



# Kristallstruktur-geleitetes Design selbstorganisierender RNA-Nano-dreiecke

Mark A. Boerneke, Sergey M. Dibrov und Thomas Hermann\*

**Abstract:** RNA-Nanotechnologie nutzt RNA-Strukturmotive zur Konstruktion von Molekülararchitekturen im Nanomaßstab, die sich durch selektive Basenpaar-Wechselwirkungen selbst-organisieren. Hier berichten wir über Kristallstruktur-geleitetes Design von stabilen RNA-Nanodreiecken, die sich durch Selbstorganisation aus kurzen Oligonukleotiden bilden. Eine Kristallstrukturbestimmung eines Nanodreiecks von 81 Nukleotiden mit 2.6 Å Auflösung zeigt das bisher kleinste in sich geschlossene Nanoobjekt, das vollständig aus doppelsträngiger RNA besteht. Da die Eckbausteine des Nanodreiecks Ligand-bindende RNA-Schalter enthalten, ergibt sich die Möglichkeit, die Selbstorganisation und Dissoziation durch externe Liganden zu kontrollieren.

Nukleinsäuren werden häufig für die Konstruktion von Objekten im Nanomaßstab verwendet, wobei die gesteuerte Einbeziehung von Basenpaar-Wechselwirkungen genutzt wird. Komplexe Nanoobjekte ergeben sich durch rekursive Faltung langer Nukleinsäuresequenzen, die abwechselnd Doppel- und Einzelstrang-Regionen, Kreuzungen und Helfer-Oligonukleotide enthalten. Strukturmotive aus Kristallstrukturen erwiesen sich als besonders nützlich für das Design von Nanoobjekten.<sup>[1–14]</sup> In der Vergangenheit hatten wir kurze Oligonukleotide verwendet, um ein selbstorganisierendes RNA-Quadrat aus 100 Nukleotiden aufzubauen.<sup>[12]</sup> Hier beschreiben wir Kristallstruktur-geleitetes Design von RNA-Nanodreiecken, die sich in einem kooperativen Prozess aus mehreren Kopien kurzer Oligonukleotide spontan bilden. Die Kristallstrukturanalyse eines RNA-Dreiecks aus 81 Nukleotiden zeigt das bisher kleinste in sich geschlossene Nanoobjekt, vollständig bestehend aus doppelsträngiger RNA. Selbstorganisation und Dissoziation des Nanodreiecks sind abhängig von der Sequenz der zugrundeliegenden Oligonukleotide und können durch Liganden gesteuert werden, die an Erkennungsmotive in der RNA binden.

Vor kurzem hatten wir die bislang einfachsten Ligand-bindenden RNA-Schalter in den „internal ribosome entry sites“ (IRES) von plus-strängigen RNA-Viren der Picornaviridae

und Flavi-Virusfamilien entdeckt. Diese RNA-Schalter finden sich in der Subdomäne IIa der IRES-Elemente, wo sie die virale Proteinsynthese durch eine Liganden-abhängige Konformationsänderung regulieren.<sup>[15,16]</sup> Anders als bei herkömmlichen „riboswitches“ geht der Schaltvorgang der Virus-RNA-Schalter mit keiner Sekundärstrukturveränderung einher, sondern vollzieht sich durch einen rein mechanischen Übergang zwischen zwei unterschiedlichen stabilen Konformationen. In Abwesenheit von Liganden nehmen die viralen RNA-Schalter eine gewinkelte Konformation an, während Ligandenbindung eine gestreckte Form stabilisiert. Strukturen der ligandenfreien RNA-Schalter aus den IRES-Elementen des Hepatitis-C-Virus (HCV) und Seneca-Valley-Virus (SVV) sowie die Struktur des ligandengebundenen Schalters aus HCV wurden zuvor durch Röntgenkristallographie bestimmt.<sup>[16–18]</sup> Das ligandenfreie RNA-Schaltermotiv aus HCV wurde als Eckbaustein zur Konstruktion eines selbstorganisierenden Nanoquadrats und eines Nanoprismas verwendet.<sup>[12,19]</sup> Diese früheren Studien inspirierten uns, weitere RNA-Nanoobjekte aus viralen RNA-Schaltern durch rationales Design zu entwerfen, wobei wir Längenvariationen der schalterflankierenden Helices und eine Ausrichtung der Eckbausteine relativ zu einer gemeinsamen Ebene in Betracht zogen.

