

# Molecular Computing

## Vorlesung Bioinformatik und Informatik

### Sommersemester 2010

Thomas Hinze

LS Bioinformatik  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

thomas.hinze@uni-jena.de  
<http://users.minet.uni-jena.de/~hinze>

---

2. Biomolekulare Algorithmen und  
Algorithmenbausteine *in vitro*

---



# Molekularbiologische Standardoperationen auf DNA/RNA

Bausteine für molekulare Algorithmen *in vitro*

## Gewinnen von Biopolymeren

- **Synthese** (Oligonucleotidsynthese)
- **Isolation** aus Organismen  
(z.B. Plasmide, genomische DNA, mRNA)

## Mischen und Aufteilen in wässriger Lösung

- **Union** (Mischen, Verdünnen)
- **Split** (Aliquotieren, Ankonzentrieren)

## Knüpfen und Aufbrechen von Wasserstoffbrücken

- **Annealing** (Hybridisierung)
- **Melting** (Denaturierung)

# Molekularbiologische Standardoperationen auf DNA/RNA

Bausteine für molekulare Algorithmen *in vitro*

## Enzymatische Reaktionen

- **Ligation** (endenkompatible Verkettung)
- **Digestion** (Restriktionsspaltung)
- **Labeling** (Strangendenmodifikation und Methylierung)
- **Polymerisation** (Endenglättung, Strangverlängerung nach Vorlage)
- **PCR** (Polymerase-Kettenreaktion, Duplizierung)

# Molekularbiologische Standardoperationen auf DNA/RNA

Bausteine für molekulare Algorithmen *in vitro*

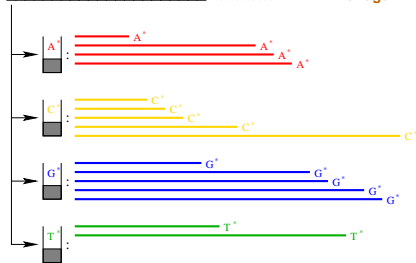
## Analyse- und Separationstechniken

- **Affinity Purification** (z.B. Biotin-Aufreinigung)
- **Gel-Elektrophorese** (Längenbestimmung und -separation)
- **Microarray**
- **Sequenzierung**
- **Spektrophotometrie** (Konzentrationsmessung)
- **Zytometrie** (Durchflussmessung)
- **Elektronenmikroskopie** (Einzelmolekülanalyse)
- **Kristallographie** (Einzelmolekülanalyse)

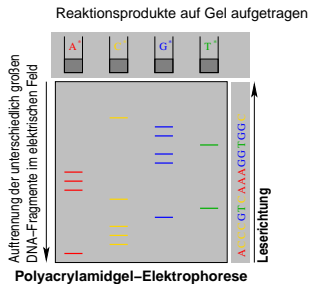
# DNA-Sequenzierung



nach Frederic Sanger (1975)



Polymerisation (Strangverlängerung)



- Anfangsstück (ca. 15 Basen) bekannt und als Molekül vorhanden
- mehrere Millionen identische **Vorlagekopien** nötig,  $\approx 1000$  Basen

⇒ Durchsatz vollautomatischer Sequenziergeräte: bis 100 Basen/h

⇒ Hochleistungsgeräte für Parallelsequenzierung, Schnittstelle

⇒ Bereitstellung der **Sequenzdaten**: aufbereitet als **Textdatei** und Bandenintensitäten der einzelnen Gelspuren als **Messkurven**

# Spektrophotometrie

- Einfach- und Doppelringe der Basenbestandteile von DNA- und RNA-Nucleotiden absorbieren Licht der Wellenlängen 260 und 280nm
- daraus folgt Messprinzip für **Konzentrationsbestimmung**
- Küvette (Glasbehälter) mit DNA/RNA-Lösung steril und normgerecht befüllt
- in Messkammer des Spektrographen eingesetzt
- fokussierter monochromer Lichtstrahl  
→ Küvette → Sensor (Photodiode)
- aus Absorptionsgrad Rückschluss auf DNA/RNA-Konzentration in Küvette
- Referenzmessungen zwischen den Probenmessungen zur Kalibrierung
- Messgenauigkeit: relativer Messfehler bis etwa 0,2%



Quelle: [www.beckman.com](http://www.beckman.com)

## Spektrophotometrie

- Einfach- und Doppelringe der Basenbestandteile von DNA- und RNA-Nucleotiden absorbieren Licht der Wellenlängen 260 und 280nm
- daraus folgt Messprinzip für **Konzentrationsbestimmung**
- Küvette (Glasbehälter) mit DNA/RNA-Lösung steril und normgerecht befüllt
- in Messkammer des Spektrographen eingesetzt
- fokussierter monochromer Lichtstrahl  
→ Küvette → Sensor (Photodiode)
- aus Absorptionsgrad Rückschluss auf DNA/RNA-Konzentration in Küvette
- Referenzmessungen zwischen den Probenmessungen zur Kalibrierung
- Messgenauigkeit: relativer Messfehler bis etwa 0,2%



Quelle: [www.beckman.com](http://www.beckman.com)

## Spektrophotometrie

- Einfach- und Doppelringe der Basenbestandteile von DNA- und RNA-Nucleotiden absorbieren Licht der Wellenlängen 260 und 280nm
- daraus folgt Messprinzip für **Konzentrationsbestimmung**
- Küvette (Glasbehälter) mit DNA/RNA-Lösung steril und normgerecht befüllt
- in Messkammer des Spektrographen eingesetzt
- fokussierter monochromer Lichtstrahl  
→ Küvette → Sensor (Photodiode)
- aus Absorptionsgrad Rückschluss auf DNA/RNA-Konzentration in Küvette
- Referenzmessungen zwischen den Probenmessungen zur Kalibrierung
- Messgenauigkeit: relativer Messfehler bis etwa 0,2%



Quelle: [www.beckman.com](http://www.beckman.com)



## Spektrophotometrie

- Einfach- und Doppelringe der Basenbestandteile von DNA- und RNA-Nucleotiden absorbieren Licht der Wellenlängen 260 und 280nm
- daraus folgt Messprinzip für **Konzentrationsbestimmung**
- Küvette (Glasbehälter) mit DNA/RNA-Lösung steril und normgerecht befüllt
- in Messkammer des Spektrographen eingesetzt
- fokussierter monochromer Lichtstrahl  
→ Küvette → Sensor (Photodiode)
- aus Absorptionsgrad Rückschluss auf DNA/RNA-Konzentration in Küvette
- Referenzmessungen zwischen den Probenmessungen zur Kalibrierung
- Messgenauigkeit: relativer Messfehler bis etwa 0,2%



Quelle: [www.beckman.com](http://www.beckman.com)

## Spektrophotometrie

- Einfach- und Doppelringe der Basenbestandteile von DNA- und RNA-Nucleotiden absorbieren Licht der Wellenlängen 260 und 280nm
- daraus folgt Messprinzip für **Konzentrationsbestimmung**
- Küvette (Glasbehälter) mit DNA/RNA-Lösung steril und normgerecht befüllt
- in Messkammer des Spektrographen eingesetzt
- fokussierter monochromer Lichtstrahl  
→ Küvette → Sensor (Photodiode)
- aus Absorptionsgrad Rückschluss auf DNA/RNA-Konzentration in Küvette
- Referenzmessungen zwischen den Probenmessungen zur Kalibrierung
- Messgenauigkeit: relativer Messfehler bis etwa 0,2%



Quelle: [www.beckman.com](http://www.beckman.com)

## Spektrophotometrie

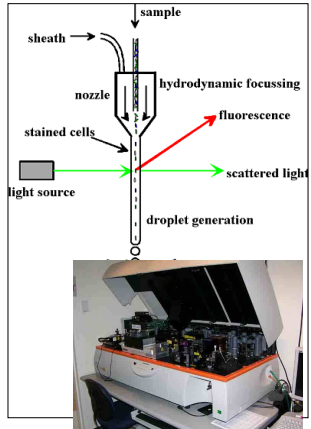
- Einfach- und Doppelringe der Basenbestandteile von DNA- und RNA-Nucleotiden absorbieren Licht der Wellenlängen 260 und 280nm
- daraus folgt Messprinzip für **Konzentrationsbestimmung**
- Küvette (Glasbehälter) mit DNA/RNA-Lösung steril und normgerecht befüllt
- in Messkammer des Spektrographen eingesetzt
- fokussierter monochromer Lichtstrahl  
→ Küvette → Sensor (Photodiode)
- aus Absorptionsgrad Rückschluss auf DNA/RNA-Konzentration in Küvette
- Referenzmessungen zwischen den Probenmessungen zur Kalibrierung
- Messgenauigkeit: relativer Messfehler bis etwa 0,2%



Quelle: [www.beckman.com](http://www.beckman.com)

# Zytometrie (Counting)

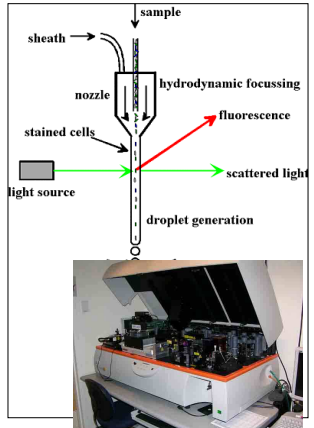
- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s



[www.ncicfcrf.gov](http://www.ncicfcrf.gov)

# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

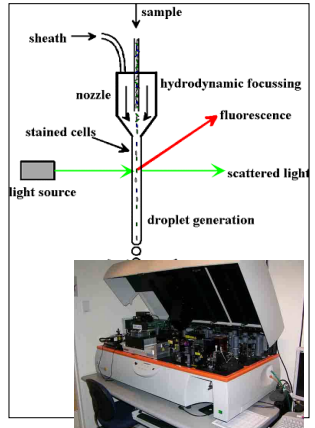


[www.ncicrf.gov](http://www.ncicrf.gov)



# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

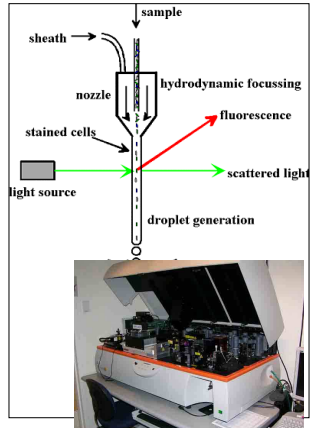


[www.ncicrf.gov](http://www.ncicrf.gov)



# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

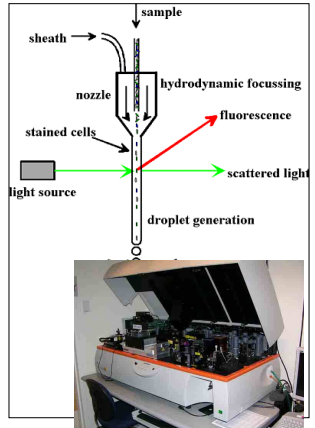


[www.ncicfcrf.gov](http://www.ncicfcrf.gov)



# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

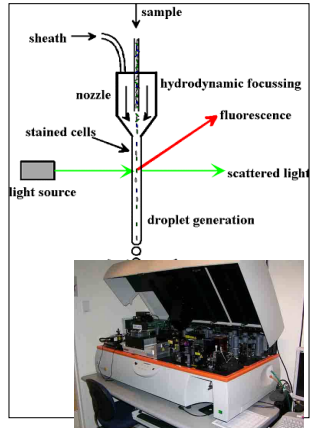


[www.ncicfcrf.gov](http://www.ncicfcrf.gov)



# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

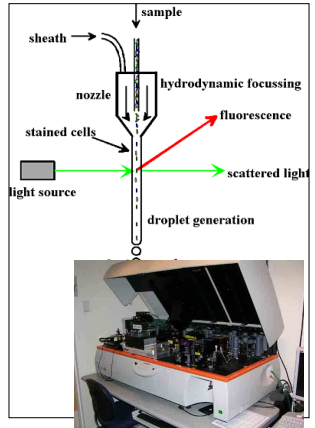


[www.ncicrf.gov](http://www.ncicrf.gov)



# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

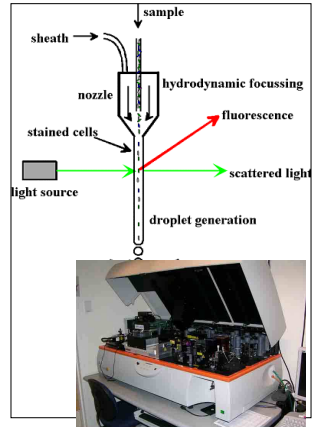


[www.ncicrf.gov](http://www.ncicrf.gov)



## Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s

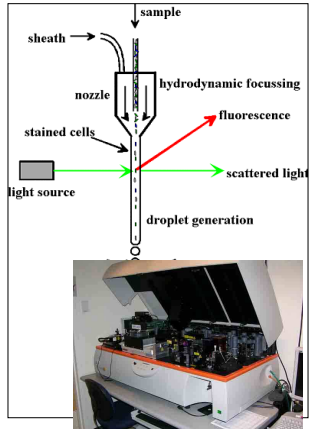


[www.ncicrf.gov](http://www.ncicrf.gov)



# Zytometrie (Counting)

- zerstörungsfreies **Zählen** (und ggf. Sortieren) chemisch markierter Partikel im Flüssigkeitsstrom
- Partikel (DNA/RNA) an Fluoreszenzmarker gebunden
- markierte Partikel in Lösung durch enge Trichterkapillare geleitet
- passieren dort Laserstrahl
- Laserstrahl regt Elektronen des Fluoreszenzmarkers kurzzeitig an
- angeregte Elektronen fallen unter Energieabgabe auf Ursprungsniveau
- dadurch Lichtaussendung spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenz)
- Lichtmenge durch Photodetektor messbar: Partikelanzahl
- Zählleistung moderner Geräte: bis etwa 20.000 Partikel/s



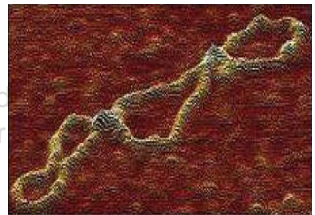
www.ncicrf.gov

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1 \mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



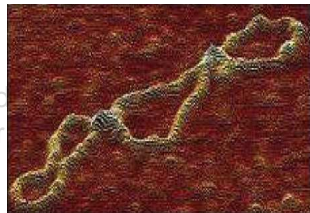
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1\mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



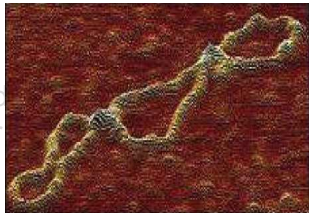
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1 \mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



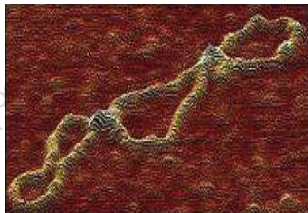
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1\mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

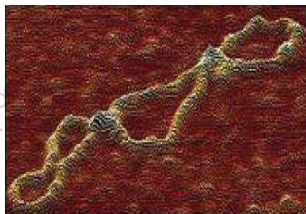


# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1\mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



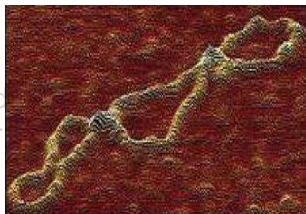
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1\mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



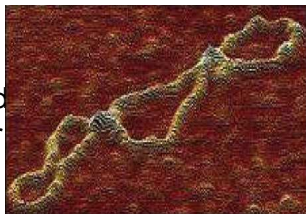
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1\mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



wikipedia



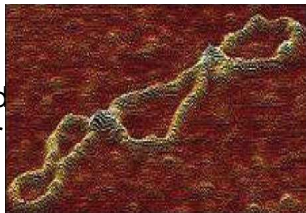
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Elektronenmikroskopie

- **Oberflächenstruktur** einzelner DNA/RNA-Moleküle sichtbar machen (single molecule analysis)
- Bereitstellung einer sehr dünnen Probe (Dicke  $\leq 1\mu\text{m}$ )
- Fixierung der DNA/RNA-Probe durch Schockgefrieren (etwa  $-90^\circ\text{C}$ ) in geeignetem Medium (z.B. Ethan)
- gleichmäßiger Beschuss der Probe mit Elektronen, die sich auf parallelen Bahnen zur Probe bewegen
- Elektronen bei Passage der Probe abgelenkt (Streuung) und gebremst
- Streuwinkel abhängig von Ordnungszahl des betref. Atoms in der Probe
- auswertbares Elektronenbeugungsbild entsteht, atomare Oberflächenstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm (vgl: DNA-Strang-Durchmesser etwa 2,5nm)



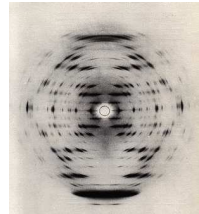
wikipedia



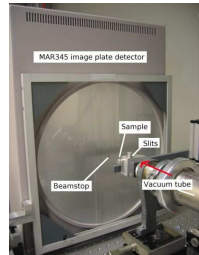
Plasmid: [www.genetik.uni-bielefeld.de](http://www.genetik.uni-bielefeld.de)

# Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



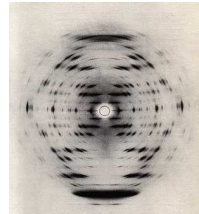
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



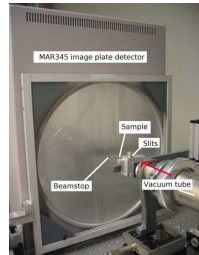
Diffraktometer: wikipedia

# Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
  - auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
  - diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
  - Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
  - Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
  - Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
  - u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
  - Auflösung: etwa 0,1nm



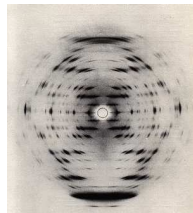
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



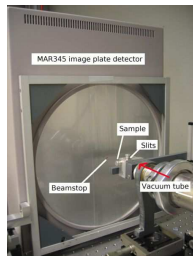
Diffraktometer: wikipedia

# Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



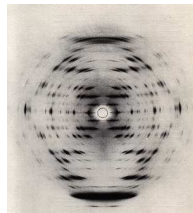
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



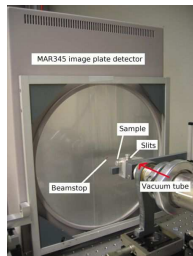
Diffraktometer: wikipedia

# Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)

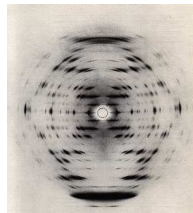


Diffraktometer: wikipedia

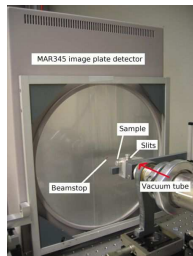


## Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



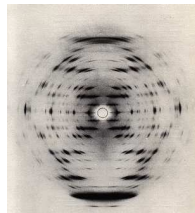
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



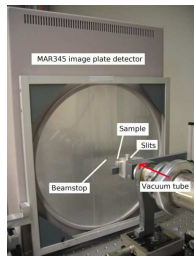
Diffraktometer: wikipedia

## Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



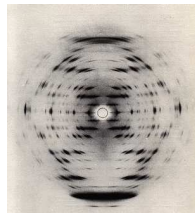
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



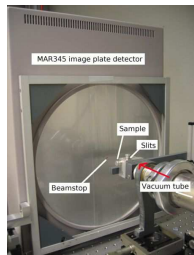
Diffraktometer: wikipedia

## Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



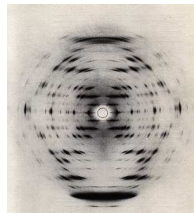
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



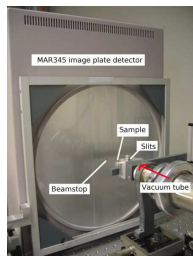
Diffraktometer: wikipedia

## Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



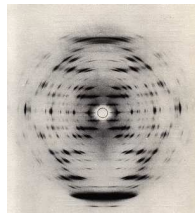
DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



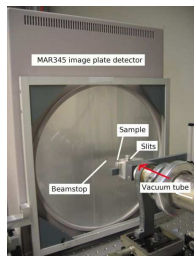
Diffraktometer: wikipedia

## Kristallographie

- Messung der **Elektronendichte-Verteilung** in einer Probe
- Röntgenbeugung (X-ray diffraction) genutzt:
- auftreffende Röntgenstrahlung regt Elektronen in Probe-Atomen zu Schwingungen an
- diese Schwingungen bewirken ihrerseits Aussendung von Röntgenstrahlen durch die angeregten Elektronen (Sekundärwellen)
- Sekundärwellen breiten sich kugelförmig um jedes betreffende Elektron aus
- Überlagerungseffekte (Interferenz, Phasenverschiebungen) zwischen Sekundärwellen der verschiedenen Elektronen in der Probe
- Interferenzmuster abhängig von räumlicher Lage der Elektronen zueinander
- u.a. Rekonstruktion der DNA-Tertiärstruktur
- Auflösung: etwa 0,1nm



DNA: [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)



Diffraktometer: wikipedia

# Hybridisierung und Ligation als Schlüsseloperationen

	Synthesis	Annealing	Melting	Union / Split	Ligation	Digestion	Labeling	Polymerisation	PCR	Affinity Purification	Gel Electrophoresis	Sequencing
fortlaufende Interaktionen zwischen verschiedenen DNA-Strängen Bestandteil der Operation		■			■							
Operation sequenzabhängig	■	■			■	■		■	■			■
Operation labelabhängig					■		■	■		■		■

- Nur Hybridisierung und Ligation auf DNA/RNA besitzen ein hohes **Strangkombinationspotenzial**, können eine große Vielfalt strukturell verschiedener Moleküle hervorbringen
- Implementierungen universeller (frei programmierbarer) DNA/RNA-Computer sind auf mindestens eine dieser beiden Operationen angewiesen
- Konstruktionsprinzip für potentiell abzählbar-unendlichen Pool unterscheidbarer Moleküle

# Seiteneffekte von DNA/RNA-Operationen *in vitro*

Eine echte Herausforderung im Labor!

