2.2.0, <http://cadnano.org/blog/cadnano-version-220.html>, 20.12.2018)
- DAEDALUS (Version: GPL-2.0, <http://daedalus-dna-origami.org>, 20.12.2018)
- FreeCad (Version: 0.17, https://www.freecadweb.org/wiki/Main_Page, 20.12.2018)
- Meshlab (Version: 2016, <http://www.meshlab.net>, 20.12.2018)
- Maya (Version: Autodesk Maya 2015 SP2, <https://knowledge.autodesk.com/support/maya/troubleshooting/caas/sfdcarticles/sfdcarticles/System-requirements-for-Autodesk-Maya-2015.html>, 20.12.2018)
- NanoScope (Version: 1.90, <https://www.updatestar.com/topic/nanoscope%20analysis%201.9%20download>, 20.12.2018)
- PERDIX (Version: GPL-3.0, <http://perdix-dna-origami.org>, 20.12.2018)

10 Anhang

10.1 Oligonukleotid-Sequenzen

1	AGGCCTTTTTTAGTAAAAGAGTCT	24	DES	GEN
2	CGAGCACTTTTTTAACTGCTTCCAGTG	31	DES	GEN
3	GTTTTATAATTCGTTAGAATC	22	DES	GEN
4	AGAGCGGGAGCCTGAGAAGT	20	DES	GEN
5	GGTACGCCAGAATCTAACAGGAGGC	26	DES	GEN
6	CTCCAACGGAGTCCACTATTAAGTTTAGACAGGAAC	37	DES	GEN
7+8_SetA _5	GTTTGGAACAATCAAAGGGCGAAAAACCGTCTTGTTGTT CCA	42	HPL	0.04
9	GGGTTGAGATCAGGGC	16	DES	GEN
10	CAAAAGTTTTTGCCCGAGATA	21	DES	GEN
11	GCAACAGCTGCCCTTCACCGCCTGGTAAAT	30	DES	GEN
12	AAAATCCCTTACCCTGAGAGAG	22	DES	GEN
13	TTGCAGCAAGCGAAATCGGC	20	DES	GEN
14	TTGATGGTGGTTCCGGTCCACGCTGG	26	DES	GEN
15	AAATCAACTCAATCAATATCTGGTGCGAAAATCCTGT	37	DES	GEN
16	CCTCAAATATCAAACCCAGTTGAAAGGA	28	DES	GEN
NGS_17	ACATCGCCACAGCAAATGAAAAATCTAAATTTTTTTCATC ACCTTGCTGAA	51	HPL	0.2
18	CTGAGAGCCAGTTAAAAATACC	22	DES	GEN
19	GAACGAACCACAGTGCCACG	20	DES	GEN
20	ACACCGCCTGCAACCAGCAGAAGATA	26	DES	GEN
21	TTGCCTGATTCTTTGATTAGTAATGCGGTCAGTATTA	37	DES	GEN
22+23_Set A_17	TGTAGCAATACGTAGAAGAACTCAAATATCGAATTAAC CGT	42	HPL	0.04
24	GTCCATCACGCAGCCTTGCTGGTAATATCCAGA	33	DES	GEN
25	GTCGGGCTGTCGTGCCAGCTGCTGAGACGG	30	DES	GEN
26	CTTTTCACCAGATTAATGAATC	22	DES	GEN
27	GGCCAACGCGGGTGGTTTTT	20	DES	GEN
28	GGCGCCAGCGGGGAGA	16	DES	GEN
29	CATCATATTCCTGGCGTATTG	21	DES	GEN
30	GGCAATTCATCAAGGAGCGGAATTAT	26	DES	GEN