Das Design der RNA-Nanodreiecke beruht auf der Analyse der Kristallstruktur des RNA-Eckbausteins aus dem SVV-IRES-Element (Abbildung 1). Die dreidimensionale Struktur des RNA-Motivs aus SVV wurde anhand von Röntgenbeugung an Kristallen eines kurzen und langen RNA-Konstrukts ermittelt, wobei beide Konstrukte eine identische Winkelanordnung zeigten.<sup>[16]</sup> Die Packung beider Konstrukte ergab geschlossene Dreiecke im Kristall, beruhend auf pseudo-kontinuierlichen Basenpaarstapeln und intermolekularer Basenpaar-Bildung zwischen überhängenden Nukleotiden an den 3'-Enden der drei identischen Eckbausteine (Abbildung 1b, Abbildungen S1–S3 in den Hintergrundinformationen). Die Dreiecksanordnung in Kristallen des SVV-RNA-Motivs wurde verwendet, um selbstorganisierende Nanodreieckskonstrukte zu entwerfen, wobei zur Unterstützung der Selbstorganisation Konstrukte mit einer identischen Anzahl von Nukleotiden und identischer Basensequenz, aber unterschiedlichen 3'-terminalen Überhangslängen getestet wurden. Beispiele für Sekundärstrukturmotive von selbstorganisierenden Dreieckskonstrukten mit vier Nukleotiden langen Überhängen sind in Abbildung 1c gezeigt. Die Konstruktion eines kleinen Dreiecks erfolgte aus zwei Oligonukleotiden, einschließlich eines inneren und eines äußeren Strangs mit 11 bzw. 16 Nukleotiden (Abbildung 1c, oben). Drei Kopien jeweils des inneren und äußeren Strangs fügen sich durch Selbstorganisation zu einem kleinen Dreieck zusammen.

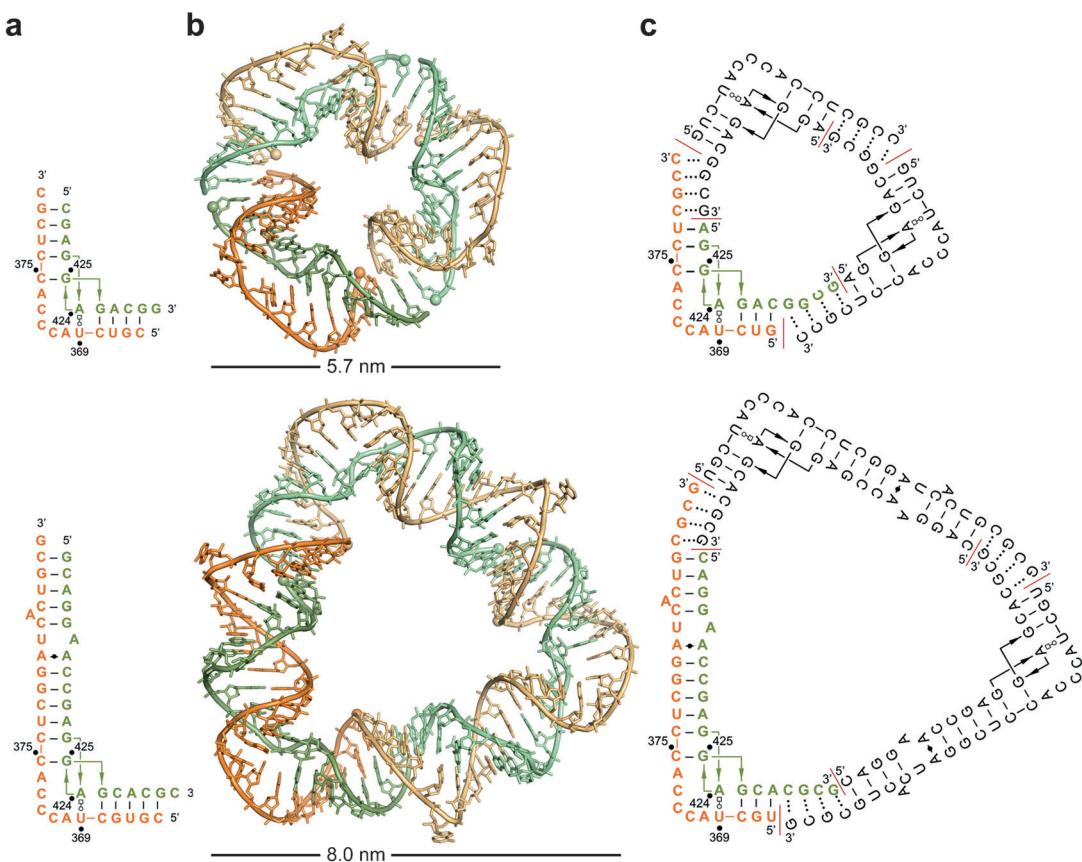
[\*] M. A. Boerneke, Dr. S. M. Dibrov, Prof. Dr. T. Hermann

