

# Aufbau von DNA-Architekturen mit RNA-Haarnadelschleifen\*\*

Günter Mayer, Damian Ackermann, Nicole Kuhn und Michael Famulok\*

Nucleinsäuren können als Materialien für den effizienten Aufbau selbstorganisierter Nanoarchitekturen fungieren.<sup>[1]</sup> Die Leichtigkeit, mit der komplementäre Nucleinsäurestränge konzipiert, synthetisiert und mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen ausgestattet werden können,<sup>[2]</sup> eröffnet einen schnellen Zugang zu funktionalisierten Materialien. Daher wurden DNA und in einem geringeren Maße auch RNA<sup>[3]</sup> verwendet, um eine Vielzahl von Objekten,<sup>[4]</sup> darunter Borromäische Ringe,<sup>[5]</sup> Röhren<sup>[6]</sup> sowie zweidimensionale Formen oder Muster,<sup>[7]</sup> im Nanometer-Maßstab aufzubauen. Die überwiegende Mehrheit dieser Strukturen beruht auf der spontanen Hybridisierung durch Watson-Crick-Basenpaare, die eine kontrollierte Bildung dieser Topologien ermöglicht. Der Aufbau verzweigter dreidimensionaler Strukturen oder unterschiedlicher Topologien ist so jedoch nur schwer zu verwirklichen. Mögliche Lösungen hierfür bieten verzweigte DNA-Moleküle und synthetische DNA-Derivate mit Tris-oligonucleotid-Verzweigungen<sup>[8]</sup> oder orthogonale Stützen auf der Basis von Polyamiden des Dervan-Typs.<sup>[9]</sup> Diese Systeme bieten die Möglichkeit, die Dimension und die Komplexität von Nucleinsäure-basierten selbstorganisierten supramolekularen Architekturen beträchtlich zu erweitern, indem sie als sequenzspezifischer „Klebstoff“ agieren, der den kontrollierten Aufbau von Nanoobjekten ermöglicht, die sich aus mehreren Einzelementen zusammensetzen.

Außer Watson-Crick-Basenpaarungen nutzen natürliche Nucleinsäuren auch andere Strukturelemente zur Bildung stabiler Tertiärstrukturen. So bilden DNA-Moleküle G-Quadruplex-Strukturen an den Enden der Telomere und in Promotorregionen, die sich durch aufeinander liegende Schichten von G-Quartetten auszeichnen, die zusätzlich durch ein zentrales einwertiges Kation stabilisiert werden.<sup>[10]</sup> In RNA-Molekülen finden sich immer wiederkehrende Motive intramolekularer RNA-RNA-Wechselwirkungen, die als modulare Bausteine den Aufbau komplexer und meist sehr stabiler RNA-Tertiärstrukturen ermöglichen.<sup>[11]</sup> Solche nichtkanonischen RNA-Motive für den Aufbau selbstorganisierter Architekturen nutzbar zu machen, würde deren Variationsbreite deutlich erhöhen.

[\*] Dr. G. Mayer, Dr. D. Ackermann, N. Kuhn, Prof. Dr. M. Famulok  
Universität Bonn, LIMES-Life and Medical Science Institut  
Programmeinheit Chemische Biologie und Medizinische Chemie  
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)  
Fax: (+49) 228-73-4809  
E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken J. Hannam, T. L. Schmidt und N. Seeman für hilfreiche Diskussion sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

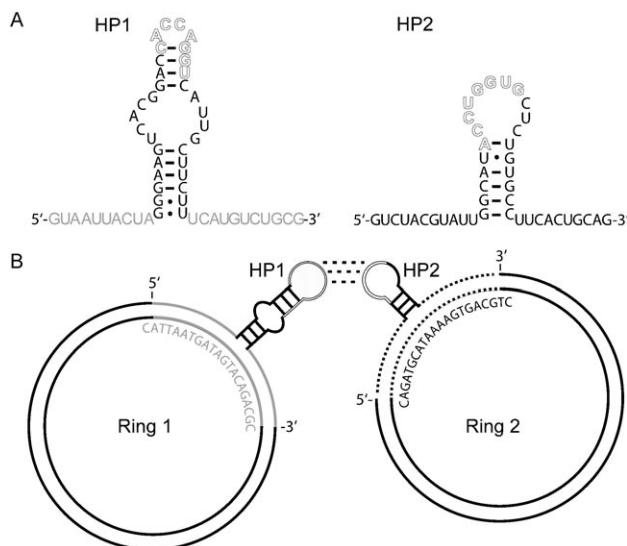
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Hier berichten wir über die Verwendung kurzer RNA-Haarnadelmotive zum Aufbau gemischter RNA/DNA-Architekturen. Als DNA-Grundkörper verwendeten wir 168 Basenpaare lange DNA-Ringe (Miniplasmide oder Miniringe), eine Klasse relativ einfach aufgebauter, starrer Objekte im Nanometerbereich. Zur Derivatisierung der Ringe mit RNA-Haarnadelmotiven setzten wir eine kürzlich von uns vorgestellte Methode ein, die auf der Hybridisierung funktionalisierter RNA-Oligonucleotide an eine einzelsträngige Lücke innerhalb des ansonsten doppelsträngigen DNA-Ringes beruht.<sup>[12]</sup>