		Synthesis	Annealing	Melting	Union / Split	Ligation	Digestion	Labeling	Polymerisation	PCR	Affinity Purification	Gel Electrophoresis	Sequencing
Abweichungen in der Primärstruktur der Ergebnis-DNA	Punktmutationen (ausgetauschte Nucleotide)	■							■	■			■
	Deletions (Nucleotidauslassungen)	■											
	Insertions (Nucleotideinfügungen)					■							
Abweichungen in der Sekundärstruktur der Ergebnis-DNA	unerwünschte nichtlineare DNA, hervorgerufen durch Basenfehlpaarungen		■			■			■	■			■
Abweichungen im Prozessverlauf	Clusterungen ineinander verknäuelter DNA											■	■
	zu niedrige DNA-Konzentration	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■
	Verunreinigungen durch Fremdstoffe	■				■	■	■	■	■	■	■	■
	unvollständige Reaktion		■	■		■	■	■	■	■	■		
	unspezifische Wirkungen einer Reaktion						■				■	■	■
	unerwünschte Denaturierungen und Rehybridisierungen		■	■		■	■	■	■	■		■	■
	Verlust von DNA-Strängen				■						■	■	■

# Einige funktionelle Bausteine für DNA/RNA-Algorithmen

## vorgefertigte „standardisierte“ Operationsfolgen

- **DNA-Libraries** (Adleman/Lipton) durch Annealing und Ligation **linearer** DNA (siehe z.B. Adleman-Experiment)
- Hairpin-Formation
- Whiplash PCR
- DNA Tiles

⇒ DNA-Libraries: Primärstruktur kodiert Information vollständig.  
Sehr materialintensiv!

⇒ Die anderen drei Ansätze versuchen, mit ein und derselben Primärstruktur eines Moleküls mehrere Sekundärstrukturen zu erzeugen: Primär- und Sekundärstruktur gemeinsam kodieren Information, weniger (nichtlineare) Moleküle benötigt



# Einige funktionelle Bausteine für DNA/RNA-Algorithmen

## vorgefertigte „standardisierte“ Operationsfolgen

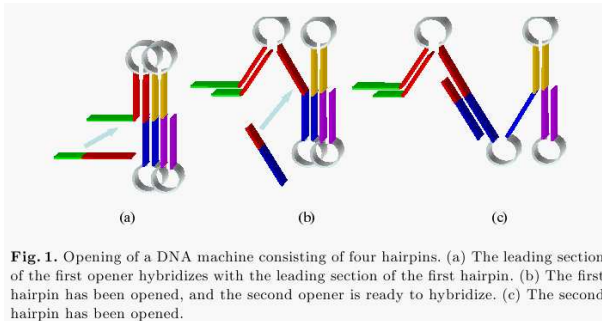
- **DNA-Libraries** (Adleman/Lipton) durch Annealing und Ligation **linearer** DNA (siehe z.B. Adleman-Experiment)
- **Hairpin-Formation**
- **Whiplash PCR**
- **DNA Tiles**

⇒ DNA-Libraries: Primärstruktur kodiert Information vollständig.  
Sehr materialintensiv!

⇒ Die anderen drei Ansätze versuchen, mit ein und derselben Primärstruktur eines Moleküls mehrere Sekundärstrukturen zu erzeugen: Primär- und Sekundärstruktur gemeinsam kodieren Information, weniger (nichtlineare) Moleküle benötigt

## Hairpin-Formation (I)

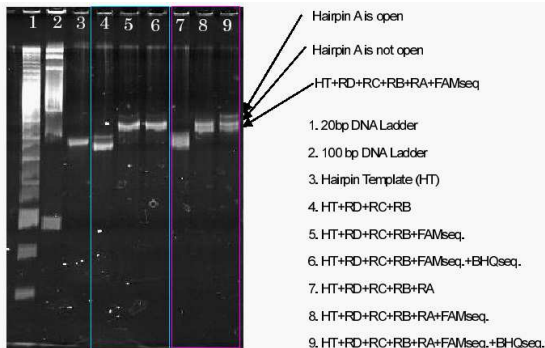
- Mechanismus zum temperaturgesteuerten Öffnen und Schließen von Hairpins designer Sequenzen (20... 55°C)
- zusätzliche Stränge ohne Hairpin mit „leading“ und „invading section“ zum Öffnen, nur Annealing und Melting
- Anwendungen: AND-Gatter und adressierbarer Speicher



**Fig. 1.** Opening of a DNA machine consisting of four hairpins. (a) The leading section of the first opener hybridizes with the leading section of the first hairpin. (b) The first hairpin has been opened, and the second opener is ready to hybridize. (c) The second hairpin has been opened.

# Hairpin-Formation (II)

## Experimentelle Ergebnisse (Polyacrylamidgel)



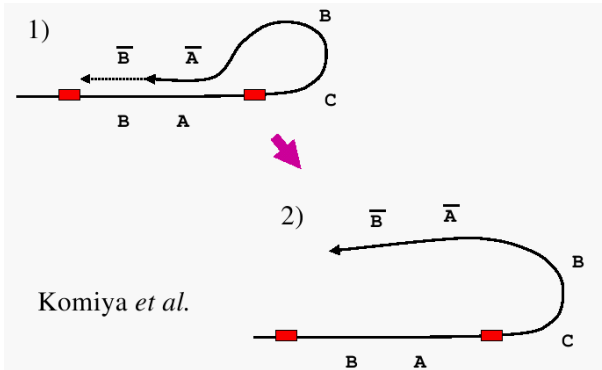
**Fig. 7.** PAGE analysis of the experiment shown in Fig. 6. Each lane is characterized by a combination of oligomers. FAMseq and BHQseq denote unmodified oligomers that have the same sequences as those of the FAM- and BHQ-modified oligomers, respectively.

RA, RB, RC, RD: openers, FAM, BHQ: hairpin-fähige Sequenzen

A. Kameda et al. Unravel Four Hairpins. LNCS 4287, pp. 381–392, 2006

# Whiplash PCR (I)

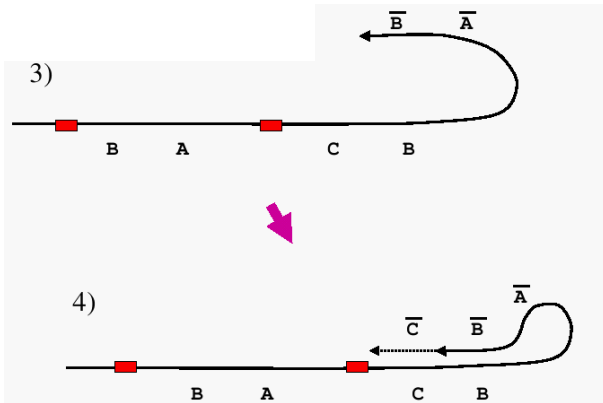
- whiplash: engl. Peitschenriemen
- PCR, bei der Primer und Template im selben Strang liegen
- Primeranlagerung durch Hairpin-Formation



M. Hagiya et al. Towards parallel evaluation of Boolean  $\mu$ -formulas with molecules. DNA3, DIMACS, 1999

K. Komiya et al. Successive State Transitions with I/O Interface by Molecules. LNCS 2054, pp. 17–26, 2001

# Whiplash PCR (II)



**rote Kästchen: Stoppersequenzen für Polymerisation**

M. Hagiya et al. Towards parallel evaluation of Boolean  $\mu$ -formulas with molecules. DNA3, DIMACS, 1999  
 K. Komiya et al. Successive State Transitions with I/O Interface by Molecules. LNCS 2054, pp. 17–26, 2001

## Whiplash PCR (III)

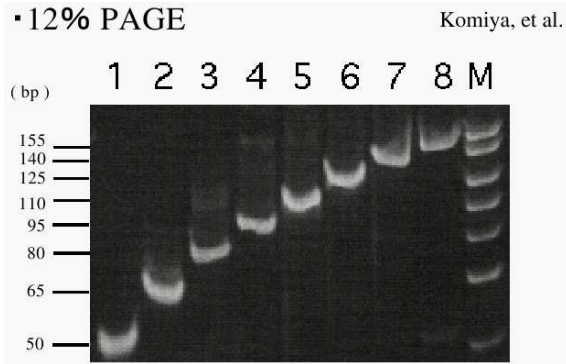
- Whiplash PCR verlängert zugrunde liegenden Einzelstrang schrittweise
- geeignet zur Implementierung von Zustandsübergängen (Automaten) *in vitro*
- durch Polymerisation entstandene Doppelstrangabschnitte kodieren Zustände



M. Hagiya et al. Towards parallel evaluation of Boolean  $\mu$ -formulas with molecules. DNA3, DIMACS, 1999  
K. Komiyama et al. Successive State Transitions with I/O Interface by Molecules. LNCS 2054, pp. 17–26, 2001