Department of Chemistry and Biochemistry  
University of California, San Diego  
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 (USA)

E-Mail: tch@ucsd.edu

Prof. Dr. T. Hermann  
Center for Drug Discovery Innovation  
University of California, San Diego  
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 (USA)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201600233> zu finden.



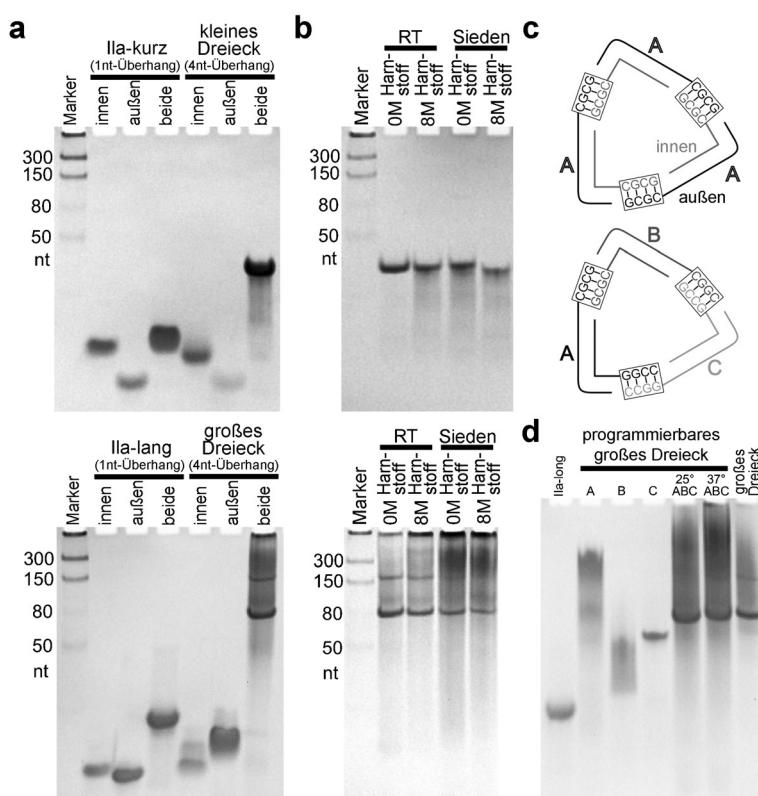
**Abbildung 1.** Design von selbstorganisierenden RNA-Nanodreiecken. a) Sekundärstrukturen der kurzen und langen Oligonukleotidkonstrukte der Subdomäne IIa aus dem SVV-IRES-Element. Einzelne überhängende Nukleotide wurden eingeführt, um durch gezielte RNA-Packung Kristallisation zu erleichtern. Die Sequenznummerierung bezieht sich auf das SVV-Genom. b) In sich geschlossene Dreiecksanordnung von RNA aus der Kristallpackung der kurzen und langen Subdomäne IIa (PDB-IDs: 4P97 und 4PHY). c) Sekundärstrukturmodelle von selbstorganisierenden RNA-Dreiecken mit 4-Nukleotidüberhängen, die anhand der Dreiecksanordnung in Kristallen der kurzen und langen Subdomäne IIa entworfen wurden. Oligonukleotid-Enden sind durch rote Linien gekennzeichnet

ecksobjekt von 81 Nukleotiden zusammen. In einem vergleichbaren Selbstorganisationsprozess bildet sich ein großes Dreiecksobjekt aus 138 Nukleotiden durch Vereinigung von Strängen aus 20 bzw. 26 Basen (Abbildung 1c, unten).

