



**Etablierung DNA-basierender Nanostrukturen  
aus DNA-Tetraedern über  
*Kissing-Loop-Annealing***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte  
DISSERTATION

von

Diplom Biologin Anna Barth  
aus  
Pforzheim

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016



# Publikationen

---

Thomas Horn, **Anna Barth**, Michael Rühle, Annette Häser, Gabriele Jürges und Peter Nick. (2012), Molecular diagnostics of Lemon Myrtle (*Backhousia citriodora* versus *Leptospermum citratum*), *European Food Research and Technology*, 234 (5), 853–861.

Thomas Ehrenschwender, **Anna Barth**, Holger Puchta und Hans-Achim Wagenknecht. (2012) Metal-mediated DNA assembly using the ethynyl linked terpyridine ligand. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 46–48.

## Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

**Anna Barth**, Daniela Kobbe, Manfred Focke. (2016) DNA-DNA kissing complexes as a new tool for the assembly of DNA nanostructures. *Nucleic Acid Research*, 44, 1502–1513

*“We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (DNA). This structure has novel features which are of considerable biological interest.”*

James Watson & Francis Crick, A Structure for DNA, 1953

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	DIE CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER NUKLEINSÄUREN	2
1.2	DIE HELIXFORMEN VON DNA UND RNA	4
1.3	STABILITÄT VON DOPPELSTRÄNGEN	5
1.4	WEITERE DREIDIMENSIONALE STRUKTUREN DER NUKLEINSÄUREN	7
1.5	DIE <i>KISSING-LOOP</i> -STRUKTUR	9
1.6	DIE CYTOTOXIZITÄT VON NANOMATERIAL	12
1.7	BIOMOLEKÜLE IN DER NANOTECHNOLOGIE	16
1.7.1	DNA-BASIERENDE NANOMATERIALIEN	17
1.7.1.1	DNA-Strukturen in der Nanomedizin	18
1.7.1.2	Funktionalisierte DNA-Tetraeder	19
1.8	ZIELSETZUNG	21
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL &amp; METHODEN</u></b>	<b>22</b>
2.1	MATERIAL	22
2.1.1	GERÄTE	22
2.1.2	SOFTWARE UND WEBSERVER	22
2.1.3	CHEMIKALIEN	23
2.1.4	MARKER FÜR DIE GELELEKTROPHORESE	24
2.1.5	ENZYME	24
2.1.6	OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN	25
2.1.7	WEITERE VERBAUCHSMATERIALIEN	26
2.2	METHODEN	29
2.2.1	HERSTELLUNG DES DNA-TETRAEDERS	29
2.2.2	KONTROLLVERDAU MIT EXONUKLEASE III UND RESTRIKTIONSENZYMEN	30
2.2.3	GELEXTRAKTION KOVALENT VERKNÜPFTER DNA-TETRAEDER	30
2.2.4	KONTROLLVERDAU MIT RESTRIKTIONSENZYMEN	30
2.2.5	<i>KISSING-LOOP-ANNEALING</i>	31
2.2.5.1	Auflösung einer <i>Kissing-Loop</i> -Struktur mittels <i>Capping</i> -Oligonukleotid	31
2.2.5.2	Einfluss der Temperatur auf das <i>Kissing-Loop-Annealing</i>	31
2.2.5.3	Einfluss der Ionenstärke auf das <i>Kissing-Loop-Annealing</i>	32
2.2.5.4	Charakterisierung der <i>Kissing-Loop</i> -Sequenz durch Verwendung von <i>Mismatch</i> -Sequenzen	32
2.2.6	POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	34
2.2.7	GELSTAR® -FÄRBUNG	35
2.2.8	SILBERNITRAT-FÄRBUNG	36
2.2.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG	36
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>37</b>
3.1	MONO- UND MULTI-FUNKTIONALISIERUNG DER TETRAEDER	37
3.2	KOVALENTE VERKNÜPFUNG DURCH LIGATIONSREAKTION	39
3.3	RESTRIKTIONSANALYSE DES NICHTFUNKTIONALISIERTEN TETRAEDERS	40
3.4	RESTRIKTIONSANALYSE DER MULTIFUNKTIONALISIERTEN TETRAEDER	41
3.5	<i>KISSING-LOOP-ANNEALING</i> VON KOVALENT GESCHLOSSENEN TETRAEDERN	41
3.6	SEQUENZSPEZIFISCH INDUZIERBARER ZERFALL DER <i>KISSING-LOOP</i> -STRUKTUR	43
3.7	<i>KISSING-LOOP-ANNEALING</i> VON MONO-, DI- UND TRIFUNKTIONALISIERTEN TETRAEDERN	46
3.8	KOMBINIERTER EINSATZ UNTERSCHIEDLICHER <i>KISSING-LOOP</i> -SEQUENZEN	48
3.9	EINFLUSS DER <i>LOOP</i> -ANZAHL AUF DIE <i>KISSING-LOOP</i> -MULTIMERBILDUNG	50

<b>3.10</b>	<b>EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE BILDUNG DES <i>KISSING-LOOP</i>-PRODUKTS</b>	<b>54</b>
<b>3.11</b>	<b>EINFLUSS DER IONENSTÄRKE AUF DIE BILDUNG DES <i>KISSING-LOOP</i>-PRODUKTS</b>	<b>56</b>
<b>3.12</b>	<b>IDENTIFIKATION DER HYBRIDISIERENDEN BEREICHE INNERHALB DES <i>LOOPS</i></b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>62</u></b>
<b>4.1</b>	<b>DNA-TETRAEDER IN DER NANOTECHNOLOGIE</b>	<b>62</b>
<b>4.2</b>	<b>FUNKTIONALISIERUNG VON DNA-TETRAEDERN DURCH <i>HAIRPIN</i>-STRUKTUREN</b>	<b>63</b>
4.2.1	ASSEMBLIERUNG FUNKTIONALISierter TETRAEDER	65
4.2.2	<i>KISSING-LOOP-ANNEALING</i> FUNKTIONALISierter TETRAEDER	66
<b>4.3</b>	<b>SEQUENZSPECIFISCH INDUZIERBARER ZERFALL DER <i>KISSING-LOOP</i>-STRUKTUR</b>	<b>68</b>
<b>4.4</b>	<b>EINFLUSS DER <i>LOOP</i>-ANZAHL AUF DIE STABILITÄT VON <i>KISSING-LOOP</i>-KOMPLEXEN</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>DER DNA-TETRAEDER ALS PHARMAZEUTISCHER NANOTRANSPORTER</b>	<b>72</b>
<b>4.6</b>	<b>EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE BILDUNG DES <i>KISSING-LOOP</i>-PRODUKTS</b>	<b>73</b>
<b>4.7</b>	<b>EINFLUSS DER IONENSTÄRKE AUF DIE BILDUNG DES <i>KISSING-LOOP</i>-PRODUKTS</b>	<b>74</b>
<b>4.8</b>	<b>IDENTIFIKATION DER HYBRIDISIERENDEN BEREICHE INNERHALB DES <i>LOOPS</i></b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b><u>AUSBLICK</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>82</u></b>
<b>7</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b>8</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>84</u></b>
<b>9</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b>9.1</b>	<b>EINFLUSS DER <i>HAIRPIN</i>-STRUKTUR AUF DAS <i>KISSING-LOOP-ANNEALING</i></b>	<b>93</b>
<b>9.2</b>	<b>EINFLUSS DER <i>LOOP</i>-DIREKTIONALITÄT AUF DAS <i>KISSING-LOOP-ANNEALING</i> VON 2-<i>LOOP</i>-TETRAEDERN</b>	<b>95</b>
<b>9.3</b>	<b>STABILITÄT DES <i>KISSING-LOOP</i>-KOMPLEX DURCH ERHÖHTE <i>LOOP</i>-ANZAHL IN ANWESENHEIT EINES <i>CAPPING</i>-OLIGONUKLEOTIDS</b>	<b>96</b>
<b>9.4</b>	<b>HINTERGRUNDDATEN ZUR TESTUNG DES TEMPERATUREINFLUSSES AUF DIE STABILITÄT DER <i>KISSING-LOOP</i>-KOMPLEXES</b>	<b>97</b>
<b>9.5</b>	<b>HINTERGRUNDDATEN ZUR TESTUNG DES EINFLUSSES DER IONENSTÄRKE AUF DIE STABILITÄT DES <i>KISSING-LOOP</i>-KOMPLEXES</b>	<b>99</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Form und chemische Zusammensetzung der Desoxyribonukleinsäure. ....	3
Abbildung 2: <i>In vivo</i> Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren. ....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Dimerisierungsstarts mittels <i>Kissing-Loop</i> -Bildung zweier retroviraler HIV-1 Genome. ....	10
Abbildung 4: Aufnahme und Wirkungswege von Nanopartikeln in therapeutischer Anwendung oder bei ungewollter Aufnahme von cytotoxischen Nanomaterialien .....	15
Abbildung 5: DNA-Tetraeder nach Goodman <i>et al.</i> (2005). ....	25
Abbildung 6: Modifizierte <i>Hairpin</i> -Sequenzen zur Charakterisierung der Hybridisierungsbereiche innerhalb der <i>Loop</i> -Sequenz für das <i>Kissing-Loop-Annealing</i> . ....	34
Abbildung 7: Optimierung der Pufferbedingungen für ein optimales <i>Annealing</i> modifizierter Tetraeder. ....	38
Abbildung 8: Tetraeder-Assemblierung nach Ligationsreaktion, sowie nach Exonuklease-Verdau und nativer Aufreinigung. ....	39
Abbildung 9: Restriktionsanalyse des nichtfunktionalisierten Tetraeders – experimentelles Design nach Goodman <i>et al.</i> , 2005. ....	40
Abbildung 10: Native Gelanalyse nach Restriktionsverdau multifunktionaler Tetraeder. ....	41
Abbildung 11: <i>Kissing-Loop-Annealing</i> zwischen zwei DNA-Tetraedern mit komplementärer <i>Loop</i> -Sequenz. ....	42
Abbildung 12: Sequenzspezifische Auflösung des <i>Kissing-Loop</i> -Komplexes aus monofunktionalisierten Tetraedern. ....	45
Abbildung 13 : <i>Kissing-Loop-Annealing</i> von multifunktionalisierten Tetraedern an bis zu drei Ecken des Tetraeders. ....	47
Abbildung 14: <i>Kissing-Loop-Annealing</i> von multifunktionalisierten Tetraedern an einer Ecke. ....	48
Abbildung 15: Kombination unterschiedlicher <i>Kissing-Loop</i> -Strukturen. ....	49
Abbildung 16: Beeinflussung der Multimerisierung von DNA-Tetraedern durch Anpassung der <i>Loop</i> -Anzahl im <i>Kissing-Loop-Annealing</i> . ....	51
Abbildung 17: Titration mit Tetraedern variabler <i>Loop</i> -Anzahl. ....	52
Abbildung 18: Titration mit Tetraedern variabler <i>Loop</i> -Anzahl durch Austausch gegen Poly(dT)-Stamm- <i>Loop</i> -Sequenzen. ....	54
Abbildung 19: Temperatur-Sensitivität der <i>Kissing-Loop</i> -Komplexe. ....	55
Abbildung 20: <i>Kissing-Loop-Annealing</i> mono- und multifunktionaler DNA-Tetraeder in Anwesenheit von Magnesium- und Kaliumionen. ....	56
Abbildung 21: Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität von <i>Kissing-Loop</i> -Strukturen. ....	57
Abbildung 22: Einfluss von Magnesium, Calcium und Zink auf die Bildung einer <i>Kissing-Loop</i> -Bande am Beispiel von hybridisierten 1- <i>Loop</i> -Tetraedern. ....	58
Abbildung 23: <i>Mismatch</i> -Analyse von <i>Kissing-Loop</i> -Komplexen. ....	60
Abbildung 24: Theoretische Modelle von DNA- <i>Kissing-Loop</i> -Komplexen nach Romano <i>et al.</i> , 2012 und Šulc <i>et al.</i> , 2012. ....	77