RNA-Haarnadelstrukturen mit komplementären Schleifenregionen können mit hoher Affinität und Spezifität wechselwirken. Diese als „Kissing“-Komplexe bezeichneten Strukturen kommen in natürlichen RNA-Molekülen als Regulationselemente vor, können aber auch durch In-vitro-Selektionsexperimente oder durch rationales Design erhalten werden.<sup>[13]</sup> Wir haben kürzlich solche Haarnadelmotive identifiziert, die mit hoher Affinität und Spezifität an die regulatorische RNA-Domäne in der 5'-untranslatierten Region des *thiM*-Gens aus *Escherichia coli* unter Bildung eines „Kissing“-Komplexes binden.<sup>[14]</sup> Um diese Wechselwirkung für den Aufbau von DNA-Architekturen zu nutzen, haben wir zunächst die minimalen Motive der RNA-Haarnadeln identifiziert und mit Sequenzbereichen an ihren 5'- und 3'-Enden ausgestattet, die komplementär zu den Einzelstrangregionen in den Lücken der Miniplasmide (Ring 1 oder Ring 2) sind. Diese Sequenzverlängerungen können somit durch Watson-Crick-Basenpaarung mit den DNA-Ringen hybridisieren (Abbildung 1 A), wodurch funktionalisierte DNA/RNA-Ringe erhalten werden (Abbildung 1 B). Infolgedessen sollten die so funktionalisierten DNA-Ringe spezifisch miteinander wechselwirken, woraus sich so genannte „Kissing“-Ringe ergeben, deren Wechselwirkung durch die Schleifenregionen der RNA-Haarnadeln HP1 und HP2 gesteuert wird.

Zunächst untersuchten wir, ob HP1 und HP2 trotz der 5'- und 3'-Sequenzverlängerungen miteinander wechselwirken können. Hierfür führten wir Filterbindungsstudien durch, bei denen HP2 am 5'-Ende mit Biotin derivatisiert und anschließend an Streptavidin immobilisiert wurde. Die Bindungsstudien ergaben, dass die verlängerten RNA-Haarnadeln in der Tat miteinander wechselwirken können; es wurden Dissoziationskonstanten von  $(16.4 \pm 3.9)$  nm in Abwesenheit und  $(11.0 \pm 2.3)$  nm in Anwesenheit komplementärer Antisense-Oligodesoxynucleotide bestimmt (Tabelle 1 und Hintergrundinformationen). Diese Werte stimmten mit den Dissoziationskonstanten der Haarnadeln ohne Verlängerungen überein.

Als nächstes stellten wir DNA-Ringe mit Lücken her,<sup>[12]</sup> die komplementär zu den 5'- und 3'-Verlängerungen der RNA-Haarnadelmotive sind (siehe Abbildung 1 und



**Abbildung 1.** Bildung der „Kissing“-Ringe. A) RNA-Haarnadeln HP1 und HP2 mit den verlängerten Sequenzen, die mit den komplementären Stellen in den Lücken der DNA-Ringe 1 bzw. 2 hybridisieren. B) Funktionalisierte DNA-Ringe 1 und 2 mit den gebundenen RNA-Haarnadelschleifen HP1 und HP2 bilden „Kissing“-Ringe, gesteuert durch die RNA-Haarnadeln.