31	ACCACCAGAATATAATCCTGATTGTTTGGATT	32	DES	GEN
32	ATTTTTTTTTTTTTTCGGAACAAAGAA	26	DES	GEN
33	TTTGACGTAAAACATTATC	20	DES	GEN
34	TTTGAGTAACAGAAATAAAGAA	22	DES	GEN
35	ATTGCGTAGAATTTTAAAAG	20	DES	GEN
36	GAACGTTATTATTTTCAGGTTT	22	DES	GEN
37	AACGTCAGATTCCTTTGCC	20	DES	GEN
38+39_Set A_28	CTCGTATTAAGAATATACAGTAACAGTACCTAATTCGAC AA	42	HPL	0.04
40	ACTTTACAACTTTACATCGGG	22	DES	GEN
41	AGAAACAATAGAAGTATTAG	20	DES	GEN
42	TTGAGGATTTAACGGATTCCGCC	22	DES	GEN
43	TGATTGCTTTGATAATACAT	20	DES	GEN
44	AGCCGTCAATAGAATACCAAGT	22	DES	GEN
45	TACAAAATCGAATAGATTAG	20	DES	GEN
46	CACTAACAACTCGCAGAGGCGA	22	DES	GEN
47	ATTATTCATTTCTTTAGGAG	20	DES	GEN
48	AAATATCAATTACCTGAGCAA	21	DES	GEN
49	ATTGAGGAAGGTTTTTTTTTATCTA	25	DES	GEN
50	GTAATATTTTTTTAAAGGGACATTC	25	DES	GEN
51	AAGCATTTTTTTCAGATATAGAGACCA	27	DES	GEN
52	ACCAGTCACACAGGCTTATCCG	22	DES	GEN
53	GTATTCTAAGTGGCAGATTC	20	DES	GEN
54	ATTATTTACATAACGCGAGGCG	22	DES	GEN
55	TTTTAGCGAATCTGAAATGG	20	DES	GEN
56	ACGCTCAATCGCCTCCCGACTT	22	DES	GEN
57	GCGGGAGGTTCTACATTTTG	20	DES	GEN
58	CATGGAAATACTTGAAGCCTTA	22	DES	GEN
59	AATCAAGATTGAAAAACGCT	20	DES	GEN
60	ACAAGCCAGCCATTGCAACAGAGTTGCTAT	30	DES	GEN
61	GCCATTTTTTTTTTAAACAACGCCTATTAGTCTT	32	DES	GEN
62	TTTTGAATGGCAACATGTAATT	22	DES	GEN
63	TAGGCAGAGGCAGACAATAT	20	DES	GEN

64+65_Set A_44	AATACGTGGCACATTTTCGAGCCAGTAATAAGAAAGCGT AAG	42	HPL	0.04
66	CTTCTGACCTGAGAATATAAAG	22	DES	GEN
67	TACCGACAAAAGATAGAACC	20	DES	GEN
68	TGGCCAACAGAGGTAAAGTAATTC	24	DES	GEN
69	GACCTTTTTTTTTATTTAATGGTTGAGAAGAGTCAATAG	39	DES	GEN
70	CCTCCGGCTTAGGTTCTTCT	20	DES	GEN
71	GTTAATTTTCATGGGTTATATAA	22	DES	GEN
72	CTATATGTAAATATATTTTA	20	DES	GEN
73	AAAACCTTTTTCAAATGCTGATGCAAA	26	DES	GEN
74	GTCCTGAACGCCTGTTTATCAACACAAAGAACGCGAG	37	DES	GEN
75	AATGCAGAACGCAAGAAAAATA	22	DES	GEN
76	ATATCCCATCATGTTTCAGCT	20	DES	GEN
77	TGTCCAGACGACGTAAACAACCTA	25	DES	GEN
78	AATTAATTACATTTAGAATC	20	DES	GEN
79	GGCTTAATTGAACAATTCATT	22	DES	GEN
80	TGAATTACCTTCAACAGTAG	20	DES	GEN
81	AAAGCCAACGCTTTTTAATGGA	22	DES	GEN
82	AACAGTACATTTACCAGTAT	20	DES	GEN
83	TATACAAATTCAAATCAATATA	22	DES	GEN
84	TGTGAGTGAATCATATGCGT	20	DES	GEN
85	CCTGTTTAGTATAACCTTGCTT	22	DES	GEN
86	CTGTAAATCGCTAGAAAAG	20	DES	GEN
87	AATCATAATTATCGCTATTAAT	22	DES	GEN
88	TAATTTTCCCTAACACCGG	20	DES	GEN
89+90_Set A_59	TAAATAAGAATTAGAATCCTTGAAAACATAGAAATAAG GCG	42	HPL	0.04
91	GACCGTGTGATCGATAGCTTAG	22	DES	GEN
92	ATTAAGACGCTTGAAATACC	20	DES	GEN
93	AAATCAACGTATTTTTTTCAAAGCTGCTCAAAAATCAGGT C	41	HPL	0.04
94	TGACCATAAATCATTTCAGTGAA	22	DES	GEN
95	TAAGGCTTGCAAAACGAGAA	20	DES	GEN
96	AAACAGTTCAGCCTGACGAGAA	22	DES	GEN