<b>Abbildung 25: Die Länge des Stamm- und <i>Loop</i>-Bereichs einer <i>Hairpin</i>-Struktur hat Einfluss auf die Bildung des <i>Kissing-Loop</i>.</b> .....	<b>93</b>
<b>Abbildung 26: Einfluss der <i>Loop</i>-Direktionalität auf die Bildung des <i>Kissing-Loop</i>-Produkts bei erhöhter <i>Loop</i>-Anzahl.</b> .....	<b>95</b>
<b>Abbildung 27: Verbesserte <i>Kissing-Loop</i>-Stabilität durch erhöhte <i>Loop</i>-Anzahl in Anwesenheit eines <i>Capping</i>-Oligonukleotids.</b> .....	<b>96</b>
<b>Abbildung 28: Gelelektrophoretische Bandentrennung von <i>Kissing-Loop</i>-Komplexen unter hohen Temperaturbedingungen</b> .....	<b>98</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Parameter der Helixformen von doppelsträngiger RNA und DNA.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabelle 2: Übersicht aller im DNA-Tetraeder verwendeten Oligonukleotide. ....</b>	<b>27</b>
<b>Tabelle 3: Übersicht aller sonstigen verwendeten Oligonukleotide. ....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 4: Rezepte für native Polyacrylamidgele. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 5: Rezept für ein denaturierendes Polyacrylamidgel. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 6: Übersicht der Lösungen für die Silbernitrat-Färbung. ....</b>	<b>36</b>
<b>Tabelle 7: Legende Signifikanzniveau. ....</b>	<b>36</b>
<b>Tabelle 8: Übersicht aller für Kapitel 9.2. verwendeten Oligonukleotide. ....</b>	<b>94</b>
<b>Tabelle 9: Statistische Daten zur Temperatursensitivität der <i>Kissing-Loop</i>-Komplexes (°C).....</b>	<b>97</b>
<b>Tabelle 10: Statistische Daten zur Testung der Ionenstärkesensitivität des <i>Kissing-Loop</i>-Komplexes in Anwesenheit von Kalium (K<sup>+</sup>) .....</b>	<b>99</b>
<b>Tabelle 11: Statistische Daten zur Testung der Ionenstärkesensitivität des <i>Kissing-Loop</i>-Komplexes in Anwesenheit von Zink (Zn<sup>2+</sup>).....</b>	<b>100</b>
<b>Tabelle 12: Statistische Daten zur Testung der Ionenstärkesensitivität des <i>Kissing-Loop</i>-Komplexes in Anwesenheit von Calcium (Ca<sup>2+</sup>) .....</b>	<b>101</b>
<b>Tabelle 13: Statistische Daten zur Ionenstärkesensitivität in Anwesenheit von Magnesium (Mg<sup>2+</sup>) .....</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\psi$	Verpackungssignal
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
DIS	engl. <i>dimerization initiation site</i> , Dimerisationsinitiationssequenz
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
HP	<i>Hairpin</i> , aus dem Englischen für ‚Haarnadel‘
KL	<i>Kissing-Loop</i> , aus dem Englischen für ‚küssende Schleife‘
KLD	engl. <i>kissing-loop domain</i> , <i>Kissing-Loop</i> -Domäne
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
RepA	engl. <i>plasmid replication protein A</i>
SD	engl. <i>major splice donor site</i> , retrovirales Spleißdonorsignal
TAE/Mg <sup>2+</sup> -Puffer	Tris- Essigsäure (engl. <i>acetic acid</i> )- EDTA- Magnesiumacetat- Puffer
TA-Puffer	Tris- Essigsäure (engl. <i>acetic acid</i> )- Puffer
TAR	engl. <i>trans-activation response element</i>
TBE-Puffer	Tris- Borsäure- Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TM-Puffer	Tris- Magnesiumchlorid- Puffer
TMA-Puffer	Tris- Magnesiumchlorid- ATP- Puffer

# 1 EINLEITUNG

Industrie und Wissenschaft untersuchen und verwenden zunehmend Strukturen in Nanogröße (1 bis 100 nm), und versuchen auf vielfältige Weise solche Nanoprodukte herzustellen. Als Nanotechnologie bezeichnet man dabei die Technologie, nanoskalige Partikel herzustellen und einzusetzen, um neue Eigenschaften auszunutzen, die auf der Größe der Nanostoffe basieren. Die Nanotechnologie bietet somit neue Herausforderungen und Chancen für viele Bereiche des Lebens. Anorganische und organische Nanomaterialien finden bereits in verschiedenen Bereichen Anwendung, unter anderem der Kosmetik, Elektronik und Medizin. So finden sich Zinkoxid-Partikel in der Größe von 30 bis 200 nm in vielen kosmetischen Produkten, beispielsweise in Sonnencreme, wobei ihre vor UV-Einwirkung schützenden Eigenschaften zum Tragen kommen (Monteiro-Riviere *et al.*, 2011). Im Bereich der Elektronik sind Kohlenstoffnanoröhren bereits seit Ende der 90er-Jahre im Einsatz, so zum Beispiel in Kohlenstoff-Nanoröhren-Feldeffekttransistoren (engl. *carbon nanotube field-effect transistors*, CNTFET; Tans *et al.*, 1998). Auch in der Medizin finden Stoffe im Nanomaßstab immer häufiger Anwendung, wobei magnetische Nanopartikel in einigen Ländern, unter anderem der EU, bereits seit einigen Jahren in der Tumorthherapie zugelassen sind (Kobayashi, 2011; Maier-Hauff *et al.*, 2011; Lima-Tenório *et al.*, 2015). Antimikrobiell wirkendes, kolloidales Silber soll vor allem bei antibiotikaresistenten Erregern wirken und ist unter anderem als Kosmetik- und Nahrungsergänzungsmittel, jedoch noch nicht als Arzneimittel, zugelassen. Auch in der Zahnmedizin sollen zukünftig anorganische Nanomaterialien eingesetzt werden und hier vor allem einen effektiven Schutz gegen bakterielle Zahnerkrankungen bewirken (Hannig und Hannig, 2010). Der direkte Kontakt solcher Nanopartikel mit dem Menschen wirft allerdings auch Fragen zum gesundheitlichen Risiko auf. Viele Nanomaterialien bestehen aus anorganischen Stoffen und über eine mögliche Interaktion mit biologischen Strukturen existieren zu wenige gesicherte Daten. Einige Nanostoffe wurden bereits als für den Menschen oder die Umwelt gefährlich identifiziert (Lewinski *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2014). Auf der Suche nach Alternativen für vor allem klinische Anwendungen rückten in den vergangenen Jahren daher Biomoleküle ins Blickfeld der Forscher. Ein Biomolekül, die Desoxyribonukleinsäure (englisch *deoxyribonucleic acid*, DNA), sticht dabei aufgrund ihrer Eigenschaften besonders hervor. Die DNA ist sowohl ein Molekül in Nanogröße, als auch dreidimensional organisiert, biokompatibel und verfügt über die Fähigkeit zur Selbstassemblierung, um komplexe Sekundärstrukturen zu bilden. All dies macht sie zu einem

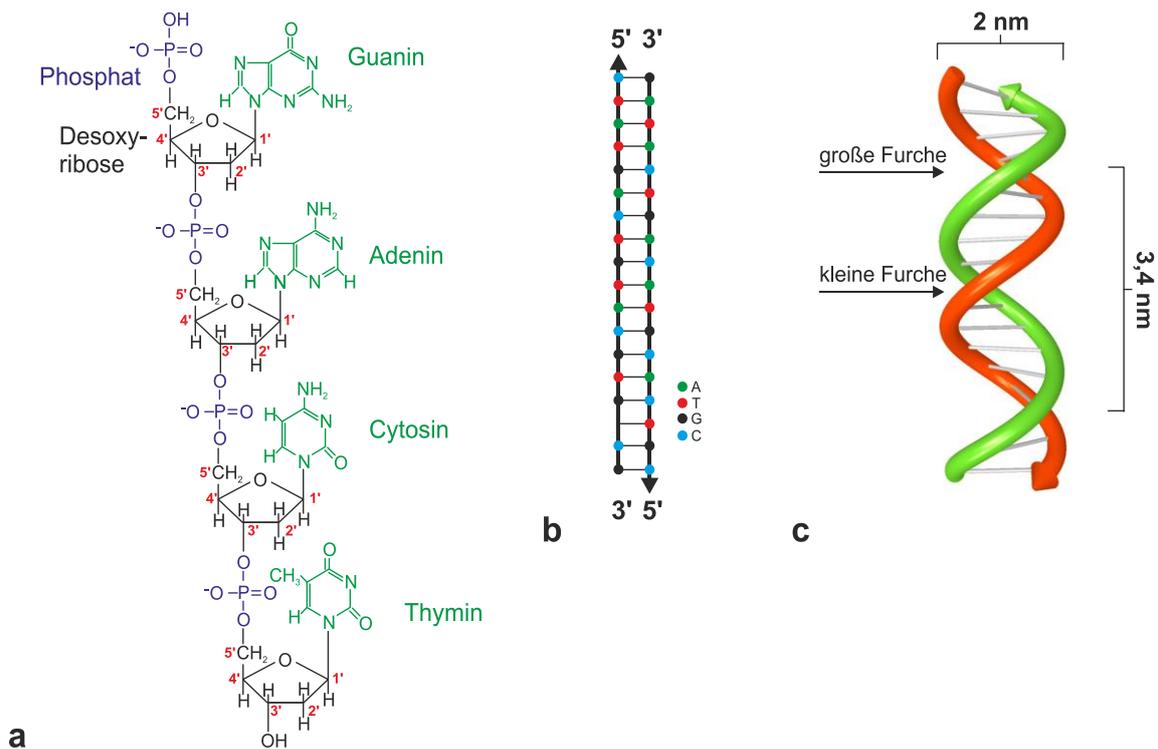
geeigneten Werkzeug für nanotechnologische Anwendungen im unmittelbaren Umfeld des Menschen.

## 1.1 Die chemische Zusammensetzung der Nukleinsäuren

Warum sich gerade Nukleinsäuren als Material für den nanotechnologischen Einsatz eignen, zeigt sich in ihrem chemischen Aufbau. Dieser vermittelt die für eine nanotechnologische Anwendung wichtigste Eigenschaft: Die Fähigkeit sich in kontrollierbarer und vorhersagbarer Weise selbst, in Form komplexer, zwei- und dreidimensionaler Strukturen, zu organisieren.

1953 veröffentlichten die Nobelpreisträger James Watson und Francis Crick mit Unterstützung von Maurice Wilkins ein Modell von der Struktur der DNA. Dieses entstand auf der Grundlage der von Rosalind Franklin angefertigten DNA-Röntgenaufnahmen und der von Erwin Chargaff zuvor festgelegten *Chargaff-Regeln*. Hiermit legten sie den Grundstein für einen neuen Forschungszweig, der die Chemie mit der Biologie in Verbindung brachte und so in den folgenden Jahrzehnten zur Aufklärung grundlegender biologischer Mechanismen führte. Ihr Modell erklärt, dass die Kodierung der Erbinformation durch die vier Nukleotide Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP), Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP) und Desoxycytidinmonophosphat (dCMP) erfolgt, welche in einer linearen Abfolge aneinander gebunden sind, und so einen DNA-Einzelstrang, auch als DNA-Primärstruktur bezeichnet, bilden (Abbildung 1a). Bereits Erwin Chargaff entdeckte, dass die Basen der Nukleotide, Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin, in immer gleichen Konzentrationen in der Erbsubstanz vorkommen, was ihn zur Annahme leitete, dass diese jeweils paarweise aneinander gebunden vorkommen (Abbildung 1b). Diese Basenpaarung ermöglicht die Bindung eines DNA-Einzelstrangs an einen weiteren mit der sogenannten komplementären Sequenz der Nukleotide. Die Bindung erfolgt über Wasserstoffbrücken, jeweils zwei zwischen Adenin und Thymin und drei zwischen Guanin und Cytosin (Sinden, 1994). Die Orientierung der Einzelstränge wird anhand der Verknüpfungen am 3'- und 5'-C-Atom der Desoxyribose beschrieben, wobei im Doppelstrang ein Strang in 5'–3'-Direktionalität verläuft und der andere in 3'–5'-Direktionalität. Diese antiparallele Orientierung ist nötig für die Fähigkeit der Einzelstränge zu hybridisieren, d.h. ein Strang kann nur mit einem entgegengesetzt verlaufenden paaren (Abbildung 1a–b). Im resultierenden DNA-Doppelstrang sorgen wiederum Stapelwechselwirkungen zwischen benachbarten Basen (engl. *base stacking*) für die Stabilität des Doppelstrangs (siehe auch Kapitel 1.3). Diese bewirken

weiterhin die helicale Windung des Doppelstrangs zu einer Doppelhelix. Die Zucker- und Phosphatbestandteile liegen außen und bilden das Helix-Rückgrat, wohingegen sich die Basen innerhalb der Struktur befinden. Durch das Umeinanderwinden der Einzelstränge entstehen jedoch Lücken, in denen nun die Basen an der Oberfläche liegen, diese werden als die kleine und große Furche bezeichnet (Abbildung 1c).