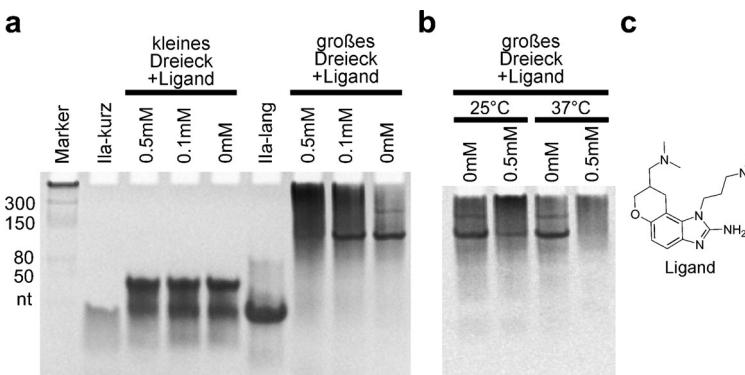
Die Analyse der kurzen und langen Eckbausteinkonstrukte aus SVV (Abbildung 1a) durch nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zeigte Banden im Einklang mit der jeweiligen Größe der RNA (Abbildung 2a; 1-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende; siehe Hintergrundinformationen für alle experimentellen Details). Im Unterschied dazu migrierten Nanodreieckkonstrukte mit vier überhängenden Nukleotiden (Abbildung 1c) langsamer und in Übereinstimmung mit der Bildung symmetrischer Dreiecke aus drei identischen Eckbausteinen (Abbildung 2a; 4-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende). Während das kleine Nanodreieck als einzelne Bande im Gel erschien, zeigte das große Dreieckskonstrukt eine schneller wandernde Hauptbande und eine retardierte, weniger intensive Bande, die vermutlich einem Dimer von Dreiecken entspricht (Abbildung S4). Der Nachweis der schneller wandernden Hauptbande als einzelnes Dreieck bestehend aus drei Eckbausteinen gelang durch vergleichende Analyse eines gleich großen programmierbaren Nanodreiecks, das sich aus drei unterschiedlichen Ecken

(A, B, C) mit jeweils einer charakteristischen einzigartigen Überhangssequenz bildete. Diese Anordnung ermöglicht die Assoziation ausschließlich von Dreiecken mit einer A-B-C-Konfiguration (Abbildung 2c,d). Beide Nanodreiecke zeigten hohe Resistenz gegenüber Denaturierung mit 8M Harnstoff und unter Sieden in Wasser (Abbildung 2b und Hintergrundinformationen).

Der Einfluss von Schalter-bindenden Liganden auf die Bildung und Dissoziation von RNA-Nanodreiecken wurde in orientierenden Studien untersucht. Eine Analyse durch nichtdenaturierende PAGE zeigte eine reduzierte Effizienz bei der Bildung des großen Nanodreiecks in Gegenwart von 500 µM Ligand<sup>[20]</sup> (Abbildung 3a,c). Anscheinend führte eine Ligandbindung an den RNA-Schaltern zu einer Verriegelung in der gestreckten Form für die Eckbausteine, die sich nachfolgend zu linearen Multimeren assoziierten. Ligandenzugeabe zu dem kleinen Nanodreieck erzeugte keine solche Multimerisierung, was vermutlich auf die Labilität der einzelnen Eckbausteine zurückzuführen ist, die mit nur sieben flankierenden Basenpaaren in der Umgebung einer ungepaarten Region von fünf Basen eine „Alles-oder-Nichts“-Selbstorganisation von Einzelsträngen erzwingen. Die Dissoziation von intakten großen Nanodreiecken, die weniger kompakt sind