97	ACACCAGAACCAAATGCTTT	20	DES	GEN
98	TGAATCCCCCTGAGTAGTAAAT	22	DES	GEN
99	TGGGCTTGAGAAATATTCAT	20	DES	GEN
100	GGAATCGTCATATGGTTTAATTTCAACTTTAATCATTGTG AATTACC	47	HPL	0.04
101	CTGGATTTTTTTTTTCGTCCAATACTGC	26	DES	GEN
102	GATACATAACGCCAAAAGGAATTACTTAGA	30	DES	GEN
103	TAGTAAAATGTGAGGCATAGTA	22	DES	GEN
104	AGAGCAACACGAGGGGGTAA	20	DES	GEN
105	AAGTTTTGCCATATCATAACCC	22	DES	GEN
106	TCGTTTACCATTTGCAAAG	20	DES	GEN
107	GAGAGGCTGACGACGA	16	DES	GEN
108	TCAGGATTAGAGAAAATAGC	21	DES	GEN
109	CTCCTTTTGATAAAAACCTCCAACAGG	26	DES	GEN
110	AGACCGGAAGCGAGGTCATTTT	22	DES	GEN
111	TGCGGATGGCAAAGCGAACC	20	DES	GEN
112	ATTCGAGCTTCTTAGAGCTTAA	22	DES	GEN
113	TTGCTGAATATCGCGTTTTA	20	DES	GEN
114	GTACGGTGTCTGGAAAGCCCGAAATTTTCAAATATAATG CTGTAGCTCAACATGTTTTTTTTTATGCAACTAAA	73	PAG	0.04
115	AGATTAAGAGGAGTTTCATTCC	22	DES	GEN
116	ATATAACAGTTGCATCAAAA	20	DES	GEN
117	AAAGCGGATTGATTCCCA	18	DES	GEN
118	GCGAGAAAGTTTTTGGGAAGA	20	DES	GEN
119	TGACCATTAGATCGAACGTG	20	DES	GEN
120+121_ SetA_80	GGGAAAGCCGGACATTTGCAAATGGTCAATAGAGCTT GACG	42	HPL	0.04
122	CCCCGATTTAACCTGTTTAGC	22	DES	GEN
123	TATATTTTCACTAAAGGGAG	20	DES	GEN
124	AAATCGGAACCTTTGGGGCGCG	22	DES	GEN
125	AGCTGAAAAGGTAAAGCACT	20	DES	GEN
126	GTCGAGGTGCCGTGGCATCAAT	22	DES	GEN
127	TCTACTAATAGTTTTTTGGG	20	DES	GEN
128	CCCAAATCAAGTAGTAGCATTCCGCTTTCCA	31	DES	GEN

129	GATGGCCCATTTTTGTGAACCATCA	26	DES	GEN
130	ACCCTCATTTTTCCACCCTCAGAGCCCTTGA	32	DES	GEN
131	TACTATGGTTGACCACCCTCAT	22	DES	GEN
132	TTTCAGGGATACAGGGCGCG	20	DES	GEN
133	AATGCGCCGCTAGCAAGCCCAA	22	DES	GEN
134	TAGGAACCCACGCCGCGCTT	20	DES	GEN
135+136_ SetA_89	ACCACCACACCTGTACCGTAACACTGAGTTTCGCTGCGC GTA	42	HPL	0.04
137	GTAGCGGTCACGTCACCAGTAC	22	DES	GEN
138	AAACTACAACGCTGGCAAGT	20	DES	GEN
139	GGCGCTAGGGCGCCTGTAGCAT	22	DES	GEN
140	TCCACAGACAGAAAGGAGCG	20	DES	GEN
141	AAGCGCCCTCATTTTTCGTAACGATCTAAA	30	DES	GEN
142	AAAGTTTTTTTTTACCAGA	20	DES	GEN
143	GCCGCCGCCAGCCGAAC	17	DES	GEN
144	AAGCAGATAGCATTGACAGGAG	22	DES	GEN
145	GTTGAGGCAGTAAGAAAAGT	20	DES	GEN
146	TACCGAAGCCCTTTGTCAGACGATT	26	DES	GEN
147	GCAAGAAACAATTTTTTAGCAATAGCTATCT	31	DES	GEN
148	TACATAAACCAATAATAAGA	20	DES	GEN
149	CATATAAAAAATACA	16	DES	GEN
150	TATGTTTTTTTTCAAACGTAGAGAAACGCAAAG	33	DES	GEN
151	AATCAATAGAAAATCGCAG	19	DES	GEN
152	ACTCCTTATTATCATATGGTTT	22	DES	GEN
153	ACCAGCGCCACATGATTAAG	20	DES	GEN
154+155_ SetA_101	AAAAGAAGTGGAAAGACAAAAGGGCGACATTCACGGAAT ACCC	42	HPL	0.04
156	CGCAATAATAAACCGATTGAGG	22	DES	GEN
157	GAGGGAAGGTACCGAGGAAA	20	DES	GEN
158	AGGAAAAATATTGACGGAAAT	21	DES	GEN
159	ATTTTGCATGTAGAAACCAATATAGC	26	DES	GEN
160	TACCGCGCCACAATAATCGGC	22	DES	GEN
161	TGTCTTTCCTTAGGAATCAT	20	DES	GEN
162	TATTTTCATCGTATCATTCCAA	22	DES	GEN