**Abbildung 1: Die Form und chemische Zusammensetzung der Desoxyribonukleinsäure.**

a) Die DNA setzt sich aus Phosphatgruppen (blau) und Desoxyribose (schwarz) im DNA-Rückgrat, sowie den vier heterozyklischen Basen Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin (grün) zusammen, hier als Einzelstrang dargestellt. Die Direktionalität des Einzelstrangs wird durch die Verknüpfungen am 3'- und 5'-C-Atom der Desoxyribose beschrieben

b) DNA-Doppelstränge werden gewöhnlich vereinfacht als Leiter abgebildet, hierbei paaren komplementäre Basen (Adenin = grün, Thymin = rot, Guanin = schwarz, Cytosin = blau) über Wasserstoffbrücken (vereinfacht als waagerechter Strich dargestellt). Für die Bildung des Doppelstrangs müssen beide Einzelstränge in antiparalleler Direktionalität (3'-5'- und 5'-3'-Direktionalität) und in zueinander komplementärer Basenabfolge vorliegen.

c) Erst in der dreidimensionalen  $\alpha$ -Helix werden die kleine und große Furche sichtbar. Die Helixwindung wird dabei durch Stapelwechselwirkungen zwischen benachbarten Basen verursacht. Eine komplette Windung der Helix findet alle 3,4 nm statt, dabei liegt der Durchmesser der Helix bei 2 nm. Abbildung (c) wurde online mit der NUPACK Webanwendung erstellt.

Ähnlich erfolgt die Paarung von komplementären Strängen bei einer weiteren Nukleinsäure, der Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA), die sich ähnlich der DNA aus vier Nukleotiden zusammensetzt, Adenosinmonophosphat (AMP), Uridinmonophosphat (UMP), Guanosinmonophosphat (GMP) und Cytidinmonophosphat (CMP). Hierbei paart Adenin über

zwei Wasserstoffbrücken mit Uracil. Ribonukleinsäuren unterscheiden sich weiterhin von der DNA durch ihren Zuckerbestandteil Ribose. Diese unterscheidet sich von der Desoxyribose durch eine Hydroxygruppe (anstatt eines Wasserstoffatoms) an der 2'-Position. Durch diesen Umstand ist die RNA weniger stabil und liegt *in vivo* vorwiegend als Einzelstrang vor.

## 1.2 Die Helixformen von DNA und RNA

Die Doppelhelix von Nukleinsäuren stellt eine einfache, dreidimensionale Struktur in Nanogröße dar, die sich in Abhängigkeit vom Umgebungsmilieu bildet.

In wässriger Umgebung liegt die DNA als B-Helix vor, bei Wasserentzug bildet sie allerdings eine als A-DNA bekannte Konformation und unter hohen Salzkonzentrationen, sowie in Anwesenheit von Alkoholen liegt sie als Z-DNA vor. Die Helices unterscheiden sich in ihrer Drehrichtung (linksgängige Z-DNA und rechtsgängige A-Form/B-Form) und einer erhöhten Anzahl an Nukleotiden bei A-DNA und Z-DNA je Helixwindung, im Vergleich zur B-Form. Diese weist etwa alle zehn Nukleotide, was einer Länge von 3,4 nm (10,5 bp) entspricht, eine Windung auf, so dass benachbarte Basen in einem Winkel von  $36^\circ$  zueinander stehen (Abbildung 1c). Der Durchmesser der Helixachse bei Vorliegen einer B-Form beträgt 2 nm (Abbildung 1c). Die A-Form weist elf Nukleotide pro Windung auf und einen dadurch resultierenden größeren Durchmesser von 2,3 nm. Die Z-Form besitzt dagegen einen geringeren Durchmesser von nur 1,8 nm, bei einer zur A- und B-Form erhöhten Länge von 4,5 nm Ganghöhe pro Windung (Sinden, 1994).

RNA-Moleküle liegen seltener in Form einer Helix vor. Bei Bildung eines Doppelstrangs liegt jedoch die A-Form (A-RNA) vor, da die Hydroxygruppe an der 2'-Position der Ribose die B-Form verhindert. Unter hohen Salzkonzentrationen über 20 % entsteht aus der A-RNA eine A'-RNA mit 12 anstatt 11 Basenpaaren pro Windung (Egli und Saenger, 2013).

Die Eigenschaft von Nukleinsäuren ihre Helixform in Abhängigkeit vom Milieu zu verändern, lässt sich ebenfalls nanotechnologisch z.B. in Form schaltbarer DNA-Nanomaschinen nutzen (Mao *et al.*, 1999). Tabelle 1 gibt eine Übersicht der verschiedenen Helixformen von RNA und DNA.

**Tabelle 1: Parameter der Helixformen von doppelsträngiger RNA und DNA.**

Daten zur A- und A'-Helix der RNA wurden Egli und Saenger, 2013 und Daten zu den DNA-Helices wurden Sinden, 1994 entnommen.

	A'-Form	A-Form	A-Form	B-Form	Z-Form
<b>Nukleinsäure</b>	RNA	RNA	DNA	DNA	DNA
<b>bp pro Windung</b>	12	11	11	10,5	12
<b>Abstand der Nukleotide</b>	0,3 nm	0,27-0,28 nm	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
<b>Ganghöhe pro Windung</b>	3 nm	2,7-2,8 nm	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
<b>Helicale Windung pro Basenpaar</b>	30°	30°	31°	36°	-30°
<b>Neigungswinkel der Basen zur Helixachse</b>	16-19°	10°	20°	-6°	7°
<b>Durchmesser Helixachse</b>	2,6 nm	2,6 nm	2,3 nm	2 nm	1,8 nm

### 1.3 Stabilität von Doppelsträngen

Eine wichtige Eigenschaft von Nano-Material ist es eine ausreichende Widerstandsfähigkeit unter sich verändernden Bedingungen zu gewährleisten. Auch unter natürlichen Bedingungen, z.B. um die genetische Information sicher zu speichern, muss der DNA-Doppelstrang eine hohe Stabilität, während zahlreicher Prozesse im Laufe des Zellzyklus, aufweisen. Hierfür sorgen zum einen die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen. Diese verbinden die beiden DNA-Einzelstränge, aber können leicht aufgelöst werden, um beispielsweise die Replikation oder Transkription zu ermöglichen, für die die DNA als partieller Einzelstrang vorliegen muss.

Einen weiteren Einfluss auf die Stabilität eines Doppelstrangs haben die bereits erwähnten Basen-Stapelwechselwirkungen (Yakovchuk *et al.*, 2006; Sinden, 1994), im Englischen auch *base stacking*, *aromatic stacking* oder *pi-stacking* genannt. Diese beruhen auf Wechselwirkung zwischen aufeinander folgenden Basen, jeweils einer Pyrimidin- und einer Purinbase. Hierbei überlappen die aromatischen Ringe der Basenheterozyklen, wobei die  $\pi$ -Elektronen delokalisiert sind (Sponer *et al.*, 2000). Diese Stapelwechselwirkungen sind sowohl bei RNA- als auch DNA-Molekülen zu finden und stabilisieren auch nicht lineare Sekundärstrukturen, wie beispielsweise *Pseudoknots* (aus dem Englischen für Pseudoknoten) (siehe dazu auch Kapitel 1.4).

Die Stabilisierung der DNA *in vivo* wird darüber hinaus durch die Bindung zahlreicher Proteine, beispielsweise der Histone, erreicht. Die Öffnung der Doppelhelix erfolgt, zum Beispiel in der Replikation und bei der Transkription in Eukaryoten, erst durch den Einsatz von Enzymen, den Helikasen.

Einen Einfluss auf die De- und Renaturierung von Doppelsträngen nehmen auch zahlreiche Einflussfaktoren des Milieus, diese sind vor allem für künstliche DNA-Strukturen in Abwesenheit eines biologischen Systems von Bedeutung. DNA-Stränge liegen je nach Temperatur, Ionenkonzentration und pH-Milieu in unterschiedlicher Konformation vor.

Unter Wirkung eines Temperaturgradienten denaturieren DNA-Doppelstränge unabhängig von der Stranglänge bei spätestens 94 °C in Einzelstränge. Sie renaturieren bei Abkühlung, wobei die Temperatur bei der eine vollständige Renaturierung erreicht ist, von der jeweiligen Schmelztemperatur abhängig ist. Diese ergibt sich für jeden Strang u.a. aufgrund der spezifischen Basenzusammensetzung und Stranglänge und der damit verbundenen Anzahl an Wasserstoffbrücken. Die Schmelztemperatur,  $T_M$ -Wert, entspricht der Temperatur in Grad Celsius (°C) bei der die Hälfte der DNA-Stränge einzelsträngig vorliegt.

Basierend auf einer Temperaturerhöhung kommt es auch zu einer erhöhten Teilchenbewegung (Brownsche Molekularbewegung). Dies wiederum führt zu einer geförderten Reaktionsgeschwindigkeit, da komplementäre Basen von Nukleinsäuren so eine höhere Kontaktrate aufweisen, um Basenpaarungen ausbilden zu können. Hierbei ausschlaggebend ist auch die Ladung der Teilchen, so stoßen sich solche gleicher Ladung ab und ziehen sich Reaktionspartner mit unterschiedlicher Ladung an. Einen stabilisierenden Einfluss auf die Reaktion von Nukleinsäuren als negativ geladene Moleküle haben daher positiv geladene Ionen und Moleküle, welche sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen anlagern, deren negative Ladung abschirmen und so eine Basenpaarung zwischen benachbarten Nukleinsäuren erleichtern. Häufig finden in künstlichen Reaktionsansätzen daher Kationen z.B. Magnesiumionen oder andere positiv geladene Moleküle wie Spermidin Anwendung. In lebenden Organismen übernehmen vor allem Proteine diese Aufgabe, da hier freie, ungebundene DNA typischerweise nicht vorkommt.

Da die Ladung von Molekülen durch das herrschende pH-Milieu beeinflusst wird, hat auch der pH-Wert einen Einfluss auf die Ausbildung von Basenpaaren. Bei neutralem pH-Wert liegt die DNA als negativ geladenes Molekül vor. Die freie OH-Gruppe des Phosphats hat ein Proton abgegeben. Unter sauren Bedingungen ist die Löslichkeit allerdings stark verringert, da die Phosphatgruppen protoniert und somit nicht mehr geladen vorliegen, was zu einer Fällung der Nukleinsäure führt. DNA-Moleküle sind aufgrund ihrer fehlenden Hydroxy-Gruppe an der 2'-Position der Desoxyribose unter alkalischen Bedingungen stabiler als RNA-Moleküle, welche unter stark alkalische Bedingungen in Nukleotide zerfallen. Aber auch hier werden bei einem zu hohen pH-Wert die Wasserstoffbrücken der Basenpaarungen aufgebrochen. Dies wird durch

eine Deprotonierung der Basen verursacht, ab einem pH-Wert von 11,5 geschieht dies bei der Base Thymin an der 3'-Position und bei Guanin an der 1'-Position. Die dadurch entstehende negative Ladung destabilisiert das DNA-Molekül, was schließlich zur Denaturierung in Einzelstränge führt.

## 1.4 Weitere dreidimensionale Strukturen der Nukleinsäuren

Neben den bereits beschriebenen Formen der Doppelhelix können DNA- und RNA-Einzelstränge weitere Konformationen einnehmen, sogenannte nicht lineare Sekundärstrukturen (Abbildung 2). Nicht lineare Sekundärstrukturen werden aufgrund ihrer komplexen zwei- und dreidimensionalen Konformation in der Nanotechnologie eingesetzt. Hierzu zählen u.a. *Hairpin*-Strukturen (aus dem Englischen für Haarnadel-Struktur), die auch als Stamm-Schleifen-Strukturen (engl. *stem-loops*) bezeichnet werden. Diese bilden sich durch komplementäre Bereiche innerhalb eines DNA-Einzelstrangs, was zur Ausbildung eines partiellen Doppelstrangs (Stamm) führt. Der zwischen den beiden komplementären Bereichen liegende, ungepaarte Bereich wird als *Loop* (aus dem Englischen, für Schleife) bezeichnet. Weiterhin können kurze Bereiche mit ungepaarten Nukleotiden auch interne *Loops*, Schlaufen oder *Mismatch*-Strukturen bilden (Abbildung 2). *Hairpin*-Strukturen finden sich vor allem als Teil komplexer RNA-Sekundärstrukturen, wie beispielsweise die tRNA mit mehreren aufeinander folgenden *Hairpin*-Strukturen. Auch die prokaryotische mRNA weist eine terminale *Hairpin*-Schleife auf, die als Signal für den Abbruch der Transkription dient. In Eukaryoten findet weiterhin eine durch microRNA gesteuerte Genregulierung durch Gen-Stillegung (engl. *gene silencing*) statt, wobei auch hier *Hairpin*-Strukturen involviert sind. Sehr häufig kommen *Hairpins* im einzelsträngigen Genom von Viren, vorrangig Retroviren, vor, wo sie eine Vielzahl an regulatorischen Aufgaben übernehmen (Brunel *et al.*, 2002). So können zwei retrovirale RNA-Genome (Brunel *et al.*, 2002) über Homologien im *Loop*-Bereich Basenpaare ausbilden. Die entstandene Struktur nennt sich *Kissing-Loop* (aus dem Englischen für ‚küssende Schleife‘) (siehe dazu auch Kapitel 1.5).