**Abbildung 2.** Selbstorganisation und Stabilität der Nanodreiecke. Die Analyse der RNA-Konstrukte erfolgte durch nichtdenaturierende PAGE in Gegenwart von 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. a) Oberes Gel: Bildung des kurzen Subdomäne-IIa-Konstrukt mit einem einzelnen Nukleotid(nt)-Überhang (siehe Sekundärstruktur in Abbildung 1a, oben) im Vergleich zum selbstorganisierenden kleinen Dreieckskonstrukt mit 4-Nukleotidüberhang (siehe Sekundärstruktur in Abbildung 1c, oben). Unteres Gel: Bildung des langen Subdomäne-IIa-Konstrukt mit einem einzelnen Nukleotidüberhang (siehe Sekundärstruktur in Abbildung 1a, unten) im Vergleich zum selbstorganisierenden großen Dreieckskonstrukt mit 4-Nukleotidüberhang (siehe (c), oben und Sekundärstruktur in Abbildung 1c, unten). b) Stabilität des kleinen (oberes Gel) und großen (unteres Gel) RNA-Dreiecks in Gegenwart und Abwesenheit von 8 M Harnstoff bei Raumtemperatur (RT) oder Siedetemperatur. c) Schemadarstellung des großen RNA-Nanodreiecks (AAA, oben) und des programmierbaren großen Dreiecks (ABC, unten). d) Selbstorganisation des programmierbaren großen Dreiecks (ABC) aus den Eckbausteinen A, B, und C.

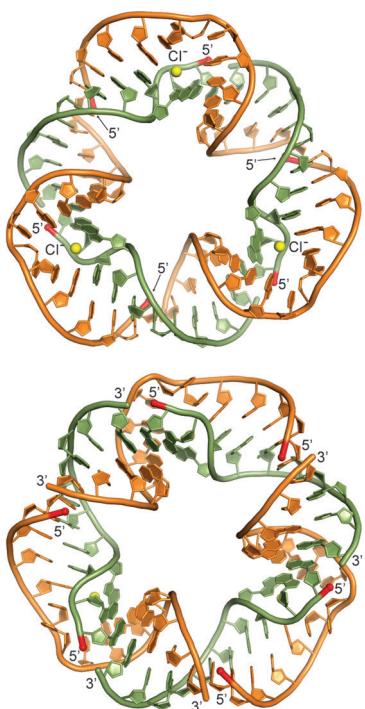


**Abbildung 3.** Effizienz der Selbstorganisation und Dissoziation von Nanodreiecken in Gegenwart von Ligand. Die Ligandbindung am Ila-RNA-Schalter stabilisiert eine gestreckte Konformation der RNA.<sup>[16]</sup> a) Die Selbstorganisation des kleinen RNA-Dreiecks wird in Gegenwart des Schalter-bindenden Liganden nicht inhibiert, während unter den gleichen Umständen die Bildung des großen Dreiecks zum Teil verhindert wird [nicht aber im Fall von Kontrollverbindungen ohne zielspezifische Bindung (Abbildung S5)]. Die Bindung von Ligand an die RNA-Schalter der Eckbausteine im großen Dreieckskonstrukt stabilisiert eine gestreckte Konformation, die zur Bildung linearer Multimere führt, auf Kosten einer verminderter Selbstorganisation zu Dreiecken. b) Inkubation des großen Dreieckskonstrukt mit Ligand führt zur Dissoziation. c) Struktur des Benzimidazol-Liganden, der an die Ila-RNA-Schalter

und durch 15 flankierende Basenpaare um die ungepaarte Region stabilisiert werden, konnte nach Ligandinkubation sowohl für das symmetrische (Abbildung 3b) als auch für das programmierbare Konstrukt (Abbildung S6) beobachtet werden. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die Ligand-bindende Funktion der RNA-Schalter in den Eck-

bausteinen erhalten bleibt, wenn diese in Nanodreiecke eingebaut werden. Ligandgesteuerte Dissoziation von Nanodreiecken und deren Selbstorganisation zu alternativen Strukturen eröffnen Möglichkeiten für die Konstruktion von RNA-Nanoobjekten, die auf Umweltsignale in Form von Ligandmolekülen reagieren.