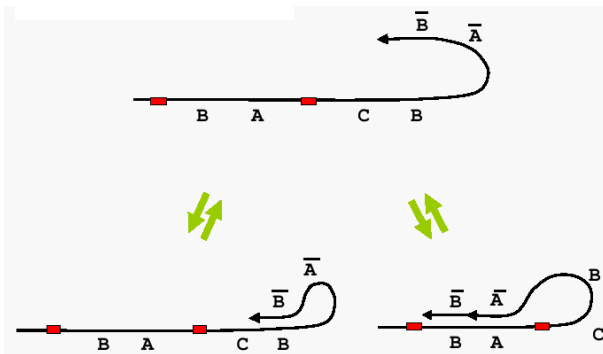
## Whiplash PCR (IV)

- erfolgreiche Implementierung von Zustandsübergängen
- jeder Zustand (1, . . . , 8) korrespondiert mit einem Einzelstrang spezifischer Länge
- Auslesbarkeit der Zustände im Polyacrylamidgel



## Whiplash PCR (V)

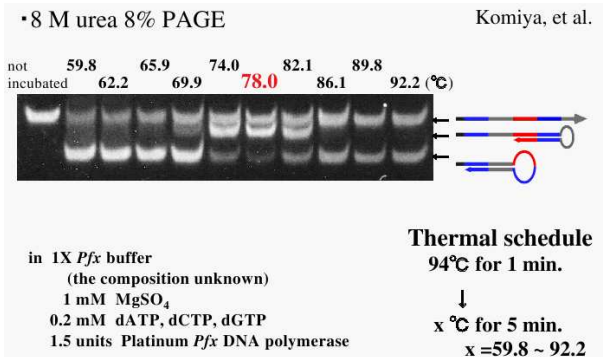
- durch „back hybridization“ von DNA-Einzelsträngen, die durch Whiplash PCR entstanden sind, können verschiedene Sekundärstrukturmuster entstehen
- dieser Umstand nutzbar für Aufbau von Strangvielfalten, die Lösungskandidaten für NP-Probleme kodieren (z.B. 3SAT, gezeigt durch Hairpin Engine, Sakamoto, 2000)





# Whiplash PCR (VI)

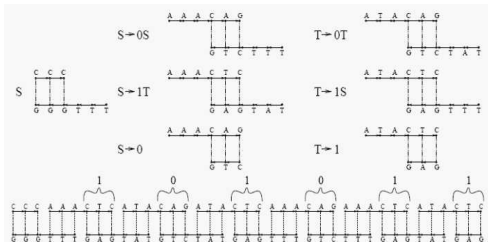
- Unterscheidbarkeit verschiedener Whiplash PCR-Produkte im Polyacrylamidgel
- experimentelle Optimierung der Temperatur für Annealing und Polymerisation



K. Komiya et al. Successive State Transitions with I/O Interface by Molecules. LNCS 2054, pp. 17–26, 2001

# DNA Tiles (I)

- tile: engl. Fliese, Puzzleteil
- vorgefertigte DNA-Schnipsel, die sich durch Annealing auf vielfältige Weise miteinander verbinden können, so dass selbsttätig komplexe 1-, 2- oder 3-dimensionale DNA-Strukturen entstehen
- Arbeitsmechanismus von Chomsky-Grammatiken unmittelbar *in vitro* implementierbar (self-assembly)

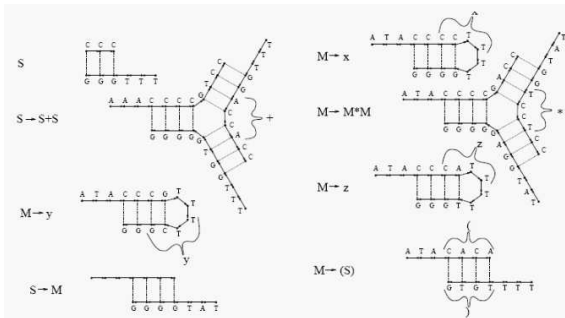


E. Winfree, F. Liu, L.A. Wenzler, N.C. Seeman. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals.

Nature 394(6693):539–544, 1998

## DNA Tiles (II)

- DNA Tiles durch Einzelstrangsynthese und Annealing geschaffen, vereinigt
- gleiche Schmelztemperatur für alle Strangüberhänge (Andockstellen) angestrebt
- zusätzliche Ligase festigt Stabilität entstehender Komplexe



E. Winfree, F. Liu, L.A. Wenzler, N.C. Seeman. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals.

Nature 394(6693):539–544, 1998

## Sequenzdesign (I)

- bildet sich als eigenständige Subdisziplin im Molecular Computing heraus
- Biologen und Physiker stark in Arbeiten einbezogen
- für jeden DNA/RNA-Computer „optimale“ Basensequenzen finden, um Berechnung effizient, skalierbar und möglichst seiteneffektarm ablaufen zu lassen
- Mengen von aufeinander abgestimmten Sequenzen bereitstellen, die bestimmte Eigenschaften haben (z.B. minimale Cross-Hybridization, gleiche Schmelztemperatur, keine Basenfehlpaarungen, gegebene Basenverteilung, ...)
- mehrere Softwaretools verfügbar (z.B. Sequenz-Compiler)

⇒ scheinbar gibt es mannigfaltige Kodierungsmöglichkeiten für Daten in DNA/RNA-Sequenzen, aber nur ein Bruchteil davon bewährt sich im praktischen Einsatz

⇒ Spezifika der Reagenzien, insbesondere Enzyme, sollten gut untersucht sein

## Sequenzdesign (II)

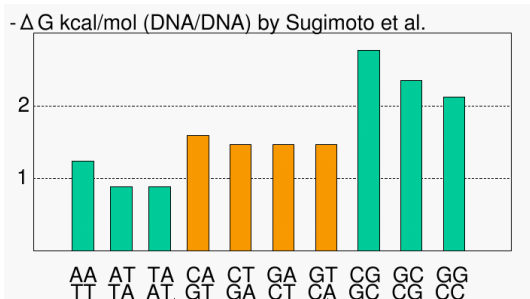
### grundlegende Ansätze

- zufällig gewählte oder genomische Sequenz-Sets testen, erfolgreiche nachnutzen, Templates (Adleman)
- vollständige Enumeration des Suchraumes *in silico*
- Heuristiken (z.B. genetische Algorithmen)
- thermodynamische Verfahren (z.B. Energieminimierung durch nearest neighbor)
- Nutzung kodierungstheoretischer Erkenntnisse (z.B. Hamming, BCH)
- Invertierung (Struktur → Sequenz)

# Beispiel: Thermodynamisches Verfahren

## Sequenzdesign (III)

- Simulation der wahrscheinlichsten Hybridisierung durch Bestimmung der DNA-Struktur mit minimaler freier Energie
- jede Basenpaarung verringert freie Energie, verbleibende einzelsträngige Enden erhöhen sie
- verbreiteter Ansatz: nearest neighbor aus 2bp-langen Fragmenten (Gradientenabstiegsverfahren)



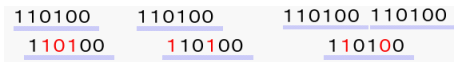
# Beispiele: Kodierungstheoretische Ansätze

## Sequenzdesign (IV)

Mapping zwischen A, C, G, T und Bits 0, 1 angenommen

### Beispiel 1: versetztes Annealing erschweren

Bitkette der Länge 6 produziert mindestens 2 Mismatches:



Annealing über mehr als 50% der Länge, auch mit reverser Bitkette

### Beispiel 2: fehlerkorrigierender Code

Hamming-Code oder BCH-Code, der Prüfbits (Redundanz) hinzufügt:

	1	1	0	1	0	0	4 Bit Template, mit Nullen aufgefüllt
+	0	1	0	0	1	1	Prüfbits (hier Hamming)
	A	T	C	A	G	G	DNA-Sequenz

feste Zuordnung: 2 Bit ergeben Base

# Beispiele: Kodierungstheoretische Ansätze

## Sequenzdesign (IV)

Mapping zwischen A, C, G, T und Bits 0, 1 angenommen

### Beispiel 1: versetztes Annealing erschweren

Bitkette der Länge 6 produziert mindestens 2 Mismatches:

<u>110100</u>	<u>110100</u>	<u>110100</u>	<u>110100</u>
<u>110100</u>	<u>110100</u>	<u>110100</u>	

Annealing über mehr als 50% der Länge, auch mit reverser Bitkette

### Beispiel 2: fehlerkorrigierender Code

Hamming-Code oder BCH-Code, der Prüfbits (Redundanz) hinzufügt:

	1	1	0	1	0	0	4 Bit Template, mit Nullen aufgefüllt
+	0	1	0	0	1	1	Prüfbits (hier Hamming)
<hr/>							
	A	T	C	A	G	G	DNA-Sequenz

feste Zuordnung: 2 Bit ergeben Base



# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

⇒ Feste Abfolgen von DNA-Operationen, die in der gleichen Weise wiederholt ausgeführt werden, wobei sich in jedem Durchlauf der DNA-Pool gezielt ändert.

⇒ In jedem Durchlauf können aber Operationsparameter verändert werden (z.B. anderes Restriktionsenzym, andere Temperatur)

⇒ Vorgabe der Operationsparameter gemeinsam mit dem initialen DNA-Pool bildet ein Programm im rechentechnischen Sinn

# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

⇒ Feste Abfolgen von DNA-Operationen, die in der gleichen Weise wiederholt ausgeführt werden, wobei sich in jedem Durchlauf der DNA-Pool gezielt ändert.