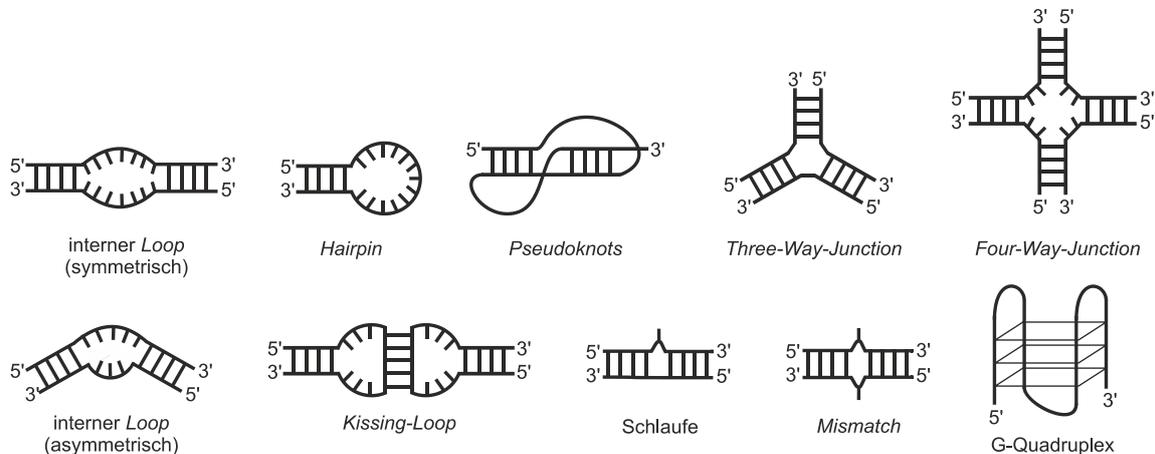
Durch Paarung einzelsträngiger Bereiche des *Loops* mit einem anderen einzelsträngigen Bereich des Strangs, kann es zur Bildung eines sogenannten *Pseudoknots* (Baker *et al.*, 2009). Erstmals entdeckt wurden *Pseudoknots* als RNA-Sekundärstrukturen in (Staple und Butcher, 2005), aber auch als Teil der humanen Telomerase erfüllt ein RNA-*Pseudoknot* eine essentielle

Aufgabe (Mihalusova *et al.*, 2011). Darüber hinaus finden sich *Pseudoknots* auch als Teil des katalytischen Zentrums von zahlreichen Ribozymen (Serganov *et al.*, 2005).

Größere Sekundärstrukturen als Verknüpfungen zweier DNA-Doppelstränge, die beispielsweise im Laufe der Rekombination, bei der DNA-Reparatur oder bei der viralen DNA-Integration vorkommen, sind möglich. Zu diesen *Four-Way-Junctions* (aus dem Englischen für Vier-Wege-Kreuzung (Eichman *et al.*, 2000) gehören u.a. *Holliday Junctions* (Holliday-Struktur, Holliday, 1964).

Ein Kontakt zwischen Doppelsträngen kann auch durch *Three-way Junctions* (aus dem Englischen für Drei-Wege-Kreuzung) hergestellt werden. Diese Strukturen sind häufiger in Ribonukleinsäuren zu finden, wie z.B. im katalytischen Kern des *Hammerhead*-Ribozyms (aus dem Englischen für Hammerkopf-Ribozym) (Lescoute und Westhof, 2006).

Eine besondere Form der Sekundärstruktur stellen Q-Quadruplexe dar. Sie bilden sich in Guanin-reichen Sequenzen von Nukleinsäuren. Die außergewöhnliche Struktur wird dabei durch Bildung von Hoogsteen-Basenpaaren und durch ein zentrales monovalentes Kation, meist Kalium, stabilisiert. G-Quadruplex-Strukturen sind unter anderem in Telomeren des menschlichen Genoms zu finden und scheinen die Aktivität der Telomerase zu beeinflussen (Parkinson *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2013).



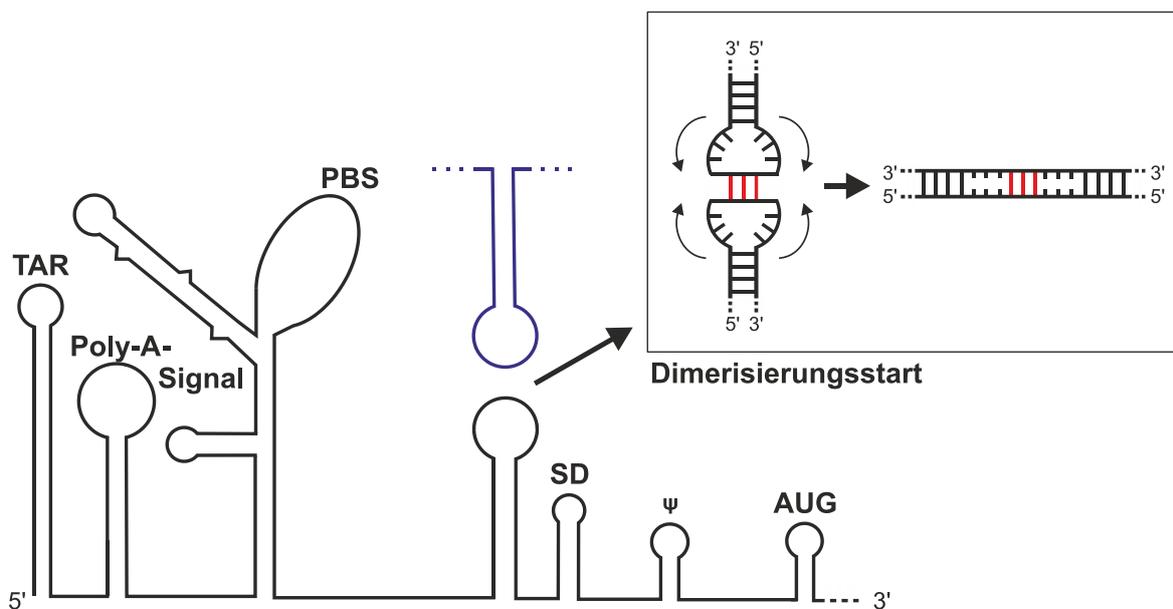
### Abbildung 2: *In vivo* Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren.

Natürliche DNA- und RNA-Stränge weisen häufig Sekundärstrukturen auf. Unter anderem kann der DNA-Doppelstrang kurze partiell denaturierte Bereiche aufweisen (interne *Loops*) oder diese formen sich zu *Hairpins*. *Hairpins* sind auch in RNA-Molekülen häufig zu finden. *Hairpins* können sich durch weitere Basenpaarungen des *Loops* auch zu *Pseudoknots* falten. *Hairpins* können aber auch innerhalb und zwischen RNA-Molekülen über Paarung komplementärer *Loop*-Bereiche *Kissing-Loop*-Strukturen bilden. Nicht komplementäre Basen können *Mismatch*-Strukturen (aus dem Englischen für Fehlpaarung) in einer Länge von ein bis mehreren Basenpaaren verursachen, kommen ein bis mehrere zusätzliche Nucleotide innerhalb nur einem der komplementären Einzelstränge vor, bilden diese Schleifen. Darüber hinaus bilden DNA-Doppelstränge und RNA-Moleküle während biologischer Prozesse weitere Sekundärstrukturen aus, so sind sogenannte *Three-Way-Junctions* und *Four-Way-Junctions* möglich. Eine besondere Form der Sekundärstruktur sind G-Quadruplexe, diese bilden sich in Guanin-reichen Sequenzen durch Hoogsteen-Basenpaarungen von je vier Guaninen pro Ebene.

## 1.5 Die *Kissing-Loop*-Struktur

*Kissing-Loop*-Strukturen sind eine in der Natur weit verbreitete Struktur der RNA, gefunden wurden sie bisher in sowohl höher entwickelten als auch primitiven Lebensformen. Natürlich vorkommende DNA-*Kissing-Loop*-Strukturen sind dagegen bisher nicht bekannt, was mit der generellen Seltenheit von *Hairpin*-Strukturen in DNA-Molekülen korreliert. Eine *Kissing-Loop*-Struktur entsteht dabei durch Hybridisierung der *Loop*-Bereiche zweier zueinander komplementärer *Hairpin*-Strukturen. Besondere Aufmerksamkeit errang das *Kissing-Loop-Annealing* als Schritt im Vermehrungszyklus von Retroviren, insbesondere des humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1). Die Erforschung des HI-Virus und damit die Suche nach einer Behandlungsmethode der mit der Infektion durch das HI-Virus verursachten Krankheit *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS, engl. für erworbenes Immundefektsyndrom) führte schließlich zur Entdeckung einer *Loop-Loop*-Interaktion des retroviralen Genoms. Der 5'-untranslatierte Bereich (engl. *5'-untranslated region*, 5'-UTR) des HIV-1 RNA-Genoms weist mehrere Stamm-*Loop*-Strukturen auf, die eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus und der anschließenden Verkapselung des Genoms in Viruspartikel spielen, aber auch die Reverse Transkription beeinflussen (Brunel *et al.*, 2002) (Abbildung 3). Aufgrund der hohen Mutationsrate existieren heute mehrere Varianten des HIV-Genoms und somit unterschiedliche Varianten des 5'-UTR. Bei der Untersuchung von Isolaten wurden drei häufig vorkommende RNA-Sekundärstrukturen gefunden (Harrison *et al.*, 1998): die *dimerization initiation site* (DIS), *major splice donor site* (SD) und das Verpackungssignal ( $\psi$ ). Die Dimerisationsinitiationssequenz (DIS) weist darüber hinaus in einigen Isolaten verschiedenen Varianten einer *Hairpin*-Struktur mit veränderten *Loop*-Sequenzen auf. So wurden die *Lai*-Variante (AA[GCGCGC]A) und die *Mal*-Variante (AA[GUGCAC]A) des apikalen *Loops* identifiziert (Laughrea und Jetté, 1996a; Laughrea und Jetté, 1996b; Laughrea und Jetté, 1997; Brunel *et al.*, 2002; Baba *et al.*, 2005; Sinden, 1994; McNamara, 2006). Diese *Loop*-Sequenzen sind selbstkomplementär, der selbstkomplementäre Bereich ist daher durch eckige Klammern hervorgehoben. Weitere Subtypen sind bekannt und wurden mit einer länderspezifischen Verteilung gefunden (Brunel *et al.*, 2002; McNamara, 2006). Aufgrund dieser Sequenz können zwei *Hairpins* in ihrem einzelsträngigen *Loop*-Bereich eine Watson-Crick-Basenpaarung eingehen und bilden ein *Kissing-Loop*. Diese *Kissing-Loop*-Struktur wiederum ist meta-stabil und geht in ein *bent*-Intermediat über, welches schließlich zu einem erweiterten Duplex dimerisiert (Mundigala *et al.*, 2014). Dieser, der Verpackung in Viruspartikel vorausgehende,

Dimerisierungsprozess des retroviralen Genoms wird stark von der Art und Konzentration anwesender Kationen beeinflusst. Nachgewiesen wurde dies bereits *in vitro* für Magnesium und Kalium (Mundigala *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2000). Die Anwesenheit von Magnesiumionen im *Kissing-Loop* wurde unter anderem *in vitro* mittels Kernspinresonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) und in Kristallstrukturanalysen gezeigt (Jossinet *et al.*, 1999; Ennifar *et al.*, 2001). Die Notwendigkeit von Magnesium für die Ausbildung eines *Kissing-Loop* wurde ebenfalls für künstliche *Kissing-Loop*-Strukturen aus RNA und DNA (Horiya *et al.*, 2003; Bois *et al.*, 2005; Šulc *et al.*, 2012). Hierbei scheinen RNA-*Kissing-Loops* eine weitaus größere Abhängigkeit von der Ionenstärke zu zeigen als reguläre RNA-Helices (Weixlbaumer *et al.*, 2004). Eine Stabilisierung des *Kissing-Loop* über coaxiale Basenstapel-Wechselwirkungen konnte darüber hinaus für RNA-*Kissing-Loops* gezeigt werden (Ennifar *et al.*, 2001).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Dimerisierungsstarts mittels *Kissing-Loop*-Bildung zweier retroviraler HIV-1 Genome.**

Das HIV-1 Genom weist im 5'-untranslatierten Bereich zahlreiche Sekundärstrukturen auf. Für die Strukturen TAR und DIS wurden jeweils *Loop-Loop*-Interaktionen nachgewiesen. TAR = engl. *Trans-activation response element*, PBS = engl. *Protein binding site*, DIS = engl. *Dimerization initiation site*, SD = engl. *Splice donor site*, ψ = Verpackungssignal, AUG = Startcodon. Es ist ein stark vereinfachtes Schema ohne Größenstandard dargestellt. Auf zahlreiche Sekundärstrukturen, wie beispielsweise interne *Loops*, wurde verzichtet, da diese je nach Subtyp stark verändert oder nicht vorhanden sind. Die Dimerisierung mit einer weiteren einzelsträngigen Kopie des RNA-Genoms (blau) erfolgt über Ausbildung eines *Kissing-Loop* durch Basenpaarungen im DIS-Loop (rot). Die DIS-Region kann je nach Subtyp verändert sein, weswegen auf eine Darstellung der Nukleotidsequenz verzichtet wurde.