Zur Strukturbestimmung der kleinen und großen RNA-Nanodreiecke durch Röntgenbeugung kristallisierten wir beide Konstrukte, wobei beugende Kristalle von guter Qualität für das kleine Dreieckskonstrukt erhalten wurden. Die Kristallstrukturbestimmung mit einer Auflösung von 2.6 Å (Abbildungen 4, S7–S10 und Tabelle S1) zeigte eine in sich geschlossene, doppelsträngige RNA, vergleichbar mit der pseudokontinuierlichen Dreiecksanordnung in der Kristallpackung der kurzen RNA-Eckbausteine (Abbildungen 1b und 4). Wie erwartet setzt sich das Nanodreieck aus drei identischen symmetrischen Eckbausteinen zusammen, die sich jeweils aus einem inneren und einem äußeren RNA-Strang mit vier überhängenden Nukleotiden bilden und mit benachbarten Eckbausteinen assoziieren. In den Dreiecksseiten sind elf Basenpaare zu einer Kantenlänge von ca. 5 nm angeordnet, während die Eckmotive die ungepaarte Region von fünf Basen der Ila-Subdomäne enthalten. Die Struktur des Dreiecks ist auf den ersten Blick eher sechseckig, was aus einer Verdrehung der gewinkelten Eckbausteine aus der gemeinsamen Ebene resultiert, die erforderlich scheint, um ein in sich geschlossenes RNA-Konstrukt zu ergeben. Die resul-



**Abbildung 4.** Kristallstruktur des selbstorganisierenden RNA-Nanodreiecks. Ansichten von beiden Seiten der Dreiecksebene sind gezeigt. Die willkürlich definierte Hinterseite des Dreiecks (oben) zeigt die Gegenwart von drei  $\text{Cl}^-$ -Ionen (gelbe Kugeln), die in Wechselwirkung mit der Watson-Crick-Seite der Basen der Nukleotide A374 und C375 stehen. Die endständigen Basen aller Oligonukleotidstränge befinden sich auf der Vorderseite des RNA-Dreiecks (unten). Die 5'-Enden sind rot markiert. Atomkoordinaten und Strukturfaktoren wurden in der Protein Data Bank hinterlegt (PDB-ID: 5CNR).

tierende Struktur erweist sich als kompakter als ein vollkommen ebenes Dreieck mit vergleichbarer Seitenlänge. Die zwölf Enden der sechs Einzelstränge innerhalb des RNA-Dreiecks liegen auf derselben Seite der Nanostruktur (Abbildungen 4 und S7a), was es ermöglichen sollte, komplexere Strukturen aufzubauen und die Nanodreiecke gezielt für Anwendungen als Sensoren und biologische Baumaterialien zu funktionalisieren.

Das Design molekularer Objekte im Nanomaßstab durch Selbstorganisation kurzer Oligonukleotide ist eine Schlüsseltechnik auf dem Gebiet der RNA-Nanotechnologie. Während größere Nanoarchitekturen bereits zuvor aus strukturell komplexen RNA-Motiven oder langen Nukleinäuresequenzen unter Verwendung von Helfer-Oligonukleotiden konstruiert wurden, war es unser Ziel, minimalistische RNA-Nanoobjekte durch die effiziente Selbstorganisation kurzer Sequenzen herzustellen, die selbst keine stabilen Strukturen annehmen können. Zu diesem Zweck nutzten wir detaillierte Ergebnisse röntgenkristallographischer Untersuchungen, um zwei verschiedene RNA-Nanodreiecke zu konstruieren, die sich durch Selbstorganisation von sechs Oligonukleotiden formten und für Strukturuntersuchungen kristallisiert werden konnten. Die resultierenden Nanodreiecke erwiesen sich als bemerkenswert stabil gegenüber Denaturierung. Ihre modulare Zusammensetzung bietet einzigartige Merkmale für Anwendungen in den Bereichen der