⇒ In jedem Durchlauf können aber Operationsparameter verändert werden (z.B. anderes Restriktionsenzym, andere Temperatur)

⇒ Vorgabe der Operationsparameter gemeinsam mit dem initialen DNA-Pool bildet ein Programm im rechentechnischen Sinn

# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

# Rothemunds Turingmaschine (I)

## Eine Pionierarbeit

- erste Implementierung eines frei programmierbaren (universellen) DNA-Computers
- einschließlich aller notwendigen Mechanismen zur Ablaufsteuerung
- basierend auf DNA-Standardoperationen
- Simulation von deterministischen Turingmaschinen
- gleiche DNA-Operationsfolge für jeden Turingtakt (Abstrahierbarkeit)

P.W.K. Rothemund. A DNA and Restriction Enzyme Implementation of Turing Machines.  
Report University of Pasadena, Caltech, 1995

## Rothemunds Turingmaschine (II)

### Vorteile

- Nachweis der technischen Realisierbarkeit erbracht
- Handling von 7 Zuständen und 4 Symbolen ausreichend, um **jede** TM zu emulieren (Minsky)
- leichte Portierbarkeit iterativer Algorithmen für molekulares Rechnen

### Nachteile

- Übernahme der sequentiellen Arbeitsweise
- Potenzial der massiven Datenparallelität im Molecular Computing nicht genutzt
- relativ langsam (etwa 4 Stunden pro Turingtakt)

P.W.K. Rothemund. A DNA and Restriction Enzyme Implementation of Turing Machines.  
Report University of Pasadena, Caltech, 1995

# DNA-Kodierung des Turingbandes

## Rothemunds Turingmaschine (III)

### Idee

- Ein-Ausgabe-Band = Plasmid
- gedankliche Unterteilung des Plasmids abwechselnd in jeweils 16bp und 10bp lange Abschnitte
- jeder 16bp-Abschnitt stellt ein Bandfeld dar und repräsentiert ein gespeichertes Zeichen der TM
- jeder 10bp-Abschnitt liefert einen vordefinierten Bereich, in welchem der DNA-Strang zerschnitten und wieder zusammengefügt werden kann

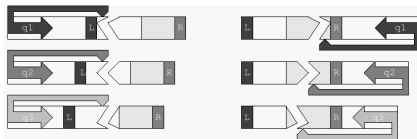


# DNA-Kodierung der Zustände und Kopfposition

## Rothemunds Turingmaschine (IV)

- Bandfeld, auf dem der Schreib-Lese-Kopf steht, durch einen separaten Doppelstrangabschnitt (**cutter**) ersetzt
- cutter enthält an vordefinierter Stelle die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym FokI
- FokI schneidet definiert außerhalb der Erkennungssequenz:  

$$\begin{array}{l} \text{GGATGNNNNNNNNNNNNNNN} \\ \text{CCTACNNNNNNNNNNNNNNN} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} \text{GGATGNNNNNNNNNNNNNNN} \\ \text{CCTACNNNNNNNNNNNNNNN} \end{array} + \text{NNNN}$$
- je nach Lage der Erkennungssequenz entstehen durch Schnitt Einzelstrangüberhänge spezifischer Länge im Schnittbereich des EA-Bandes neben dem Feld, auf dem der Kopf steht
- Überhanglänge kodiert Zustand (1...10)
- cutter enthält zusätzlich den neuen Inhalt für links bzw. rechts benachbartes Bandfeld



# DNA-Kodierung der Turingtabelle durch cutter

Rothemunds Turingmaschine (V)

## Beispiel

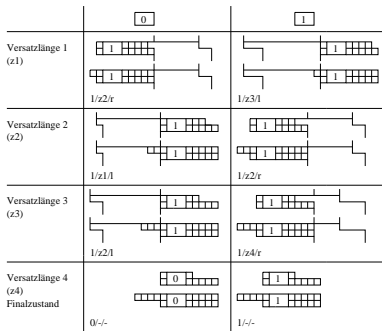
Busy-Beaver TM für 4 Zustände

$$\begin{aligned}
 TM &= (Z, \Sigma, \Theta, \{L, R\}, \delta, z_1, F) \\
 Z &= \{z_1, z_2, z_3, z_4\} \\
 \Sigma &= \Theta = \{0, 1\} \\
 F &= \{z_4\}
 \end{aligned}$$

$\delta$	0	1
$z_1$	$(1, z_2, R)$	$(1, z_3, L)$
$z_2$	$(1, z_1, L)$	$(1, z_2, R)$
$z_3$	$(1, z_2, L)$	$(1, z_4, R)$
$z_4$	stop	stop

Anfangsbandbelegung:  
00000000 . . .

⇒ schreibt fortlaufend 6 Einsen und geht in Finalzustand über



Da die Lücke mit dem Versatz sowohl links auch rechts vom Zeichenfeld liegen kann, werden für jeden Tabelleneintrag zwei Paßstücke benötigt.

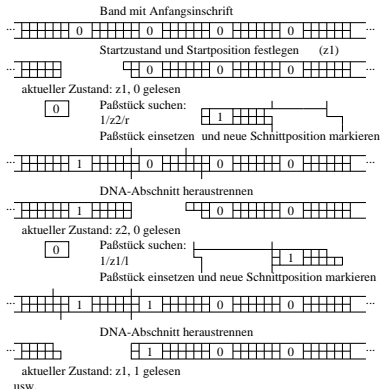
□ : DNA-Baustein



# Arbeitsweise der Turingmaschine

## Rothemunds Turingmaschine (VI)

- Plasmid mit Anfangsbandinschrift und cutter-Sequenz an der Startposition bereitgestellt
- cutter für Turingtabelle bereitgestellt
- Plasmid und alle cutter in ein Reagenzglas
- Turingtakt:
  - Schnitt mit FokI
  - Schnitt am entgegengesetzten Ende des cutters (BseRI)
  - Ligation
  - Plasmid clonen und Clone analysieren (Arbeitsende)



## Rothemunds Turingmaschine (VII)

- Busy-Beaver mit 4 Zuständen und eine universelle TM nach Minsky (7 Zustände) erfolgreich implementiert
- Mehrfachnutzung der cutter spart DNA-Material
- festgestellte Seiteneffekte bei den Implementierungen:
  - fehlgeschlagene und unvollständige Ligation und Restriktion, „star activity“, unerwünschte Denaturierung

	$q_1$	$q_2$	$q_3$	$q_4$	$q_5$	$q_6$	$q_7$
Y	OL $q_1$	OL $q_1$	YL $q_3$	YL $q_4$	YR $q_5$	YR $q_6$	OR $q_7$
O	OL $q_1$	YR $q_2$	Halt	YR $q_5$	YL $q_3$	AL $q_3$	YR $q_6$
I	IL $q_2$	AR $q_2$	AL $q_3$	IL $q_7$	AR $q_5$	AR $q_6$	IR $q_7$
A	IL $q_1$	YL $q_3$	IL $q_4$	IL $q_4$	IR $q_5$	IR $q_6$	OR $q_2$

Figure 17: The transition table for Minsky's 4 x 7 Universal Turing machine.

P.W.K. Rothemund. A DNA and Restriction Enzyme Implementation of Turing Machines. Caltech, 1995

# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

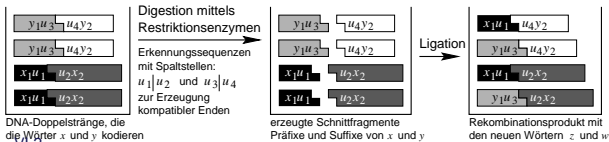
- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

# DNA-Splicing *in vitro* (I)

- erste theoretische Vorarbeiten durch Tom Head, 1987
- verkörpert eine feste Abfolge von DNA-Operationen, die durch Splicing-Systeme abstrakt beschrieben werden können
- Splicing-Systeme können massiv datenparallel arbeiten (Simulation von Chomsky-Grammatiken)
- Man kann zeigen, dass Splicing-Systeme die gleiche Berechnungsstärke erreichen können wie Turingmaschinen (im Theorieteil ausführlicher)

## Idee

Restriktionsspaltung und anschließende Ligation zur **Rekombination** von DNA-Strängen (Splicing-Operation)



# DNA-Splicing *in vitro* (II)

## Splicing-Operation

- gleichzeitig Restriktionsspaltung mit **zwei** Restriktionsenzymen, die so aufeinander abgestimmt sind, dass die erzeugten sticky-Enden ligationskompatibel sind (darüber hinaus gleiche Reaktionsbedingungen für beide Enzyme vorausgesetzt)
- Ligation

## Beispiel

5' -CCCCCTCGACCCCC-3' und 5' -AAAAAGCGCAAAAA-3'  
 3' -GGGGGAGCTGGGGG-5' 3' -TTTTTCGCGTTTTT-5'

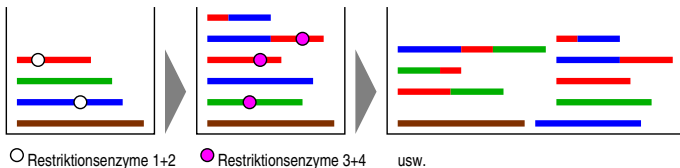
Restriktionsenzyme: TaqI  $\begin{matrix} T|CG A \\ A GC|T \end{matrix}$  und SfiI  $\begin{matrix} G|CG C \\ C GC|G \end{matrix}$

5' -CCCCCTCGCAAAAA-3' und 5' -AAAAAGCGACCCCC-3'  
 3' -GGGGGAGCGTTTTT-5' 5' -TTTTTCGCTGGGGG-5'

# DNA-Splicing *in vitro* (III)

## Arbeitsweise

- Bereitstellen eines initialen DNA-Pools (Axiome)
- fortlaufende Splicing-Operationen, Abfolge der eingesetzten Restriktionsenzyme von außen bestimmt
- Gesamtheit der Restriktionsenzyme (Erkennungssequenzen und Spaltstellen) repräsentiert Programm
- alle eingesetzten Restriktionsenzyme schneiden innerhalb der jeweiligen Erkennungssequenz
- jede Splicing-Operation vergrößert die Anzahl unterschiedlicher Strangsequenzen im Pool (exponentielles Wachstum möglich)
- Analogien zur Erzeugung formaler Sprachen durch Termersetzungsregeln vorhanden



⇒ Wie programmiert man Splicing-Systeme? Später im Theorieteil.