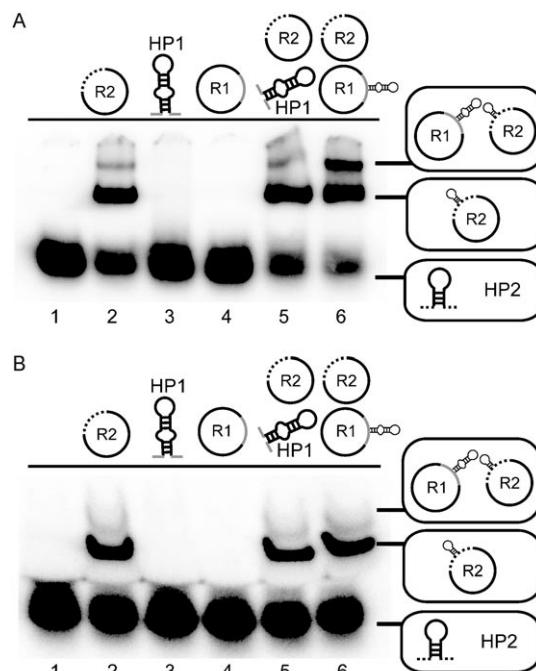
**Tabelle 1:** Dissoziationskonstanten  $K_D$  der „Kissing“-Komplexe.

Komplex <sup>[a]</sup>	$K_D$ [nM]
HP1-HP2	$16.4 \pm 3.9$
HP1-HP2 + AS <sup>[a]</sup>	$11.0 \pm 2.3$
HP1/Ring1-HP2/Ring2	$8.5 \pm 0.6$

[a] AS: Hybridisierte, komplementäre Oligodesoxynukleotide.

Hintergrundinformationen). HP1 und HP2 wurden mit den DNA-Ringen hybridisiert, jedoch nicht ligiert. Elektrophoretische Mobilitätsanalysen belegten die Hybridisierungen der RNA-Haarnadelstrukturen an die entsprechenden DNA-Ringe sowie die Bildung des zu erwartenden quaternären Komplexes. Wie Abbildung 2 zeigt, hybridisiert HP2 an den DNA-Ring 2 (Abbildung 2 A, Bahn 2), nicht aber an den DNA-Ring 1 (Abbildung 2 A, Bahn 4). Wie anhand der schwachen, weniger mobilen Bande (Abbildung 2 A, Bahnen 2 und 5) deutlich wird, vermittelt HP2 auch geringfügig die Verknüpfung zweier identischer DNA-Ringe 2. Der Grund dafür ist, dass die Verlängerungssequenzen der Haarnadel unter den gegebenen Reaktionsbedingungen anstatt mit nur einem Ringäquivalent derselben Spezies in einer intramolekularen Hybridisierung auch mit zwei Äquivalenten intermolekular wechselwirken können. Die eine Hälfte der flankierenden Sequenz hybridisiert dabei an die entsprechende Region im Ring, die andere Hälfte an die komplementäre Region eines zweiten Ringes. Diese Wechselwirkung nutzt jedoch lediglich 10 Basenpaarungen pro Ring und ist daher signifikant schwächer als die intramolekulare Hybridisierung (siehe Hintergrundinformationen).

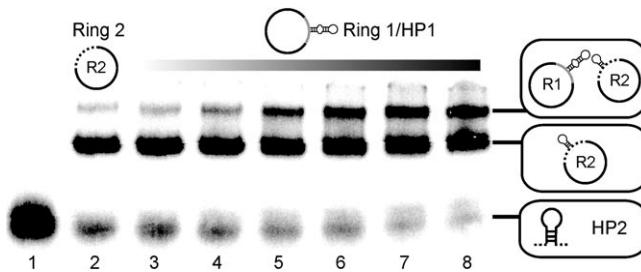
Tatsächlich wird durch Zugabe des zweiten RNA-Haarnadel/DNA-Ring-Paars [Ring 1/HP1] die Bildung des quaternären Komplexes induziert, der durch „Kissing“-Wechselwirkungen der Schleifenregionen der jeweiligen RNA-Haarnadelmotive stabilisiert wird. Deutlich wird dies an der



**Abbildung 2.** Elektrophoretische Mobilitätsanalyse der Spezifität der Bildung der „Kissing“-Ringe. A) Das radioaktiv markierte HP2 [30 nm] wurde entweder in Abwesenheit von HP1 und der Ringe 1 und 2 (Bahn 1) oder in Anwesenheit von HP2 [20 nm] (Bahnen 3, 5 und 6) sowie der Ringe 1 und 2 [20 nm] (Bahnen 2, 4, 5 und 6) inkubiert. B) Das analoge Experiment in Abwesenheit der für die Bildung der „Kissing“-Komplexe notwendigen  $Mg^{2+}$ -Ionen.