Die Fähigkeit einen *Kissing-Loop* auszubilden wurde auch beim *trans-activation response element* (TAR)-Element im Genom der HI-Virus Typ 1 (Abbildung 3), mit der apicalen *Loop*-

Sequenz 5'-CUGGGA-3', gefunden (Collin *et al.*, 2000). Eine besondere Rolle hat dieses Element bei der Regulation der viralen Genexpression (Ouellet *et al.*, 2013), sowie der Repression der Wirts-Genexpression (Brady und Kashanchi, 2005). Die Fähigkeit zur Genomdimerisierung über *Kissing-Loop*-Komplexe findet sich nicht nur im Lebenszyklus der *Retroviridae*, sondern konnte auch im Hepatitis C-Virus (*Flaviviridae*) nachgewiesen werden (Shetty *et al.*, 2010). Weitere natürliche *Kissing-Loop*-Strukturen finden sich auch in komplexeren Organismen (Brunel *et al.*, 2002). In Prokaryoten wird eine Regulation akzessorischer genetischer Elemente wie Plasmiden, Transposone oder Phagen mittels *Antisense*-RNA in Form kleiner RNA-Moleküle (*small RNAs*) vermittelt. Die Komplexbildung aus *Target*- und *Antisense*-RNA wird für einige *Target/Antisense*-Komplexe über *Kissing-Loop*-Bildung initiiert. Beispiele für solche prokaryotische Regulationsmechanismen finden sich z.B. zwischen *Target*-mRNA Cop-T und *Antisense*-RNA Cop-A des Plasmid R1 (*Plasmid Replication Protein A*, RepA; Gerhart *et al.*, 1986). Weiterhin wird auch die Replikationskontrolle des Plasmid ColE1 (Tomizawa *et al.*, 1981; Tomizawa, 1984) durch *Antisense*-RNA mittels initialem *Kissing-Loop*-Komplex reguliert.

Auch die Regulation anderer bakterieller Prozesse, wie die Plasmid-Konjugation, welche durch die im *tra*-Operon kodierten Gene des F-Plasmid gesteuert wird, geht auf die Bildung eines *Kissing-Loop*-Komplexes zwischen *Target*- und *Antisense*-RNA zurück (Koraimann *et al.*, 1996).

Ein weiterer, durch *Kissing-Loop*-Strukturen gesteuerter Regulationsmechanismus ist vom prokaryotischen *Escherchia coli* in der Genexpression des membranständigen Vitamin-B-Transporterproteins BtuB bekannt. Hier verursacht eine *Kissing-Loop*-Bildung des *Riboswitch* der *btuB*-mRNA eine verbesserte Ligand-Bindungseffizienz, was wiederum einen verstärkten regulatorischen Effekt in der Genexpression bewirkt. *Riboswitches* sind Sekundärstrukturen der mRNA, die vorwiegend bei Prokaryoten bekannt sind. Durch die Bindung eines Liganden und die einhergehende Konformationsänderung der linearen mRNA, wird der Zugang zur ribosomalen Erkennungssequenz (Shine-Dalgarno-Sequenz) versperrt. Dies führt zu einer Herabregulation der Expression des entsprechenden Gens, da eine Translation durch die Ribosomen verhindert wird (Lussier *et al.*, 2015).

Auch in Eukaryoten ist eine regulatorische Funktion über RNA-*Kissing-Loop*-Komplexe bekannt. In der frühen embryonalen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* ist ein antero-posterior Gradient des Transkriptionsfaktors Bicoid (BCD) nötig. Dies wird durch eine Anhäufung von *BCD*-mRNA am anterior-Pol erreicht. Über *Kissing-Loop*-Bildung findet eine

Dimerisierung über den 3'-UTR der mRNAs statt, was wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Lokalisierung von mRNA in Form von Ribonukleopartikeln am Pol ist (Ferrandon *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2004). *Kissing-Loops* sind bisher weitestgehend nur als regulatorische RNA-Strukturen bekannt, allerdings wurde in der Vergangenheit auch ein Einfluss von DNA-*Kissing-Loops* auf die Initiation der Rekombination diskutiert (Forsdyke, 1995). Die Bedeutung der *Kissing-Loop*-Strukturen ging, laut dieser Hypothese, durch die Entstehung von Exon-Intron-Bereichen verloren. So liegt die Annahme zugrunde, dass die Fähigkeit zur Rekombination evolutionär früher entstanden ist, als die Fähigkeit der Nukleinsäuren für Proteine zu codieren ("*Intron-Early-Hypothese*"; Fabry, 1995).

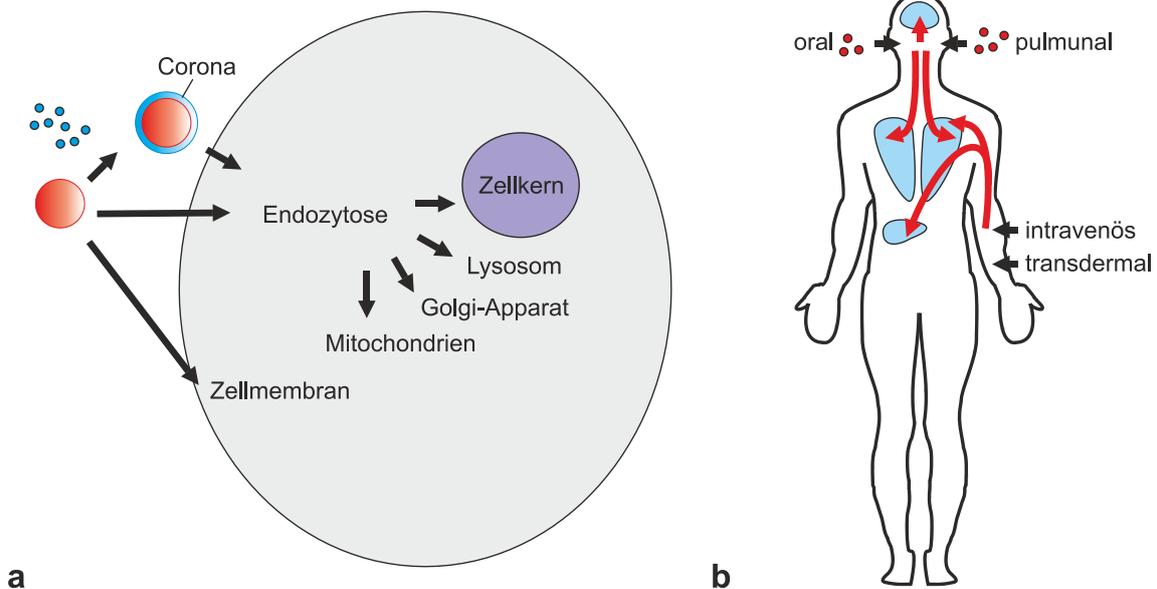
## 1.6 Die Cytotoxizität von Nanomaterial

Nanomaterialien stehen bereits seit vielen Jahren im Verdacht bei Kontakt gesundheitliche Schäden zu verursachen. Neben ungewolltem Kontakt durch Nanomaterial in Feinstäuben (z.B. Vulkanasche, Zigarettenrauch, Abgase, Schweißrauch) und Chemikalien, steht auch der gewollte Einsatz im direkten Umfeld des Menschen unter Kritik. Dazu zählen Anwendungen in der Medizin, der Kosmetik, in Textilien, Verpackungs- und Verbrauchsmaterialien, sowie als Lebensmittelzusatzstoffe. Nanopartikel wirken aufgrund vieler Eigenschaften cytotoxisch. Neben ihrer Form, der Oberflächenladung, und -struktur, der chemischen Zusammensetzung und ihrer der Anwendung folgenden Stabilität spielt auch die typische Nanogröße eine Rolle. So können sie aufgrund ihrer Größe auch bei äußerer Anwendung in Gewebe z.B. durch akut geschädigte Haut und in Zellen eindringen (Lewinski *et al.*, 2008). Bisher liegen nur unzureichende Daten über den Verbleib von vom menschlichen Körper aufgenommene Nanomaterialien vor, was auch zugelassene Materialien betrifft. Die Toxizität von Nanopartikeln steht in vielen Fällen in direktem Zusammenhang mit der Konzentration dieser Stoffe, wobei der Effekt mit zunehmender Inkubationszeit weiterhin zunimmt (Lewinski *et al.*, 2008). Kolloidales Silber (Nanosilber) kann bei zu häufiger oraler Einnahme oder durch unmittelbaren Umgang im Beruf (Silberschmiede und verwandte Berufe) zu Argyrie, einer Einlagerung von Silber in Haut, Augen und inneren Organen führen, was unter anderem zu einer ausgeprägten Blaufärbung der betroffenen Gewebe führt (Hadrup und Lam, 2014; Sterling, 2014). Nanogoldpartikel, welche u.a. in der Medizin zum Einsatz kommen, können mit Hämoglobin verklumpen, wodurch die Gefahr besteht, dass feine Adern im Blutkreislauf verstopfen könnten (Moerz *et al.*, 2015). Auch die Gefahr der intrazellulären Akkumulation

besteht, wenn Partikel von Zellen durch z.B. Phagocytose aufgenommen werden, aber diese nicht durch Exocytose wieder verlassen können. Intrazellulär und angeheftet an Zellmembranen haben Nanopartikel multiple Effekte, die unter anderem zu Veränderungen der Zellmorphologie, zu einem inhibierten Zellwachstum oder zur Auslösung von Entzündungsprozessen und Apoptose führen (Lewinski *et al.*, 2008; Elsaesser und Howard, 2012). Diese Effekte werden durch unspezifische Wechselwirkungen mit biologischen Strukturen, wie Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden verursacht (Elsaesser und Howard, 2012). So kann es z.B. durch Anlagerungen von Material (Corona) zu Veränderungen der Oberfläche kommen, wenn Partikel einem bestimmten Milieu wie Gas, Wasser oder einer biologischen Umgebung ausgesetzt werden, was wiederum Einfluss auf ihre biologische Wirkung haben kann (Elsaesser und Howard, 2012; Dai *et al.*, 2015) (Abbildung 4a). Die Beschaffenheit der Nanopartikeloberflächen hat weitere Auswirkungen, denn je nach Struktur, Ladung und Modifizierung der Oberfläche durch chemische Gruppen können Partikel einfacher in Zellen eindringen und dort erst cytotoxisch wirken. Oder im Gegenteil durch eine entsprechende Verpackung cytotoxischer Bestandteile – z.B. Schwermetalle im Kern von Quantenpunkt (engl. *quantum dot*) (Lewinski *et al.*, 2008) oder Siliziumdioxid ummantelte Nanometallpartikel (Chatterjee *et al.*, 2011) – können diese nicht mehr oder erst verzögert negativ auf die Zelle wirken. Nanopartikel wie Gold, können aufgrund ihrer geringen Größe schnell in Zellen aufgenommen werden, aber erreichen den Zellkern erst nach Modifikation durch weitere Strukturen (z.B. Polyethylenimin, PEI), was ihnen das Entkommen aus dem Endosom ermöglicht (Lewinski *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass die Kombination der entsprechenden Bestandteile von Nanopartikeln ebenfalls einen Einfluss auf den Verbleib und somit die resultierende toxische Wirkung hat. Mediziner versuchen sich diese Eigenschaften für nanomedizinische Anwendungen zu Nutze zu machen, um das gesundheitliche Risiko zu minimieren. Gebräuchliche Krebstherapien basieren beispielsweise auf einer Schädigung des tumorösen Gewebes, wobei solche Chemotherapien systemisch auf alle Zellen des Körpers wirken. Nanopartikel sollen hierbei, durch ein gezieltes *Targeting* des Tumors, Nebenwirkungen und Schäden an gesunden Geweben und Organen verhindern.