## DNA-Splicing *in vitro* (IV)

### Varianten bzgl. verwendeter DNA-Strukturen

- lineares Splicing
- zirkuläres Splicing
- Baumsplicing

### Varianten bzgl. des experimentellen Aufbaus

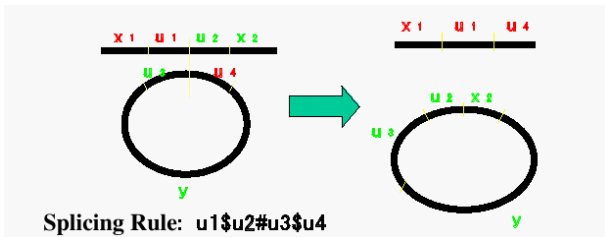
- one-pot-Ansatz, Eintubesysteme (statischer Aufbau), Enzyme zeitlich gestaffelt oder alle gleichzeitig
- Mehrtubesysteme mit/ohne zusätzlicher Filterung (statischer Aufbau)
- zeitvariable Ansätze (dynamisch veränderbarer Aufbau)

⇒ Variantenkombinationen in Erprobung, mit spezifischen Vor- und Nachteilen behaftet

# Zirkuläres DNA-Splicing *in vitro*

## DNA-Splicing *in vitro* (V)

- größere Variabilität rekombinierbarer DNA-Strukturen schaffen als beim linearen DNA-Splicing
- ein DNA-Ring kann (gedanklich) an vielen Stellen aufgeschnitten werden
- aus einem DNA-Ring lassen sich so viele verschiedene lineare DNA-Stränge erzeugen
- dieses zusätzliche Kombinationspotenzial beim zirkulären Splicing ausgenutzt





# Baumsplicing *in vitro*

## Splicing *in vitro* (VI)

- bevorzugt für RNA-Strukturen verwendet
- Verzweigungen innerhalb eines RNA-Stranges als Baumstruktur angesehen

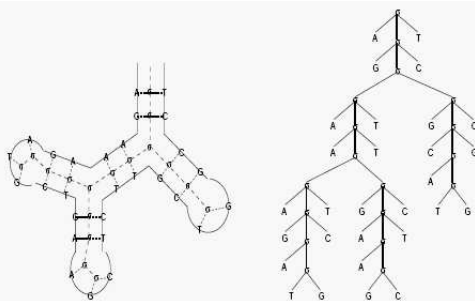


Figure 4: A physical secondary structure of RNA sequence and a derivation tree (skeleton) which corresponds to the secondary structure.

# Baumsplicing *in vitro*

## Splicing *in vitro* (VII)

- Splicing-Operation hier: kreuzweiser Austausch von Teilbäumen

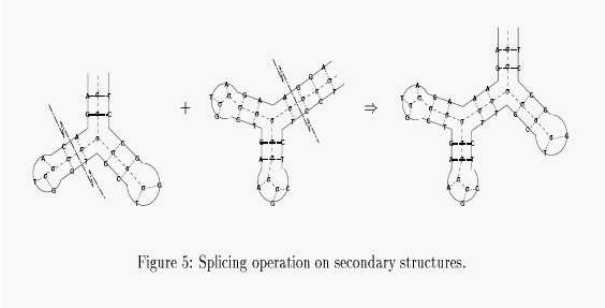
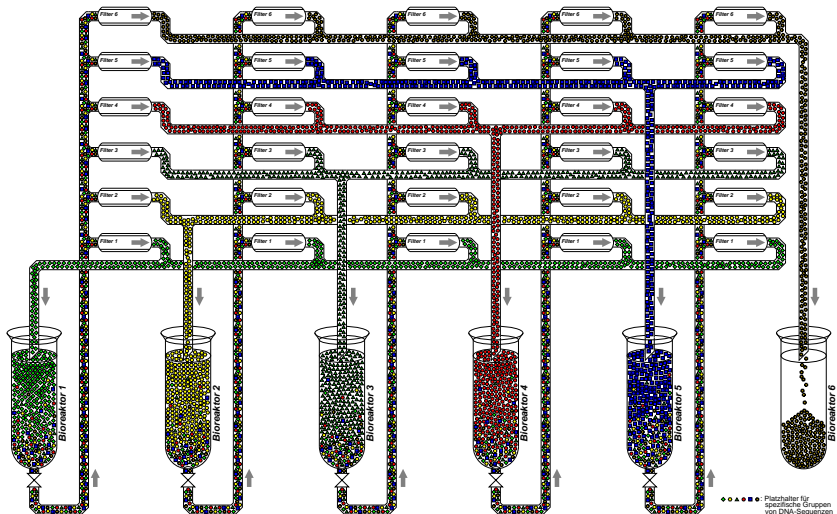


Figure 5: Splicing operation on secondary structures.

Y. Sakakibara. Splicing on Tree-like Structures. DIMACS, 1997

# Prinzipskizze eines Mehrtubesystems mit Filterung

## DNA-Splicing *in vitro* (VIII)



## DNA-Splicing (IX)

- sehr vielversprechendes Konzept im DNA-Computing
- gute theoretische Fundierung
- erfolgreiche Experimente *in vitro* (z.B. Laun)
- vereinigt massiv-datenparallele Verarbeitung mit seiteneffektarmer Implementierung im Labor
- Programmierparadigma auf Basis von Chomsky-Grammatiken in Entwicklung
- zunehmender Pool entsprechender Algorithmen
- So könnte ein programmierbarer praktischer DNA-Computer der Zukunft funktionieren

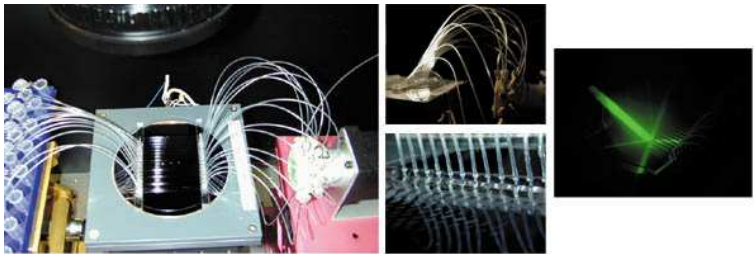
# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

# Mikroflussreaktoren (I)

- erster Schritt zur Automatisierung von Laborabläufen
- DNA-Computer als physische Hardwareeinheit aufbauen
- Forschungsgruppe McCaskill, FhG (ehem. GMD)
- erster Prototyp Ende 1990er Jahre
- Ziel: Miniaturisierung des Laboraufbaus



erster Prototyp, Quelle: [www.ercim.org](http://www.ercim.org) (BioMIP)

## Mikroflussreaktoren (II)

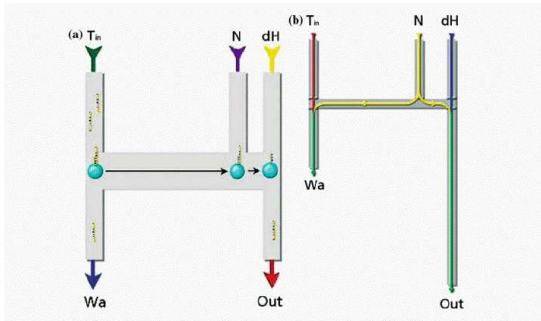
### Idee

- Systemaufbau aus Vielzahl von Reaktorkammern, die durch Pipelines (Kapillare) miteinander verbunden sind
- DNA in wässriger Lösung durch dieses System geleitet („Durchlaufmechanismus“, Kaskade, Baum oder Kreis)
- Reaktorkammern sind jeweils auf Ausführung bestimmter DNA-Operationen spezialisiert, z.B.
  - Separation (Auswahl-Transfer-Module, STM)
  - Inkubation (z.B. Amplifikation)
  - Detektion (Fluoreszenzkammern)
- Mikroventile gestatten flexible Topologien (Verschaltung der Reaktorkammern)
- Analogien zu elektronischen Schaltkreisen mit Funktionselementen und Leiterbahnen (z.B. FPGAs), hier jedoch massive Datenparallelität

# Auswahl-Transfer-Modul

## Mikroflussreaktoren (III)

engl. Selection Transfer Module (STM), Separation nach Subsequenz



*Figure 2.* (a) The principle of the selection transfer module (STM). The DNA template comes in through channel  $T_{in}$ . Some of the DNA-strands will hybridise to the selector-strand, which is immobilised on the paramagnetic beads, the rest disappears through the waste ( $Wa$ ). The beads are moved with a magnet past a wash/neutralisation channel  $N$ , to rinse off the unbound strands, into the denaturation channel  $dH$  from where the selected strands will be transported after a continuous flow neutralisation step, to the next STM ( $Out$ ). No fluidic switching of flows is required. (b) The required behaviour of the flows in the selection module. The neutralisation flow ( $N$ ) has to mix 1:1 with the de-hybridisation flow ( $dH$ ).  $T_{in}$  is the template solution,  $Wa$  is the waste outlet while  $Out$  is the channel transferring the selected DNA strands to the next STM.



# Auswahl-Transfer-Modul im Experiment

## Mikroflussreaktoren (IV)

Simulation der Durchlaufgeschwindigkeiten zur Aufbauoptimierung



*Figure 8.* The flow pattern with velocity vectors in the STM. The velocity is indicated by the length and colour of the vector. It clearly shows that the simulation gives the desired flow as set-up with the model and that the ratio of mixing is 1:1 in the right side of the STM. The units are arbitrary.

D. van Noort, J.S. McCaskill. Flows in micro fluidic networks: From theory to experiment. *Natural Computing* 3:395-410, 2004

# Auswahl-Transfer-Modul im Einsatz

## Mikroflussreaktoren (V)

- Durchflussgeschwindigkeit optimal wählen:
- mögl. konstant, hoher Einfluss auf Fehlerrate ( $< 0,9\%$ )
- erster Aufbauschritt: Kopplung von 16 STMs in Reihe
- Pumpraten:  $v_T = 3 \frac{\text{nl}}{\text{s}}$ ,  $v_N = 96 \frac{\text{nl}}{\text{s}}$ ,  $v_{dH} = 24 \frac{\text{nl}}{\text{s}}$

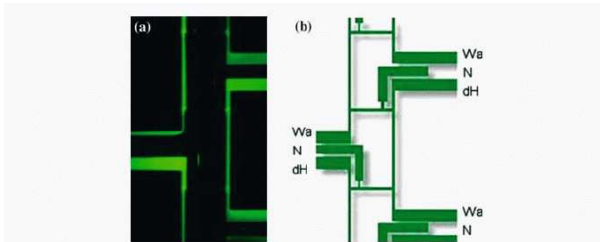


Figure 10. The flow pattern in a part of the DNA computer. Three STMs are shown in sequence here. (a) Shows the flows in the actual reactor with Rhodamine 6G dye, while (b) Shows the part of the network with the inputs and outputs which is shown in A on the same scale and location. DH, de-hybridisation inlet; N, the neutralisation inlet; Wa, the waste.