163	GAACGGGTATAAGCCGTTTT	20	DES	GEN
164	GAACAAGCTAAACCAA	16	DES	GEN
165	GGGAAGCGCATTACTCATCGA	21	DES	GEN
166	ACTGAACACCCTGTAACATAAAAACA	26	DES	GEN
167	TACAGAGAGAAAACAAAGTCAG	22	DES	GEN
168	AGGGTAATTGTAGCAGCCTT	20	DES	GEN
169	CCGTTGTTTAAACGTCATTTATGAAAAAGCGCTA	33	DES	GEN
170+171_ SetA_111	AAACGATTTTTATAAACAGTTAATGCCCCCTGTCCAAATA AG	42	HPL	0.04
172	ATTTATCCCAACCTATTTTCGGA	22	DES	GEN
173	ACCTATTATTCAGCCATATT	20	DES	GEN
174	TACAAAATAAACTGAAACATGA	22	DES	GEN
175	AAGTATTAAGATTTGCCAGT	20	DES	GEN
176	TCCAGAGCCTAAGGCTGAGACT	22	DES	GEN
177	CCTCAAGAGACGAGCGTCTT	20	DES	GEN
178	ACCAACGCTAAAGGATTAGGAT	22	DES	GEN
179	TAGCGGGGTTCTCTGAATCTT	20	DES	GEN
180	TTTGCACCCATTTTTTTTACAATTTTATTTGCTC	34	DES	GEN
181	TGACCAACTTTACAACATAAAGG	22	DES	GEN
182	AATAGAAAGGAGAAAGAGGACA	22	DES	GEN
183	GATGAACGGTGCGGAGTGAG	20	DES	GEN
184+185_ SetA_119	CAACAGTTTCAGTACAGACCAGGCGCATAGGCAAACAAC TTT	42	HPL	0.04
186	GGGATTTTGCTTGGCTGACCTT	22	DES	GEN
187	CATCAAGAGTTTTTCTGTAT	20	DES	GEN
188	TAGTAAATGAAAATCTTGACAA	22	DES	GEN
189	GAACCGGATATTCCAGACGT	20	DES	GEN
190	GTTTTGTCGTCTTTCATTACCC	22	DES	GEN
191	AGTACCTTTTTTTGGATAAGTGCCGTCAACCGCC	33	DES	GEN
192	GCCACCCTCAGGAGAGGGTTGA	22	DES	GEN
193	TATAAGTATAGTTTAGTACC	20	DES	GEN
194	CTCAGGAGGCCCGGAA	16	DES	GEN
195	GGAGCCTTTAATTTACCGTA	21	DES	GEN
196	AGCTTGCTTTCGAAAAGGCTCCAAAA	26	DES	GEN