Nanopartikel innerhalb eines Organismus können nun über aktives *Targeting*, z.B. durch entsprechende Liganden an der Oberfläche, die den Kontakt zu Zielgeweben herstellen, ihren Wirkort erreichen. Ein Beispiel hierfür stellen Folate (Zwicke *et al.*, 2012) oder kurze Peptid- oder Oligonukleotid-Aptamere (Sun *et al.*, 2014) da, die an tumorspezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche binden und so den Kontakt zu Nanopartikel und Medikament vermitteln (Guo

*et al.*, 2012). Nanopartikel können darüber hinaus auch durch passives *Targeting*, z.B. über Milieu-abhängige Freigabe des Cargos (Therapeutikum), gezielt freigesetzt werden. Beispiel für ein passives *Targeting* wäre eine pH-Wert abhängige Freigabe des Cargos in entartetem, angesäuertem Tumorgewebe (Qian *et al.*, 2012). Ein schlecht funktionierendes *Targeting* birgt jedoch weiterhin die Gefahr, dass auch gesundes Gewebe angegriffen wird, daher versucht man für ein verbessertes *Targeting* vor allem biologische Nanomaterialien zu nutzen. Ein erfolgreiches *Targeting* innerhalb eines komplexen Organismus, und damit ein minimiertes Gesundheitsrisiko, sind auch von weiteren Faktoren abhängig. Zunächst ist die Art der Verabreichung entscheidend, so können Nanopartikel wie andere Medikamente oral, intravenös, transdermal oder pulmonal verabreicht werden (Yildirimer *et al.*, 2011; Abbildung 4b). Bei oraler oder intravenöser Gabe kann ein Großteil der Partikel durch die Leber abgefangen werden, weswegen eine Gabe höherer Dosen notwendig sein könnte. Im Hinblick auf klinische Anwendungen, wie der Krebstherapie rangieren daher biokompatible Nanobiomoleküle oder bioabbaubare Nanopartikel (Kumari *et al.*, 2010) in der Beliebtheit weit oben, und unter diesen wiederum nehmen, aufgrund ihrer positiven Eigenschaften, Nanopartikel aus DNA eine Spitzenstellung ein.



**Abbildung 4: Aufnahme und Wirkungswege von Nanopartikeln in therapeutischer Anwendung oder bei ungewollter Aufnahme von cytotoxischen Nanomaterialien**

a) Tritt ein Nanopartikel in ein verändertes Milieu, beispielsweise ein biologisches Umfeld ein, können sich Moleküle aus der Umgebung, z.B. Proteine (blau), aufgrund der typischen Beschaffenheit der Nanopartikeloberfläche zu einer Schicht, genannt Corona, anlagern (Rahman *et al.*, 2013). Diese Molekülschicht kann fest an die Oberfläche gebunden sein oder nur locker mit dieser wechselwirken. Je nach Beschaffenheit der ursprünglichen Oberfläche oder der Corona, kann die Anlagerung an die Zelloberfläche oder der Eintritt des Nanopartikels in das Zellinnere ermöglicht, erleichtert oder erschwert werden. Bereits außerhalb können cytotoxische Nanopartikel durch Anlagerung oder Wechselwirkung mit der Zellmembran diese schädigen oder verändern, was einen Zelltod oder Probleme bei der Proliferation bewirken kann. Intrazellulär über Endocytose eingedrungene Partikel können im Cytosol akkumulieren oder in Zellorganellen, wie Mitochondrien, Lysosomen, den Zellkern oder in den Golgi-Apparat vordringen. Je nach Zellorganell können sie unterschiedliche Mechanismen bewirken. Im Zellkern vorliegende Nanopartikel können mit der DNA interagieren, diese schädigen oder gezielt verändern. Im Golgi-Apparat kann die Proteinfaltung behindert werden oder oxidative Schäden an Proteinen entstehen. Mitochondrien und Lysosomen können durch eingedrungene Nanopartikel so stark beschädigt werden, dass es zu einem vermehrten Abbau und schließlich zur Apoptose der Zelle kommt.

b) Therapeutisches, aber auch biotoxisches Nanomaterial kann über mehrere Wege den Organismus erreichen. So können Nanopartikel in Form von Feinstäuben oder Aerosolen über die Atemwege und Schleimhäute eindringen. Eine orale oder intravenöse Gabe ist vor allem für therapeutische Anwendungen denkbar. Um einen Umweg über die stark durchbluteten Organe und somit ungewollte Anreicherung von Nanopartikeln in diesen, wie Lunge, Leber und Gehirn zu verhindern und zu gewährleisten, dass eine ausreichende Menge Therapeutikum den Zielort erreicht, bietet sich auch eine lokale Injektion in das entsprechende Gewebe oder eine transdermale Gabe in unmittelbare Nähe des Zielgewebes an. Auch dies birgt jedoch in geringerem Umfang die Gefahr eines Eindringens über Lymphe und Blut in den systemischen Kreislauf. In Geweben akkumulierte Nanomaterialien können aufgrund einer erhöhten Konzentration Dosis-abhängige cytotoxische Wirkung entfalten.

## 1.7 Biomoleküle in der Nanotechnologie

Die Bedeutung von Biomolekülen in der Nanotechnologie wird immer größer, da sie aufgrund ihres Ursprungs häufig eine starke Biokompatibilität gewährleisten und so auch für pharmazeutische Zwecke einsetzbar sind. Diesen Teilbereich der Nanotechnologie bezeichnet man auch als Nanobiotechnologie, wobei man vor allem versucht durch Nachahmung der Natur neue Techniken zu etablieren (Biomimikry). Bionanomoleküle können beispielsweise, im Gegensatz zu nichtbiologischen Materialien, wie die häufig in der Nanotechnologie eingesetzten Edelmetalle, vom Organismus abgebaut werden. Sie akkumulieren daher nicht dauerhaft in Geweben, was die Gefahr von gesundheitlichen Komplikationen minimiert. Die häufigsten Biomoleküle in der Nanotechnologie entsprechen den kleinsten Baueinheiten der lebenden Zelle, diese sind unter anderem Aminosäuren, aus diesen bestehende Proteine, Nukleinsäuren, Fettsäuren oder Lipide. Einige dieser Bauelemente verfügen hierbei über eine spezielle Eigenschaft, die sie für die Nanotechnologie wertvoll macht. Dies ist die Fähigkeit zur Selbstassemblierung. Die Grundlage des Lebens selbst basiert auf der Eigenschaft von biologischen Einheiten sich selbst zu replizieren und zu organisieren. Dies macht man sich in der Nanotechnologie im sogenannten *Bottom-up*-Verfahren zunutze, bei dem eben diese molekularen Grundbausteine sich selbst zu Komplexen in Nanogröße organisieren. Demgegenüber steht der *Top-down*-Ansatz, bei welchem größere Einheiten im Mikromaßstab zu kleineren Einheiten im Nanomaßstab abgebaut werden. Oft finden auch bereits *in vivo* etablierte Strukturen in der Nanobiotechnologieforschung Verwendung. Hier lassen sich Proteine und Proteinkomplexe für die Nanobiotechnologie nutzen, und so konnte bereits erfolgreich ein Tetraeder aus Polypeptiden hergestellt werden (Gradišar *et al.*, 2013). Weiterhin finden mittlerweile auch Mikrotubuli und Aktinfilamente, ursprünglich Bestandteile des Cytoskeletts (Nick und Opatrny, 2014), immer häufiger Einsatz, beispielsweise als intrazellulärer Antrieb für Nanopartikel (Ng *et al.*, 2009) oder in Kombination mit Kinesin und Dynein in einem *in vitro gliding assay* (Yokokawa *et al.*, 2008). Darüber hinaus werden auch Lipid-basierende Strukturen wie Micellen und Liposomen vor allem für therapeutische Anwendungen immer interessanter (Kraft *et al.*, 2014). Weiterhin können Biomoleküle (z.B. Lipide) auch als Bestandteile von selbstorganisierenden Monoschichten (engl. *self-assembled monolayer*, SAM) eingesetzt werden (Mashaghi *et al.*, 2013). Eine denkbare Ergänzung pharmazeutisch nutzbarer Nanopartikel stellt die Modifikation durch biologische Stoffe dar. Ein solches Konzept wird beim „Thrombozyten-Mimikry“ verfolgt, wobei eine einseitige

unilamellare Membranschicht die Nanopartikel vermehrt vor der Erkennung durch das Immunsystem schützt und Thrombozyten-ähnliches Verhalten, wie beispielsweise die Adhäsion an verletzte Blutgefäße, vermittelt (Hu *et al.*, 2015). Weiterhin können Nanopartikel nicht nur intrazellulär wirken, sondern bei längerer Persistenz im Blutkreislauf auch hier eine spezifische Aufgabe erfüllen, beispielsweise als Filter für toxische Stoffe bei Blutvergiftung (Hu *et al.*, 2013).

### 1.7.1 DNA-basierende Nanomaterialien

Auch Nukleinsäuren, vorrangig DNA, finden sich immer häufiger in nanotechnologischen Ansätzen. So lassen sich bereits heute molekulare Schalter, auf Basis von DNA-Sekundärstrukturen, herstellen (Mao *et al.*, 1999; Yurke *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2003; Sherman und Seeman, 2004; Ouldrige *et al.*, 2013). Neben der natürlichen Kodierung der erblichen Information durch die Basenabfolge zeigten Veröffentlichungen, dass es nun möglich ist diese Kodierung zu nutzen, um exemplarisch Bücher, Tonaufnahmen, Javascript-Programme oder Bilddateien in Form von DNA umzuschreiben und anschließend fehlerfrei zu rekonstruieren (Church *et al.*, 2012; Goldman *et al.*, 2013). Dies zeigt die enorme Speicherkapazität des Moleküls und lässt Raum für zukünftige, ähnliche Anwendungen, die vor allem eine hohe Speicherkapazität bei niedrigem Rohstoff- und ausgesprochen geringem Platzbedarf ermöglicht. Mit einem Kubikmeter DNA konnte die maximale Datenspeichermenge von 5,5 Petabyte erreicht werden (Church *et al.*, 2012). Ein weiterer Vorteil ist die Stabilität des DNA-Moleküls über mehrere Hundert bis Millionen Jahre bei entsprechenden Bedingungen, beispielsweise eingebettet in eine Kieselsäurematrix (Grass *et al.*, 2015).

Eine dynamische und steuerbare Konformationsänderung eines DNA- oder RNA-Moleküls wiederum birgt die Möglichkeit eines molekularen Motors. Diesen Forschungsbereich umfasst die Bioelektronik, ein Teilbereich der Nanotechnologie, bei der auch weitere Biomoleküle wie Enzyme zum Einsatz kommen können. Ein Beispiel hierfür ist ein einfacher Biocomputer bestehend aus den zwei Enzymen T4 DNA Ligase und der Nuklease *BbvI* als Hardware, sowie DNA-Doppelsträngen als Software (Soreni *et al.*, 2005). Ein logisches Gatter (engl. *logic gate*), bestehend nur aus DNA, konnte ebenfalls verwirklicht werden (Seelig *et al.*, 2006).

Eine weitere Grundidee der DNA-Nanotechnologie stellt die Herstellung von sich selbst assemblierenden, idealerweise funktionalisierten, hochmolekularen und periodischen, zwei- oder dreidimensionalen Netzstrukturen dar. Bereits Nadrian Seeman verfolgte diesen Gedanken

und entwarf ein Modell aus dreidimensional miteinander verbundenen DNA-Doppelsträngen und veröffentlichte Anfang der Neunziger eine erste DNA-basierte supramolekulare Struktur (Chen und Seeman, 1991). Auch zweidimensionale, periodische Kristalle aus DNA ließen sich über Selbstassemblierung herstellen (Zhang *et al.*, 2007).