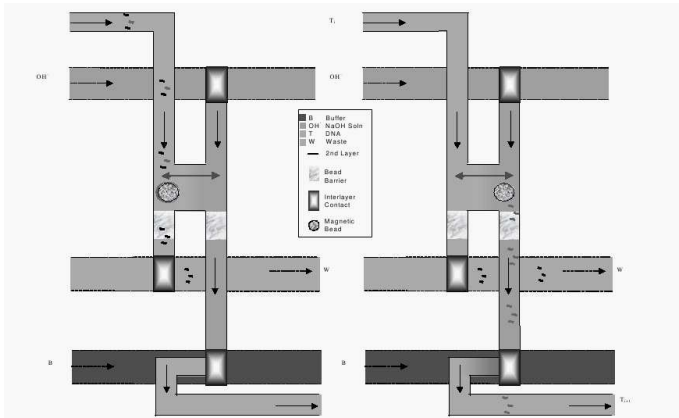
# Miniaturisierung

## Mikroflussreaktoren (VI)

- Analogien zur Herstellung elektronischer integrierter Schaltkreise
- Belichten und Einätzen der Reaktorkammern und Kapillaren in Silizium-Wafer
- Waferdicke:  $400\mu\text{m}$ , Kapillardurchm.:  $50\text{...}100\mu\text{m}$ , Reaktorkammern:  $200\mu\text{m}$
- Abbildung der Mikroflussreaktor-Topologie in 2D
- dynamisch photochemische Rekonfiguration durch Lichtmuster
- fertig strukturierter Wafer  $\longrightarrow$  Programm des DNA-Computers
- potentiell skalierbarer Ansatz durch Kopplung oder Erweiterung der Waferstruktur

# Miniaturisiertes Auswahl-Transfer-Modul

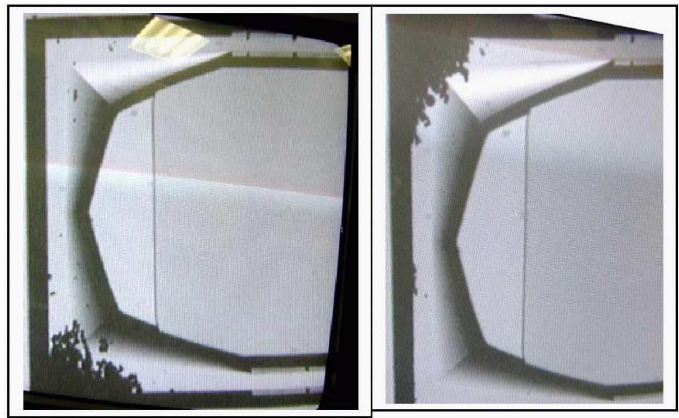
## Mikroflussreaktoren (VII)



**Fig. 1.** Alternating states of strand transfer module as proposed in [2]. Selected (red) and non-selected (black) DNA flow in the left solution past beads (only one shown) in a hybridizing buffer. Non binding DNA leaves through the left channel. Upon bead transfer (right hand diagram), bound DNA dissociates from the bead in the non-hybridizing buffer and leaves through the right hand channel before being neutralized (below) for further processing.

# Beadverschiebung im min. Auswahl-Transfer-Modul

## Mikroflussreaktoren (VIII)



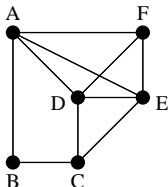
**Fig. 5.** Switching of magnetic beads between two buffer solutions in microflow module. Flow is from the right and the bead barrier is on the left of each picture. The left hand picture shows the situation with the magnet below, the right hand image the same for the magnet above. Single beads may be discerned. Under-etching of the silicon channel structures with the anisotropic etch method can be seen. This assists the mobility of the beads.

J.S. McCaskill, R. Penchovsky, M. Gohlke, J. Ackermann, T. Rucker. Steady Flow Micro-Reactor Module for

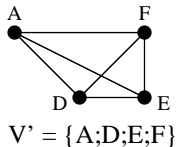
# Beispielanwendung: Maximum Clique Problem

## Mikroflussreaktoren (IX)

- **gegeben:** endlicher ungerichteter Graph  $G = (V, E)$
- **Clique:** Teilgraph  $G' = (V', E')$  mit  $V' \subseteq V$  und  $E' \subseteq V' \times V'$ , so dass paarweise *alle* Knoten aus  $V'$  durch Kanten aus  $E$  miteinander verbunden sind
- **maximale Clique:** Clique in  $G$  mit der größten Knotenanzahl  $k = |V'|$
- NP-vollständiges Problem:  
alle Teilmengen aus  $V$  durchmustern und abprüfen



$k = 4 \longrightarrow$  JA

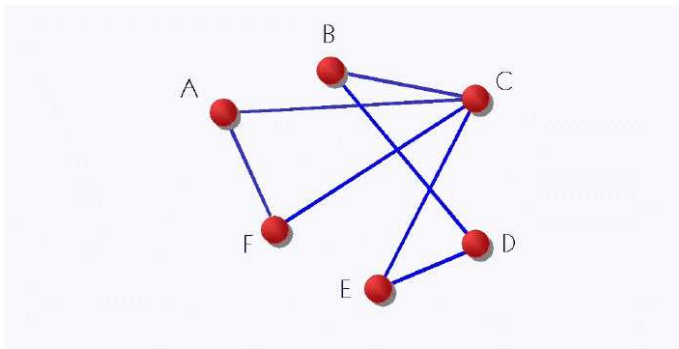


$k = 5 \longrightarrow$  NEIN

# Maximum Clique Problem: Benchmark-Instanz

Mikroflussreaktoren (X)

gewählte Instanz:  $|V| = 6$ , max. Clique:  $k = 3$



**Fig. 1.** An  $N = 6$  instance of the clique problem. The maximum clique is given by ACF, represented by 101001.

D. van Noort, F.U. Gast, J.S. McCaskill. DNA Computing in Microreactors. LNCS 2340:33-45, 2002

# Algorithmus für Mikroflussreaktor

## Mikroflussreaktoren (XI)

### Prinzip

- für jede Knotenteilmenge Bitstring (z.B. ACF: 101001)
- Bitstring durch DNA-Einzelstrang kodiert (DNA-Library)
- jedes Bit spezifische DNA-Sequenz
- $6 \times 6$  Verbindungsmatrix durch bead-immobilisierte DNA-Sequenzen abgebildet
- schrittweise STM-Separationen nach Library-Strängen mit den geforderten Verbindungen (Durchflussnetzwerk)

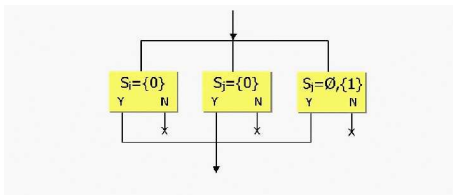


Fig. 2. A flow diagram showing the selection step for node subsets regarding 'elikeness' at  $(i, j)$ . The three modules reflect that either node  $i$  or node  $j$  is absent or the edge  $(i, j)$  must be present in the graph.

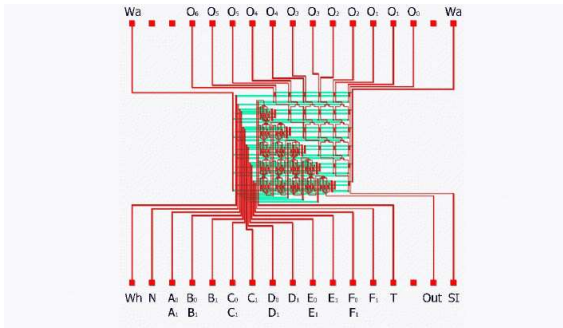


# Layout für Maximum Clique Problem mit $|V| = 6$

## Mikroflussreaktoren (XII)

Dreieck oben rechts: Sortieren nach Anzahl 1 in Lib.-Strängen

Dreieck unten links: 15 STMs für Tests Verbindungsmatrix

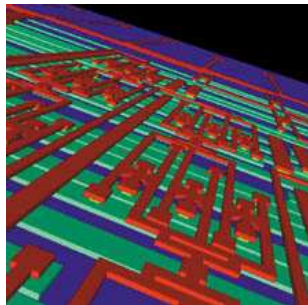


**Fig. 6.** The complete design of the DNA-computer for graphs with up to 6 nodes. The top right triangle does the length selection, while the other half does the clique selection. The square pads are the input and outputs of the DNA-computer, while the rest of the channels are supply channels. These are connected on the back of the wafer with the reactors (the light grey, horizontal channels).

# Programmierbarkeit

## Mikroflussreaktoren (XIII)

- Programmierbarkeit, Konfigurierbarkeit und Skalierbarkeit durch Ätzworlage des Wafers
- gesamte Berechnung in einem Aufbau
- Datenflussarchitektur (MIMD)
- Universalität z.B. durch Zusammenschaltung von NAND-Gattern
- größere Maximum Clique Implementierung mit  $|V| = 20$  (190 STMs, 210 sorting modules) in Vorbereitung



Quelle: [www.ercim.org](http://www.ercim.org) (BioMIP)

# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

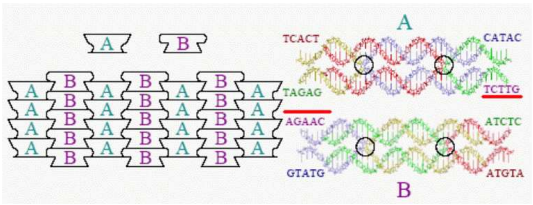
## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

# DNA/RNA self-assembly (I)

## Idee

- Rechnen durch autonome Anordnung von DNA oder RNA Tiles (siehe Vorlesungsteil funktionelle Bausteine)
- Prinzip der Selbstorganisation:
- Tiles („Puzzlesteine“) gemeinsam in wässrige Lösung gegeben (viele Kopien)
- anschließend Hybridisierung unter Zugabe von Ligase
- Auswertung der daraus hervorgegangenen DNA/RNA-Strukturen (1D, 2D, 3D)
- Analogien zu zellulären Automaten



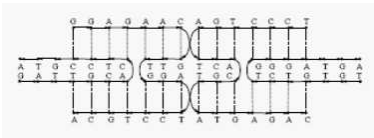
Double crossover tiles: Winfree, Rothemund, Wang. DNA Computing by Self-Assembly, Caltech, 2003

# Double Crossover Tiles

## DNA/RNA self-assembly (II)

- Double Crossover Tiles bilden universelle Bausteine
- Schaffung standardisierter, aufeinander abgestimmter Bausteine
- jedes Tile strukturell stabil, besteht aus 4 Einzelsträngen
- vier Andockmöglichkeiten für benachbarte Double Crossover Tiles
- entsprechende sticky-Enden ermöglichen kontextabhängiges Anlagern
- **Entstehen langer Einzelstränge**
- Rotation und Spiegelung beim Anlagern ausgeschlossen

## Beispiel

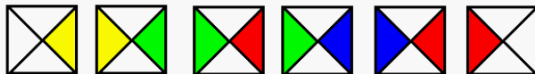
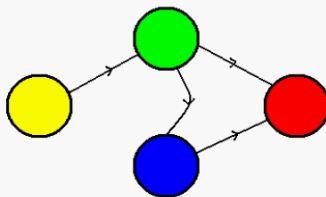