197	ATCTCCAAAAAGGTGAATTTCT	22	DES	GEN
198	TAAACAGCTTCACGTTGAAA	20	DES	GEN
199	AAATTGTGTCGAAACGAGGCGCA	23	DES	GEN
200	TTAGCCGGAATCCGCG	16	DES	GEN
201	TCTACGTTAATAACATGTTAC	21	DES	GEN
202	AAATAGTGCCTTGAGTTTTTTTCAGTGC	28	DES	GEN
203	TAACGGGGTCAAATCCTCATTA	22	DES	GEN
204	AAGCCAGAATTAATAAGTTT	20	DES	GEN
205	GAGTGTACTGGGGAAAGCGCAG	22	DES	GEN
206	TCTCTGAATTGATGATACAG	20	DES	GEN
207	TGGCTTTTTACCGTTC	16	DES	GEN
208	TGAGGCTTGCAGGGTCATACA	21	DES	GEN
209	CTTTTGCGGGATCTATATTCGGTCGC	26	DES	GEN
210	CGCATAACCGAGTCACCCTCAG	22	DES	GEN
211	CAGCGAAAGACCATCGCCCA	20	DES	GEN
212	GACAACAACAGCATTTTTTTACGAGG	26	DES	GEN
213	AACCAGAGCAGAGCCACCAC	20	DES	GEN
214	GAACCGCCACCCTCCACCACCGAAC	26	DES	GEN
215	GTTTCCATGACTAAAGACTTTTTTCGCCGCCACCCTCA	37	DES	GEN
216+217_ SetA_144	GAGGCTTTGAGTAAACGGGTAAAATACGTAATAACGGC TACA	42	HPL	0.04
218	GTAGCGCCACTA	12	HPL	0.2
219	GACTGTTTTTTAGCGCGTTTTTC	22	DES	GEN
220	CAATGAAACGTCA	13	DES	GEN
221	AGTTTGCCTTTAGCCATCGATAGCAG	26	DES	GEN
222	GACCCCCAGAATACACTAAAACACAGCGACAGAATCA	37	DES	GEN
223	AGAGGCAAAAGCGATTATACCAAGCGCG	28	DES	GEN
224	CGAAGGCTTTTTACCTAAAACGAA	24	DES	GEN
225	CATCTTTTCTAATCACCGG	19	DES	GEN
226	TTGAGCCATTTGGGGCGTTTGC	22	DES	GEN
227	CCCCCTTATTAATTAGAGCCA	22	DES	GEN
228	GCAAAATCACTCGGTCATAG	20	DES	GEN
229	ATCGGCATTTAGTAGCACCATTA	24	DES	GEN
230	CGATTAAAGGGATAACGTGGA	21	DES	GEN

231	TTTGCCCCAGCAGCAGTTGGC	21	DES	GEN
232	TAATGCGCGATTTTTATAGCCCTAAA	27	DES	GEN
233	AAACAGAGGTGAGAACATCAC	21	DES	GEN
234	GGCGGTTTATTATCAGATGAT	21	DES	GEN
235	TCCAATCGCAAGAATAGATAA	21	DES	GEN
236	TAAAAACCGTACCTTTAATTG	21	DES	GEN
237	GGCCTTGATATTTTTTTTCACAAAC	25	DES	GEN
238	ATATCAGATTATAACCCACAAGA	23	DES	GEN
239	ATTGAGTTAAGCGGTGGCAA	20	DES	GEN
240	GTACCGCAGACGGGAGAATTA	21	DES	GEN
241	TAGGTGTAGTATCGGTTTATC	21	DES	GEN
242	ACCTGCTCAACGAACTAACGG	21	DES	GEN
243	CAGTAAGCGAGTTAAAGGCCG	21	DES	GEN
244	CGCCTCCCTCAGAATGAGGAA	21	DES	GEN
245	CCATTAGCAAGGCCTTTTTAAACGTCAC	28	DES	GEN
246	CACCGTAATCAGTTCATCTTT	21	DES	GEN
247	AAACAAAGTACAACGGATTTTATCATCGCCTGAT	34	DES	GEN
248	ACACCACGGAATATTTTTTTTTATTTGTAC	32	DES	GEN
249	TGAATTTATCAAATCTAGAGACTACCTTTTTAA	34	DES	GEN
250	AAGAAGATGATGAAACTAACATCAAGAAAACAA	33	DES	GEN
251	AATTGCGAATATTTTTTAATTTTTTGATA	29	DES	GEN
252	GACGGTCAATCATTTTTTAGGGAACCGAAC	30	DES	GEN
253	CCGATTTTTTCGCCGACAAT	20	DES	GEN
254	AACAACATTATTATTGGGAAGAAAAA	26	DES	GEN
255	GTTATACCAGTCAGGACGCAGGTAGAAAGAT	31	DES	GEN
256	TTATGCGATTTTAAGAACT	19	DES	GEN
257	TCATCAGTTGAGATTTTTTAGGAATACCACATTCAACTAA TGCA	44	HPL	0.04
258	TAATGGAAGGGTTTCTACCATATCAAAATTA	31	DES	GEN
259	ATACTTCTGAA	11	HPL	0.2
260	CCTCAGAGCCGCCTTTTAACCACCACCAGA	30	DES	GEN
261	TATTCATTAAAGGTGTTTTATCACCGTCACCGAC	34	DES	GEN
262	TTTACCCTGACTATTTTAGTCAGAAGC	27	DES	GEN

Tabelle mit den verwendeten Oligonukleotiden von Microsynth AG.