### 1.7.1.1 DNA-Strukturen in der Nanomedizin

Im Hinblick auf therapeutische Anwendungen von dreidimensionalen DNA-Strukturen steht vor allem auch die Idee im Vordergrund, Medikamente oder therapeutische Proteine innerhalb dieser DNA-Strukturen zu verkapseln und somit geschützt und mit erhöhter Effektivität in lebende Zellen einzubringen. Ein erster Schritt in diese Richtung war ein DNA-Würfel (Chen und Seeman, 1991), weitere dreidimensionale Strukturen aus DNA folgten. So konnten unter anderem auch ein DNA-Oktaeder (Zhang und Seeman, 1994) und ein DNA-Tetraeder (Goodman *et al.*, 2004) etabliert werden. Durch enzymatische Prozessierung lassen sich solche Strukturen auch kovalent verknüpfen (Goodman *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2008). Eine Erweiterung dieses Modells stellen Röhren und Kugeln dar, deren Baueinheiten ebenfalls DNA-Doppelstränge darstellen, welche über *Four-Way-Junctions* miteinander, in dreidimensionaler Form verknüpft sind (Han *et al.*, 2013). Ein DNA-Würfel (Andersen *et al.*, 2009), ein DNA-Tetraeder (Ke *et al.*, 2009) und ein DNA-Oktaeder (Shih *et al.*, 2004) konnten auch mittels der DNA-Origami-Methode verwirklicht werden, wobei der Würfel zusätzlich über einen molekularen Schlüssel aus DNA-Strängen zu öffnen und zu schließen ist. Diese DNA-Origami-Methode (Rothenmund, Paul W K, 2006) basiert auf der Assemblierung eines einzelsträngigen Genoms des Bakteriophagen M13 und kleiner, komplementärer, künstlicher DNA-Stränge, was zu einer spezifischen Faltung des genomischen Strangs führt. Eine Erweiterung dieser Methode stellt die Herstellung von Zahnrädern, Ringen und anderen komplexeren Strukturen dar, an welche zudem Proteine angelagert werden können (Dietz *et al.*, 2009; Saccà *et al.*, 2010). Durch den Einsatz künstlicher Elemente bieten sich darüber hinaus weitere Möglichkeiten zur Herstellung von DNA-Käfigen in Nanogröße, beispielsweise die Herstellung eines Dodekaeders aus Trisoligonukleotiden (Zimmermann *et al.*, 2008) oder ein variables System an DNA-Kristallen, die durch den Einsatz von starren, organischen *Linker-Molekülen* gebildet werden (Aldaye und Sleiman, 2007). Ein Tetraeder, ein Oktaeder und ein Ikosaeder konnten weiterhin mit Hilfe von an DNA-Stränge gebundene Avidin- und Streptavidin-Moleküle aufgebaut werden (Zhang *et al.*, 2012). Dies ist darüber hinaus auch ein Schritt zur Funktionalisierung der DNA-Nanobausteine mit weiteren Biomolekülen (z.B.

anderen Nukleinsäuren, Lipiden, Peptiden oder Proteinen). Sie können die entsprechende Nanostruktur auf diese Weise nicht nur als Trägermatrix, sondern als reaktiven Nanopartikel einsatzfähig machen. Auch das gezielte *Targeting* von Tumorzellen kann durch Kombination von DNA mit Biomolekülen unterstützt werden, so können z.B. Lipide in Kombination mit DNA den Transport zur Tumorzelle erleichtern (Morille *et al.*, 2010).

### 1.7.1.2 Funktionalisierte DNA-Tetraeder

Diese Arbeit beschäftigt sich mit reinen Strukturen aus DNA in Nanogröße, die aufgrund ihrer chemischen Komponenten weitaus leichter und kostengünstiger zu synthetisieren sind und auch, im Gegensatz zu vielen Hybridmolekülen, vollständig biokompatibel und bioabbaubar sind. Dennoch sollen auch diese Strukturen eine ausreichende Stabilität gewährleisten, was nicht nur durch die Ausbildung eines Doppelstrangs erreicht wird, sondern effektiver durch die kovalente Verknüpfung der DNA-Stränge. Dies ist heutzutage relativ einfach durch den Einsatz von DNA-modifizierenden Enzymen, den Ligasen, möglich. Gerade im biologischen Einsatzbereich, zum Beispiel als pharmazeutisch verwendeter Bestandteil von Therapeutika, vermittelt die kovalente Verknüpfung eine hohe Resistenz gegenüber Nukleasen innerhalb eines lebenden Organismus. Dies konnte bereits für kovalent geschlossene Tetraeder intrazellulär, sowie in Blut und Lymphe gezeigt werden (Walsh *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013a; Kim *et al.*, 2013b). In der Vergangenheit erwiesen sich DNA-Tetraeder als vielseitig nutzbare Nanostrukturen für den nanotechnologische Einsatz *in vivo*. Auch eine mögliche Anwendung als Marker innerhalb von lebenden Geweben konnte etabliert werden (Kim *et al.*, 2013b). Eine Multimerisierung dieser kovalent geschlossenen Tetraeder ist bisher allerdings nur über unspezifische Methoden möglich. Dazu zählen beispielsweise die Einbettung in ein poröses Material (Simmons *et al.*, 2011), die unspezifische Aggregation mit Hilfe eines kovalent verbundenen Polymers (Wilks *et al.*, 2013), sowie die Verknüpfung unter Verlust des kovalent geschlossenen Systems (Xing *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2014), wodurch bei letzterem die hohe Stabilität verloren geht. Die in dieser Arbeit verwendeten *Hairpins*, als ursprünglich natürlich vorkommende Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren, weisen dahingegen eine an sich bereits geschlossene Form auf, bieten aber einen einzelsträngigen Bereich (*Loop*), der sich zur weiteren Hybridisierung über Ausbildung von Basenpaaren nutzen lässt. Dieses bereits im Vorfeld erläuterte *Kissing-Loop-Annealing* zweier sich paarender, einzelsträngiger *Loops* (siehe auch Kapitel 1.5) kann darüber hinaus über verschiedene Umwelt-Einflussfaktoren gesteuert werden. Eine erfolgreiche Modifikation durch kleine

*Hairpin*-Strukturen an nicht kovalent geschlossenen DNA-Tetraedern konnte bereits gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2010).

Auch der Einsatz solcher mit *Hairpin*-Strukturen funktionalisierter Tetraeder zur Verkapselung von Nanopartikeln ist denkbar. Der Einschluss von Nanomaterialien innerhalb von DNA-Polyeder konnte, z.B. in Form von in Ikosaedern eingeschlossenen Goldpartikeln (Bhatia *et al.*, 2009), bereits verwirklicht werden. Dabei könnten *Hairpin*-Strukturen eine Möglichkeit bieten, die in Polyedern verkapselten Partikel gezielt wieder zu entlassen. Eine temperaturabhängige Verkapselung und Freilassung aus einem Polyeder gelang erstmal 2013, wobei einzelsträngige Bereiche in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur *Hairpin*-Strukturen bildeten und so einen Verschluss des Polyeders ermöglichten (Juul *et al.*, 2013). Eine erfolgreiche Verknüpfung von DNA-Tetraedern über *Kissing-Loop*-Bindungen würde einerseits eine Möglichkeit zur Multimerisierung, als auch die Nutzung dieser zur gezielten Verkapselung und Freilassung von Cargos bieten.

## 1.8 Zielsetzung

Die Nanotechnologie spielt eine immer größere Rolle in der Medizin und Technik. Vor allem für pharmazeutische Anwendungen gewinnen auch Nanostrukturen aus rein biologischen Materialien wie der DNA immer größere Bedeutung. In dieser Arbeit sollten DNA-Tetraeder als Grundelemente verwendet werden, die bei vergleichsweise einfacher Synthese eine dreidimensionale Struktur aufweisen. Diese Tetraeder sollten durch DNA-Sekundärstrukturen so funktionalisiert werden, dass sie zu einer sequenzabhängigen Hybridisierung fähig sind. Hierfür sollten *Hairpin*-Strukturen verwendet werden, welche über ihre einzelsträngigen *Loop*-Bereiche hybridisieren können (*Kissing-Loop-Annealing*). Im Weiteren sollte untersucht werden, ob durch Verwendung zweier unterschiedlicher *Loop*-Sequenzen zwei Tetraeder über *Kissing-Loop-Annealing* ein Dimer bilden können. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob auch nach Funktionalisierung durch weitere *Hairpin*-Strukturen *Kissing-Loop*-Komplexe gebildet werden können, und in welcher Weise sich die Anzahl und Position der *Hairpin*-Strukturen auf die Struktur der entstehenden Komplexe auswirkt. Darüber hinaus sollten weitere Einflussfaktoren auf die *Kissing-Loop*-Bildung und die Stabilität der entstanden Komplexe identifiziert werden. Hierfür sollte die Stabilität dieser *Kissing-Loop*-Komplexe in Abhängigkeit von der Temperatur, sowie in Anwesenheit verschiedener zweiwertiger Kationen untersucht werden. In einem weiteren Experiment sollte die Möglichkeit getestet werden, ob entstehende *Kissing-Loop*-Dimere aus Tetraedern gezielt, durch Verwendung eines *Capping*-Oligonukleotids, aufgelöst werden können. Durch Einsatz von nicht vollständig komplementären *Loop*-Sequenzen (*Mismatch*-Sequenzen) sollten außerdem erste Erkenntnisse über die *Loop*-Bereiche gewonnen werden, die an einem *Kissing-Loop-Annealing* teilnehmen und für die Stabilität der Hybridisierungsprodukte elementar sind.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

Im Folgenden werden ausschließlich Materialien und Geräte aufgeführt, welche nicht in einer Standardlaboreinrichtung enthalten sind oder im Versuchsverlauf einen spezifischen Einfluss auf die Entstehung der Ergebnisse hatten oder unter Verdacht stehen, diese beeinflusst zu haben.

#### 2.1.1 Geräte

##### PAGE-Gelelektrophorese-Kammern mit Zubehör

Kühlapparaturen Julabo F10+ C – Julabo

Kühlfinger FT 660 – Julabo

Whatman Multigel-Long – Biometra

Spannungsgerät – VWR Power Source 300 V

Spannungsgerät – Power Pac 300 – BioRad Laboratories

##### Konzentrationsbestimmung und Gelfärbung

NanoDrop ND-1000 – PeqLab

Blaulichttisch – Lonza

#### 2.1.2 Software und Webserver

ChemBioDraw Ultra, Version 12.0 – CambridgeSoft

CoralDraw Graphics Suite X5 – Corel Corporation

GIMP (GNU Image Manipulation Program) Version 2.6.8 – GIMP

AIDA Image Analyzer 4.5 – Raytest

ImageJ, Version 1.48 – Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

Oligo Analyzer 3.1 – DNA Technologies, Inc.

OligoCalc, Version 2.36 – Northwestern University

NUPACK nucleic acid package – NUPACK web server USA

### 2.1.3 Chemikalien

#### Polyacrylamidelektrophorese

30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5 : 1 – Rotiphorese, Carl Roth

40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 19,0 : 1 – Rotiphorese, Carl Roth

(Die Acrylamid-Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und anschließend mit Mischbett-Ionenaustauscher TMD-8 (Sigma-Aldrich) versetzt, Lagerung bei 4°C.)

APS (Ammoniumpersulfat)-Lösung 10 % (w/v) in ddH<sub>2</sub>O

TEMED (= Tetramethylethyldiamin) – Serva Feinbiochemica

Harnstoff – Applichem

#### Elektrophorese-, Reaktions- und Annealingpuffer

TBE-Puffer 10 x (890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0)

TM-Puffer 10 x (100 mM Tris, 50 mM Magnesiumchlorid, pH 8)

TMA-Puffer 10 x (400 mM Tris-HCl, 100 mM Magnesiumchlorid, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7.8)

TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer 10x (400 mM Tris, 190 mM Essigsäure, 10 mM EDTA and 125 mM Magnesiumacetat, pH 8)

TA-Puffer 1 X (40 mM Tris, 19 mM Essigsäure)

Nach Bedarf enthielt der TA-Puffer 0,625 mM, 1,25 mM oder 11,5 mM Zinkchlorid (ZnCl<sub>2</sub>), Magnesiumacetat (MgAc<sub>2</sub>), Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) oder Kaliumchlorid (KCl), der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7 titriert.

Quick Ligation Reaction Buffer – New England BioLabs

#### Silbernitratfärbung

Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>) – Carl Roth

Formaldehyd, 37 % – Carl Roth

Natriumhydroxid-Plättchen (NaOH) – Carl Roth

#### weitere Hybridisierungs- und Enzympuffer

Magnesiumacetat, 1 M Stocklösung, aus Feststoff – Carl Roth

Kaliumchlorid, 1 M Stocklösung, aus Feststoff – Carl Roth

Zinkchlorid, 1 M Stocklösung, aus Feststoff – Carl Roth

Calciumchlorid, 1 M Stocklösung – Carl Roth

10x T4 Ligasepuffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) – Thermo Scientific  
 2x Quick-Ligasepuffer – New England BioLabs  
 NEBuffer 1–4 – New England BioLabs

### Ladepuffer

denaturierender 1 x Ladepuffer

(89 mM Tris HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 12% Ficoll, 0,01% Bromphenolyblau, 0,02% Xylene-Cyanol FF)

nativer 5 x Ladepuffer

(25 % Glycerin, 0.2 % Bromphenolblau, 0.2 % Xylene-Cyanol FF, 50 mM Tris-HCl pH 8)

Der native Ladepuffer wurde durch Zugabe von 10-fach konzentriertem TA-Puffer (nach Bedarf 0,625 mM, 1,25 mM oder 11,5 mM Zinkchlorid (ZnCl<sub>2</sub>), Magnesiumacetat (MgAc<sub>2</sub>), Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) oder Kaliumchlorid (KCl) auf die gewünschte Ionenkonzentration gebracht. Hierfür wurden die jeweiligen Stocklösungen verwendet.