Medizin und Nanotechnik sowie als Modellsysteme zur Untersuchung von Phänomenen im Nanomaßstab. Eine Modifikation der Nanodreiecke durch Konjugation an einem oder mehreren der zwölf RNA-Strangenden ermöglicht die zukünftige Herstellung von selbstorganisierenden Konstrukten mit zusätzlichen Funktionalitäten. Da die Eckbausteine der Nanodreiecke aus Ligand-bindenden RNA-Schaltern bestehen, ist es möglich, Assoziation und Dissoziation der resultierenden RNA-Architekturen durch Liganden-abhängige Konformationsänderung zu kontrollieren, was die Konstruktion von Nanosensoren erlaubt, die Veränderungen der Ligandkonzentration, z. B. im zellulären Milieu, anzeigen.

### Danksagung

Wir danken Andrew Bergdorf für Hilfe bei Kristallisierungsversuchen. M.A.B. wurde durch ein GAANN-Stipendium des US Department of Education gefördert. Forschungsmittel wurden außerdem vom UCSD Academic Senate, grant No. RM069B, zur Verfügung gestellt. Gerätschaften der Biomolecule Crystallography Facility wurden mit Forschungsmitteln der National Institutes of Health, grant OD011957, erworben.

**Stichwörter:** Nanostrukturen · RNA-Strukturen · RNA-Schalter · Röntgenbeugung · Selbstorganisation

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 4097–4100  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 4166–4170

- [1] L. Jaeger, N. B. Leontis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2521; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2576.
- [2] D. Shu, L. P. Huang, S. Hoeprich, P. Guo, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2003**, *3*, 295.
- [3] A. Chworos, I. Sevcen, A. Y. Koyfman, P. Weinkam, E. Oroudjev, H. G. Hansma, L. Jaeger, *Science* **2004**, *306*, 2068.
- [4] L. Nasalean, S. Baudrey, N. B. Leontis, L. Jaeger, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1381.
- [5] E. Bindewald, C. Grunewald, B. Boyle, M. O'Connor, B. A. Shapiro, *J. Mol. Graphics Modell.* **2008**, *27*, 299.
- [6] I. Sevcen, C. Geary, E. Verzemnieks, A. Chworos, L. Jaeger, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1270.
- [7] I. Sevcen, C. Geary, A. Chworos, N. Voss, E. Jacovetty, L. Jaeger, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 772.
- [8] K. A. Afonin, E. Bindewald, A. J. Yaghoubian, N. Voss, E. Jacovetty, B. A. Shapiro, L. Jaeger, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 676.
- [9] C. Geary, A. Chworos, L. Jaeger, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1066.
- [10] W. W. Grabow, P. Zakrevsky, K. A. Afonin, A. Chworos, B. A. Shapiro, L. Jaeger, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 878.
- [11] H. Ohno, T. Kobayashi, R. Kabata, K. Endo, T. Iwasa, S. H. Yoshimura, K. Takeyasu, T. Inoue, H. Saito, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 116.
- [12] S. M. Dibrov, J. McLean, J. Parsons, T. Hermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6405.
- [13] E. Bindewald, K. Afonin, L. Jaeger, B. A. Shapiro, *ACS Nano* **2011**, *5*, 9542.
- [14] C. Geary, P. W. K. Rothmund, E. S. Andersen, *Science* **2014**, *345*, 799.
- [15] M. A. Boerneke, T. Hermann, *RNA Biol.* **2015**, *12*, 780.
- [16] M. A. Boerneke, S. M. Dibrov, J. Gu, D. L. Wyles, T. Hermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 15952.

- [17] S. M. Dibrov, H. Johnston-Cox, Y. H. Weng, T. Hermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 226; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 230.
- [18] S. M. Dibrov, K. Ding, N. D. Brunn, M. A. Parker, B. M. Bergdahl, D. L. Wyles, T. Hermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5223.
- [19] J. Yu, Z. Liu, W. Jiang, G. Wang, C. Mao, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5724.
- [20] J. Parsons, M. P. Castaldi, S. Dutta, S. M. Dibrov, D. L. Wyles, T. Hermann, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 823.

Eingegangen am 8. Januar 2016,  
veränderte Fassung am 25. Januar 2016  
Online veröffentlicht am 24. Februar 2016

---