# Beispiel 1D: Vereinfachtes Hamiltonkreisproblem

## DNA/RNA self-assembly (III)

1D self-assembly reicht, um hamiltonsche Pfade (jeder Knoten genau einmal besucht) in Graphen zu finden

Goal: try to find path  
from start vertex  
(yellow) to end vertex  
(red) visiting every  
vertex once



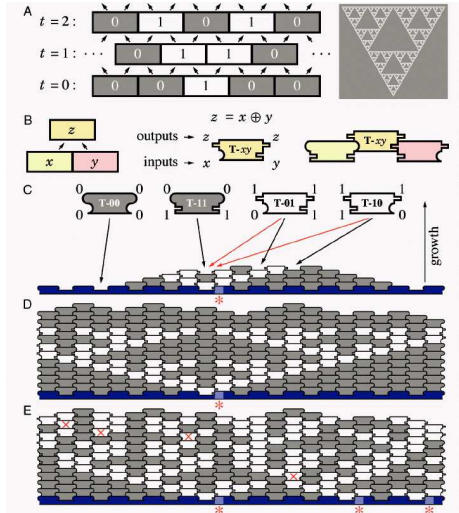
Quelle: Chris Wood. DNA Computing. CS462b, 2007

# Beispiel 2D: Sierpinski XOR-Dreiecke

## DNA/RNA self-assembly (IV)

- zellulärer Automat emuliert hinter-einandergeschaltete XOR-Operationen
- Anwendung: z.B. one time pad (Kryptographie, sicherer Code)
- Hybridisationsfehler:  $\leq 1\%$

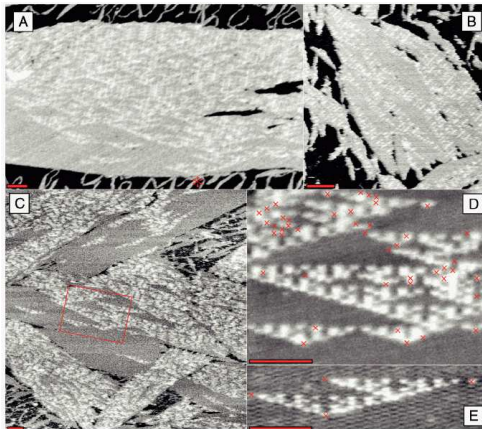
P.W.K. Rothemund, N. Papadakis, E. Winfree.  
Algorithmic Self-Assembly of DNA Sierpinski Triangles.  
PLoS Biology 2(12):2041-2053, 2004



# Beispiel 2D: Sierpinski XOR-Dreiecke

DNA/RNA self-assembly (V)

elektronenmikroskopische Aufnahmen, **x**: Anordnungsfehler



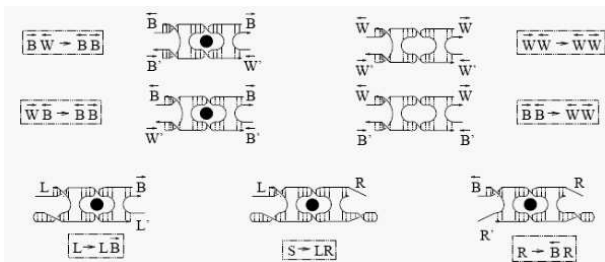
P.W.K. Rothemund, N. Papadakis, E. Winfree.  
Algorithmic Self-Assembly of DNA Sierpinski Triangles.  
PLoS Biology 2(12):2041-2053, 2004



# Programmierbarkeit

## DNA/RNA self-assembly (VI)

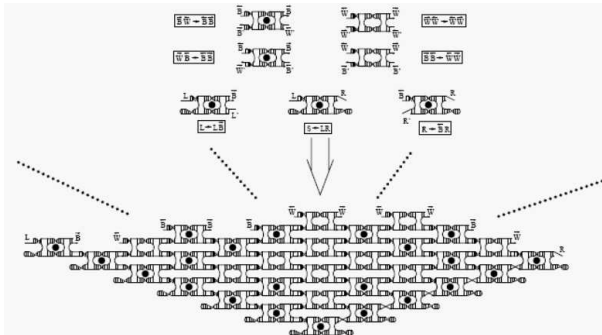
- Emulation von Chomsky-Grammatiken (Typ0), mithin Generation rekursiv aufzählbarer formaler Sprachen (= Turing-Universalität)
- Chomsky-Grammatik hierzu in Kuroda-Normalform überführen ( $AB \rightarrow CD$ ,  $A \rightarrow BC$ ,  $A \rightarrow a$ ,  $A \rightarrow \varepsilon$ )
- vielen Startsymbol-Andockstellen vorgeben, Sprache „wachsen lassen“



# Programmierbarkeit

## DNA/RNA self-assembly (VII)

Aus jeder vorgegebenen Startsymbol-Andockstelle kann ein Wort der Sprache wachsen,  
Auslesen z.B. durch Fluoreszenzstoffe, die in all jene Tiles eingelagert werden, die Terminalsymbole hervorbringen  
aufwendige Einzelmolekülanalyse erforderlich

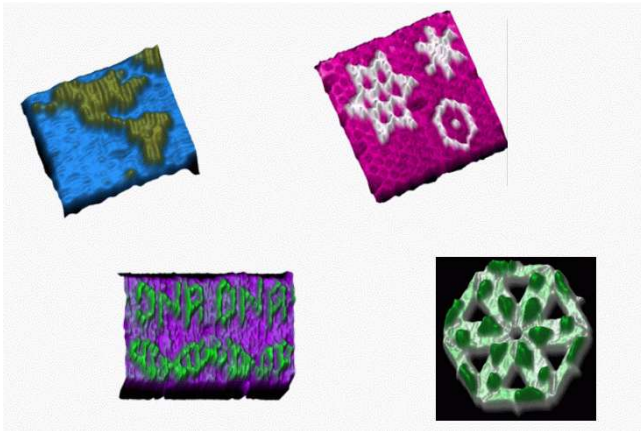


P.W.K. Rothemund, E. Winfree. The Program-Size Complexity of Self-Assembled Squares. ACM Symposium on Theory of Computing, 2000

# Weiterentwicklung 3D: DNA Origami

DNA/RNA self-assembly (VIII)

≈ 50 Milliarden DNA Tiles erzeugen komplexe 3D-Strukturen in wenigen Stunden

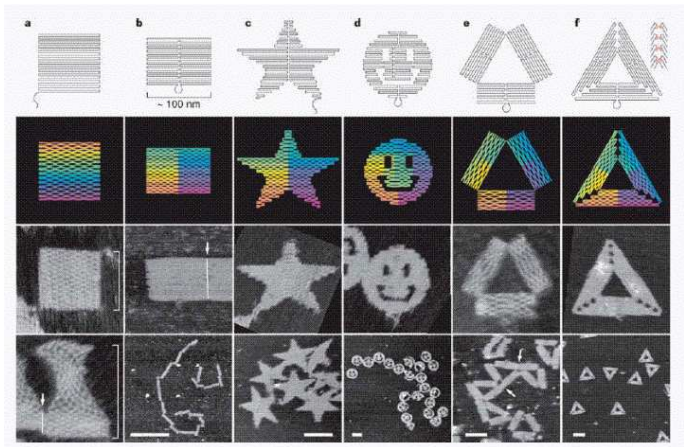


P.W.K. Rothemund. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns, Nature, 2006

# Weiterentwicklung 3D: DNA Origami

DNA/RNA self-assembly (IX)

auch kleinere Strukturen ( $\approx 100\text{nm}$ )  
nach freier Vorgabe realisierbar



P.W.K. Rothemund. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns, Nature, 2006

# Self-Assembly → DNA-Nanomaschinen

## DNA/RNA self-assembly (X)

- self-assembly sehr flexibel in Schaffung feinstrukturierter Moleküle (10 mal kleinere Strukturen als durch Belichtungsverfahren herstellbar)
- DNA gibt ein Gerüst für Nanomaschinen, in das RNA-Fragmente, Proteine und ggf. weitere Hilffstoffe eingelagert und bei Bedarf freigesetzt werden können



# Vorstufen universeller Biohardware auf DNA

## Universelle Operatoren – Metaoperatoren

- **Rothemunds Turingmaschine**
- **DNA-Splicing**
- **Mikroflussreaktoren**
- **DNA/RNA self-assembly**
- **molekulare Maschinen**

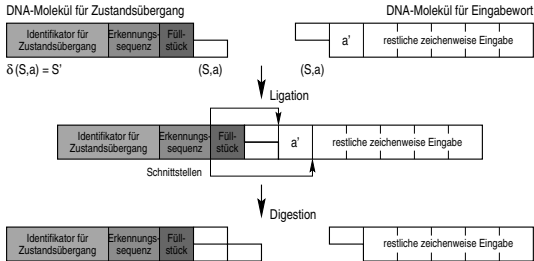
# Molekulare Maschinen

- Schnittstelle zur Nano- und Werkstofftechnik
- sehr junges Forschungsgebiet mit weitreichendem Anwendungspotenzial
- Computing: agentenbasierte kommunizierende molekulare Systeme (Amorphous Computing)
- Medizin: molekulare Diagnose- und Therapieeinheiten
- Technik: z.B. molekulare Schrittmotoren und Steuerungseinheiten
- Merkmal: autonome Arbeitsweise

# Beispiel1: Shapiros autonomer endlicher Automat

## Molekulare Maschinen (II)

### Molecular Programming



Papervorlage für Grafik: Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro. Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. Nature 414:430-434, 2001

7 Zustände, etwa 20 Transitionen

Erweiterungen hin zu nichtdeterministischer TM angedacht





## Zusammenfassung

- Hybridisierung und Ligation sind Schlüsselprozesse, auf den (frei) programmierbare DNA/RNA-Computer aufsetzen
- verschiedene universelle Arbeitsmechanismen in laborpraktischer Erprobung, Präferenzen für parallelitätsausnutzende Systeme
- zunehmende Zahl von Patenten auf biomolekulare Hardware(komponenten) – Verbote kommerzieller Anwendungen
- Fehleranfälligkeit und Ablaufautomatisierung im Labor *in vitro* als Herausforderungen
- Termersetzungssysteme (Chomsky-Grammatiken) am häufigsten als (abstrakte) Programmiersprache in Betracht gezogen