starken Bande mit der geringsten Mobilität im Polyacrylamidgel (Abbildung 2 A, Bahn 6). Diese Bande konnte nicht detektiert werden, wenn lediglich DNA-Ring 1 oder die RNA-Haarnadel HP1 vorhanden waren (Abbildung 2 A, Bahnen 3–5). Die „Kissing“-Wechselwirkungen der Schleifenregionen von RNA-Haarnadelstrukturen benötigen für eine stabile Komplexierung  $Mg^{2+}$ -Ionen.<sup>[13]</sup> Dies wird besonders deutlich anhand der Kristallstruktur der Dimerisierungs-Initiationsstelle der genomischen RNA des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), in der ein Netzwerk aus acht  $Mg^{2+}$ -Ionen den Zusammenhalt des „Kissing“-Komplexes gewährleistet.<sup>[15]</sup> Demzufolge sollten bei Fehlen von  $Mg^{2+}$ -Ionen auch keine „Kissing“-Ringe beobachtet werden. Genau dieser Befund wird aus Abbildung 2 B ersichtlich, denn die dem „Kissing“-Komplex zuzuordnende Bande (Bahn 6 in Abbildung 2 A) ist bei Fehlen von  $Mg^{2+}$ -Ionen tatsächlich nicht detektierbar, wohl aber finden sich alle Banden für die Wechselwirkungen, die lediglich auf die ( $Mg^{2+}$ -unabhängige) Hybridisierung der Wechselwirkungspartner zurückzuführen sind.

Die Komplexierung der durch „Kissing“-Wechselwirkungen zusammengehaltenen DNA-Miniplasmide verläuft eindeutig konzentrationsabhängig (Abbildung 3). Anhand der in Abbildung 3 gezeigten Intensitäten der Bande für die „Kissing“-Ringe konnten wir eine Dissoziationskonstante von  $(8.5 \pm 0.6)$  nm bestimmen (Tabelle 1). Dieser Wert passt in seiner Größenordnung sehr gut zu den Dissoziationskonstanten der Haarnadeln in Abwesenheit der DNA-Ringe (Tabelle 1).



**Abbildung 3.** Elektrophoretische Mobilitätsanalyse der konzentrations-abhängigen Bildung von durch „Kissing“-Wechselwirkungen zusammengehaltenen DNA-Miniplasmiden. Das radioaktiv markierte HP2 [30 nm] wurde entweder in Abwesenheit von HP1 und DNA-Ring 1 (Bahn 1) oder in Anwesenheit von DNA-Ring 2 inkubiert [30 nm] (Bahn 2). HP2/Ring 2-Komplexe [30 nm] wurden mit steigenden Konzentrationen der HP1/Ring 1-Komplexe inkubiert [2.5–60 nm] (Bahn 3–8).

Unsere Studie demonstriert, dass RNA-DNA-Chimären zur kontrollierten Herstellung von Nucleinsäure-Architekturen eingesetzt werden können. „Kissing“-Komplexe, die auf der Wechselwirkung der Schleifenregionen von RNA-Haarnadeln beruhen, sind wertvolle Hilfsmittel zum Aufbau von DNA-Molekülen. Kissing-RNA-Komplexe werden auch in der Natur gefunden, allerdings ermöglichen In-vitro-Selektionsexperimente einen nahezu unbegrenzten Zugang zu definierten RNA-Haarnadeln und möglicherweise auch zu DNA-Motiven, die „Kissing“-Komplexe bilden können. Darüber hinaus zeigen „Kissing“-Komplexe eine außergewöhnliche Spezifität und Affinität und eignen sich so als generell einsetzbare, austauschbare und äußerst flexible Bausteine zum Aufbau von zunehmend komplexeren Nucleinsäure-Architekturen.