10.2 Protokoll für PERDIX-Figuren (Jun et al., 2018)

Materials

DNA origami staple strands were purchased in 384-well plates from Integrated DNA Technologies, Inc. (www.IDTDNA.com) at 10 or 25 nmoles synthesis scales in the format of solution. The DNA were normalized to 100 μ M concentrations. Staples strands were mixed in equal volume from the corresponding wells and used directly without further purification.

Three single-stranded circular DNA scaffold strands were used, with lengths 2,267 nucleotides, 5,386 nucleotides, and 7,249 nucleotides. The 7,249-nt DNA scaffold was produced using M13mp18 bacteriophage RF I DNA (New England Biolabs) following the same procedures as described previously. The ϕ X174 5386-nt DNA scaffold was purchased from New England Biolabs. The 2,267-nt DNA scaffold was produced as the recombinant M13 bacteriophage DNA using the phagemid vector. The 2,267-bp phagemid vector was generated by truncating the pBluescript II SK (+) vector using the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs). The 2,267-bp phagemid vector was then co-transformed into DH5 α competent cells with pSB4423 vector, a kind gift from Dr. Stanley Brown (Niels Bohr Institute, Denmark). The E. coli colonies were inoculated into 2X YT medium for overnight growth. The recombinant M13 bacteriophage and its genomic DNA were then purified with the same procedures as described previously.

Origami Assembly

All the origami structures were assembled by mixing 5 nM of its corresponding single-stranded scaffold DNA (2,267 nucleotides, 5,386 nucleotides, or 7,249 nucleotides; see table S18) with a 20 times molar excess of staple strands in 1 x TAE Mg²⁺ buffer (40 mM Tris, 20 mM Acetic acid, 2 mM EDTA and 12.5 mM Magnesium acetate, pH 8.0). The final volume of the mixture was 100 μ L. The design details and sequences of the DNA oligos used to form each structure are shown later in this supporting document. The mixture solutions were annealed in a PCR thermocycler (Eppendorf 6332000029 Thermal Cycler Eco) from 90 $^{\circ}$ C to 4 $^{\circ}$ C in about 12 hours: 90 $^{\circ}$ C to 86 $^{\circ}$ C at a rate of 4 $^{\circ}$ C per 5 minutes; 85 $^{\circ}$ C to 70 $^{\circ}$ C at a rate of 1 $^{\circ}$ C per 5 minutes; 70 $^{\circ}$ C to 40 $^{\circ}$ C at a rate of 1 $^{\circ}$ C per 15 minutes; 40 $^{\circ}$ C to 25 $^{\circ}$ C at 1 $^{\circ}$ C per 10 minutes; hold at 4 $^{\circ}$ C in the end.

AFM Imaging

The AFM imaging were conducted in "ScanAsyst mode in fluid" (Dimension FastScan, Bruker Corporation) with Scanasyst-Fluid+ tips (Bruker, Inc.). 2 μ L samples were deposited onto freshly cleaved mica (Ted Pella, Inc.) and 0.5-1.0 μ L NiCl₂ with the concentration of 100 mM was added to the samples to fix the origami nanostructures on mica surface well. After waiting about 30 seconds for the sample adsorption to mica, 80 μ L of 1x TAE-Mg²⁺ buffer was added to the samples and an extra 40 μ L of the same buffer were deposited on the AFM tip.

10.3 Sponsoren Rechnungen

Aus datenschutztechnischen Gründen wurde dieses Kapitel weggelassen.

10.4 Eigenständigkeitserklärung

«Ich, Ines Kast aus der Klasse 6d, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit (DNA Origami – Die Herstellung einer Nanofigur) selbständig und ohne Benützung anderer als der angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verfasst bzw. gestaltet habe.»

Ort, Datum: Zürich, 19.12.18

Unterschrift: J. Kast