### Experimentelles

**Oligoribonucleotide:** Die RNA-Haarnadelstrukturen wurden *in vitro* von dsDNA-Templaten transkribiert, die durch PCR unter Verwendung der folgenden Oligodesoxyribonucleotide erhalten wurden – HP1: 5'-HP1.F 5'-GATAATACG ACT CACTATAGTAAATTAC-TAG GGA AGT CACGGACC-3' und 3'-HP1.R 5'-CGCAGA-CAT GAA AGA AGCAATGAC CTG GT-3', Templat HP1 5'-GGG AAG TCA CGG ACC ACC AGG TCATTG CTT CTT-3'; HP2: 5'-HP2.F 5'-GATAATACG ACT CACTATAGT CTA CGT ATT-GGCATAACCTGGTGCTC-3' und 3'-HP2.R 5'-CTG CAGT-GA AGG CAC AGAGC ACC AGG-3', Templat HP2 5'-GGCATA-CCTGGTGCTCTG TGCC-3'.

**Filterbindungsstudien:** Zunehmende Konzentrationen der biotinylierten HP2-RNA [1–1000 nm] wurden mit der  $^{32}$ P-endmarkierten RNA-Haarnadel HP1 [1 nm] und Streptavidin [35 nm] in An- oder Abwesenheit von Antisense-Oligodesoxyribonucleotiden [1  $\mu$ M] (HP1-AS: 5'-CGCAGACATGATAGTAATTAC, HP2-AS: 5'-CTG CAG TGA AAATACGTAGAC) im Reaktionspuffer [10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (Hepes) pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>] 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Hintergrundinformationen). Danach wurden die Proben durch Nitrocellulosemembranen filtriert [0.45  $\mu$ m] und viermal mit 200  $\mu$ L Reaktionspuffer gewaschen. Gebundene RNA wurde mit Phosphor-Imaging quantifiziert. Alle Experimente wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt.

**Elektrophoretische Mobilitätsstudien:** Die  $^{32}$ P-endmarkierte RNA-Haarnadel HP2 [20 nm] wurde mit den angegebenen Oli-

gonucleotiden im Reaktionspuffer bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Danach wurden die Proben mit 10 % Glycerin versetzt, auf ein 6-proz. natives Polyacrylamidgel aufgetragen und mindestens 2–3 h bei 4°C laufen gelassen (Vorlauf 1.5 h bei 4°C). Anschließend wurden die Gele getrocknet und die Banden durch Phosphor-Imaging quantifiziert.

Eingegangen am 12. Oktober 2007  
Online veröffentlicht am 4. Januar 2008

**Stichwörter:** DNA-Strukturen · Haarnadelschleifen · Nanostrukturen · RNA-Strukturen · Selbstorganisation

- [1] a) N. C. Seeman, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 437; b) C. A. Mirkin, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2258; c) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427; d) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128; e) L. A. Gugliotti, D. L. Feldheim, B. E. Eaton, *Science* **2004**, *304*, 850; f) J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277.
- [2] a) O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990; b) S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3337; c) S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071; d) J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- [3] a) L. A. Gugliotti, D. L. Feldheim, B. E. Eaton, *Science* **2004**, *304*, 850; b) L. Jaeger, A. Chworus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 531; c) A. Chworus, I. Sevcen, A. Y. Koyfman, P. Weinkam, E. Oroudjev, H. G. Hansma, L. Jaeger, *Science* **2004**, *306*, 2068.
- [4] a) N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220; b) N. C. Seeman, *Q. Rev. Biophys.* **2005**, *38*, 363; c) U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856; d) W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618; e) C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6992.
- [5] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *Nature* **1997**, *386*, 137.
- [6] P. W. Rothemund, A. Ekani-Nkodo, N. Papadakis, A. Kumar, D. K. Fygenson, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16344.
- [7] P. W. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [8] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3513; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311.
- [9] T. L. Schmidt, C. K. Nandi, G. Rasched, P. P. Parui, B. Brutschy, M. Famulok, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4382.
- [10] a) T. Simonsson, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 621; b) J. T. Davis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668; c) J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3124.
- [11] N. B. Leontis, A. Lescoute, E. Westhof, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 279.
- [12] G. Rasched, D. Ackermann, T. L. Schmidt, P. Broekmann, A. Heckel, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 981; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 967.
- [13] a) C. Brunel, R. Marquet, P. Romby, C. Ehresmann, *Biochimie* **2002**, *84*, 925; b) J. C. Paillard, E. Westhof, C. Ehresmann, B. Ehresmann, R. Marquet, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 36; c) F. Ducongé, J. J. Toulmé, *RNA* **1999**, *5*, 1605.
- [14] G. Mayer, M. S. Raddatz, J. D. Grunwald, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 563; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 557.
- [15] E. Ennifar, M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, P. Dumas, *Structure* **1999**, *7*, 1439.