### Fluoreszenzfarbstoff

GelStar© – Lonza

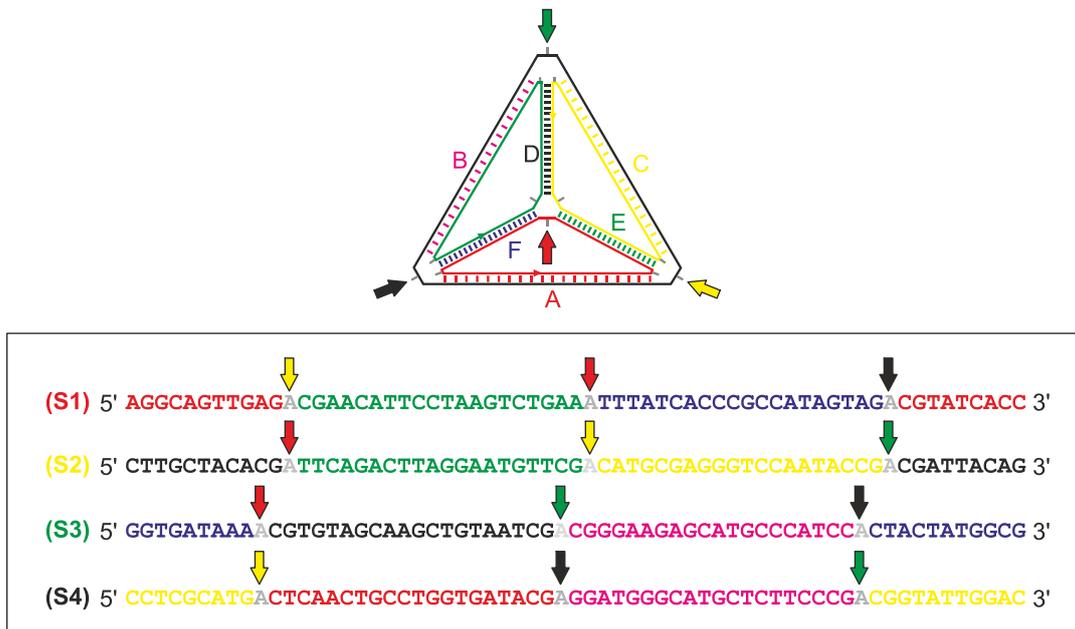
## **2.1.4 Marker für die Gelelektrophorese**

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder – Thermo Scientific  
 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder – Thermo Scientific  
 GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder – Thermo Scientific

## **2.1.5 Enzyme**

T4 Polynukleotidkinase – New England Biolabs  
 T4 Ligase, Thermo Scientific  
 Exonuklease III (ExoIII) – New England Biolabs  
 Restriktionsenzyme – New England Biolabs: DdeI, ScrFI, AluI  
 Restriktionsenzyme – Thermo Scientific: FatI  
 Proteinase K, Stocklösung 20 µg/µl in ddH<sub>2</sub>O – Thermo Scientific

## 2.1.6 Oligonukleotidsequenzen



**Abbildung 5: DNA-Tetraeder nach Goodman *et al.* (2005).**

Große farbige Pfeile zeigen die jeweils möglichen Positionen zur Modifikation mit zusätzlichen Stamm-Loop-Sequenzen innerhalb der DNA-Sequenzen und am resultierenden DNA-Tetraedermolekül. Diese können innerhalb eines der vier verwendeten Oligonukleotide auf Seite des 5'-Endes (5'), in der Sequenzmitte (zentral) oder auf der Seite des 3'-Endes eingefügt werden (3'). Die Stamm-Loop-Strukturen befinden sich, nach Assemblierung, an den Ecken des Tetraeders, wobei jeder Ecke andersfarbige Pfeile (rot, gelb, grün, schwarz) zugeordnet wurden. Durch Vergleich des Tetraedermodells und der DNA-Sequenzen wird deutlich, dass eine Modifikation der gleichen Tetraeder-Ecke durch Veränderungen an 3'-Positionen innerhalb jeweils verschiedener DNA-Stränge stattfinden kann. Im Original-Tetraeder werden die Ecken durch nicht hybridisierte, freie Adenin-haltige Nukleotide gebildet (A, grau). Im modifizierten Tetraeder werden diese durch eine Stamm-Loop-Sequenz und zwei, den Stamm flankierende Adenin-Nukleotide ersetzt. Die einzelnen DNA-Sträng im Tetraedermodell sind jeweils durch eine Farbe hervorgehoben (S1 = rot, S2 = gelb, S3 = grün, S4 = schwarz), Pfeile im Strang markieren die Position der Strangenden, sowie die Direktionalität der Stränge in 5'-3' Richtung. Auch die jeweiligen doppelsträngigen Tetraeder-Kanten (A-F) wurden farblich markiert (rot, pink, gelb, schwarz, grün, blau) und im Schaubild als schraffierte Fläche dargestellt.

Die Herstellung eines DNA-Tetraeders erforderte vier Oligonukleotide, S1–S4 (Goodman *et al.*, 2005). Diese wurden für ein erweitertes Design durch zusätzliche Stamm-Loop-Sequenzen modifiziert (Abbildung 5). Als Stamm-Loop-Sequenz wurden unter anderem bereits in vorangegangenen Studien untersuchte *Hairpin*-Strukturen verwendet (*Hairpin*-Sequenz 1 (HP 1) und *Hairpin*-Sequenz 2 (HP 2); Bois *et al.*, 2005). Die Oligonukleotidsequenz dieser *Hairpin*-Strukturen bestand aus 40 Nukleotiden, wobei die jeweils zehn äußeren Nukleotide in zueinander komplementärer Sequenz vorkamen, hierdurch konnten sie miteinander hybridisieren. Die durch die Ausbildung des Stammbereichs gebildete einzelsträngige Loop-Sequenz umfasste 20 Nukleotide, wobei die Loop-Sequenz von HP 1 zu der von HP 2 komplementär war. Weitere verwendete *Hairpin*-Strukturen wiesen eine zu HP 1 und HP 2

veränderte *Loop*-Sequenz auf (*Hairpin*-Sequenz 3 (HP 3) und *Hairpin*-Sequenz 4 (HP 4)). HP 3 und HP 4 waren darüber hinaus ebenfalls im *Loop*-Bereich vollständig komplementär zueinander. Sowohl HP 1, HP 2, HP 3 und HP 4 wiesen einen sechs Nukleotide langen A/T-reichen Bereich am 5'-Ende und einen sechs Nukleotide langen G/C-Bereich am 3'-Ende der *Loop*-Sequenz auf. Der zentrale *Loop*-Bereich weicht hiervon ab und besteht aus einer heterogenen Zusammensetzung von Purin- und Pyrimidinbasen.

Für die *Strand Displacement*-Versuche wurde ein *Capping*-Oligonukleotid (aus dem Englischen für ‚abdecken‘) verwendet, welches die zu HP1 komplementäre 20 nt-*Loop*-Sequenz von HP 2 zweimal aufwies, wobei diese durch eine Poly(dT<sub>40</sub>)-Sequenz voneinander separiert waren.

Die Charakterisierung der für eine *Kissing-Loop*-Hybridisierung wichtigen *Loop*-Sequenz wurde mittels *Mismatch-Loop*-Sequenzen durchgeführt. Hierfür wurden vier *Hairpin*-Sequenzen designt, die, ausgehend von *Hairpin*-Sequenz HP 1, jeweils im A/T-reichen, im G/C-reichen und im zentralen *Loop*-Bereich eine sechs Nukleotide lange *Mismatch*-Sequenz aufweisen. Eine Basenpaarung zwischen der veränderten *Loop*-Sequenz mit der von HP 2 war auf diese Weise in den entsprechenden Bereichen nicht mehr möglich. Zum Design der *Mismatch*-Sequenz wurden jeweils Pyrimidinbasen (C ↔ T) oder Purinbasen (A ↔ G) gegeneinander ausgetauscht. Durch diesen Austausch wurde aus der 5'-lateralen A/T-reichen Sequenz ein zweiter G/C-reicher Bereich (HP A), auch im 3'-lateralen GC-Bereich entstand so eine zweite A/T-reiche Sequenz (HP B). Die zentrale Region blieb durch den Nukleotidaustausch eine C/T-Sequenz (HP C), daher wurde eine weitere zentrale *Mismatch*-Sequenz getestet, welche durch Austausch von Pyrimidin- gegen Purinbasen (C ↔ A, T ↔ G) nun eine A/G-reiche Sequenz aufwies.

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firma Biomers (in lyophilisierter Form und über PAGE gereinigt) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben auf 100 pmol/μl verdünnt. Aliquots der Gebrauchslösung wurden jeweils mit einer Konzentration von 5 pmol/μl angesetzt und alle Lösungen bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt. Für alle Oligonukleotide wurden ausschließlich die vom Hersteller bereitgestellten Reaktionsgefäße verwendet oder die unter Verbrauchsmaterial aufgeführten LoBind-Tubes.

### 2.1.7 Weitere Verbrauchsmaterialien

Micro Bio-Spin<sup>TM</sup> Columns (0,8 ml bed volume) – Bio-Rad

DNA LoBind-Tubes, 1,5 ml-Reaktionsgefäße – Eppendorf

**Tabelle 2: Übersicht aller im DNA-Tetraeder verwendeten Oligonukleotide.**

Der Name des Oligonukleotids gibt dabei wieder, welche Originalsequenz nach Goodman *et al.*, 2005 verwendet wurde (S1–S4) und ob diese durch die *Hairpin*-Sequenz HP1–HP4, *Hairpin*-Sequenz A, B, C oder einen Poly(dT)-*Loop* modifiziert wurde. Ebenfalls wurde die Position der Modifikation aufgeführt. Alle mit Stern (\*) markierten Oligonukleotide wurden bereits phosphoryliert erworben. Die Basensequenz des *Loop*-Bereiches (rot) jeder *Hairpin*-Sequenz und der Stammbereich (blau) wurde jeweils kenntlich gemacht. Die *Mismatch*-Sequenzen der Oligonukleotide HP A, HP B und HP C sind hervorgehoben.

Oligonukleotide für die Assemblierung der DNA-Tetraeder			
Name	5'–3' Sequenz	Länge [nt]	HP-Position
<b>Oligonukleotide ohne Stamm-Loop-Strukturen</b>			
S1*	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAATTTATC ACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	63	-
S2*	CTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTTCGACATGCG AGGGTCCAATACCGACGATTACAG	63	-
S3*	GGTGATAAAACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAAG AGCATGCCCATCCACTACTATGGCG	63	-
S4*	CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGGATGGGC ATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	63	-
<b>Oligonukleotide mit <i>Hairpin</i>-Sequenz HP 1 und HP 2</b>			
S1-HP1*	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAAGCGTTG CTGCATTTTACTCTTCTCCCCTCGGCAGCAACGCATTTAT CACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	104	zentral
S1-HP2*	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAAGCGTTG CTGCCGAGGGGAGAAGAGTAAAATGCAGCAACGCATTT ATCACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	104	zentral
S2-HP1*	CTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTTCGAGCGTTGC TGCAATTTTACTCTTCTCCCCTCGGCAGCAACGCACATGCG AGGGTCCAATACCGACGATTACAG	104	zentral
S2-HP1(2)*	CTTGCTACACGAGCGTTGCTGCATTTTACTCTTCTCCCCT CGGCAGCAACGCATTCAGACTTAGGAATGTTTCGACATGC GAGGGTCCAATACCGACGATTACAG	104	5'
S2-HP2*	CTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTTCGAGCGTTGC TGCCGAGGGGAGAAGAGTAAAATGCAGCAACGCACATG CGAGGGTCCAATACCGACGATTACAG	104	zentral
S2-HP2(2)*	CTTGCTACACGAGCGTTGCTGCCGAGGGGAGAAGAGTAA AATGCAGCAACGCATTCAGACTTAGGAATGTTTCGACATG CGAGGGTCCAATACCGACGATTACAG	104	5'
S3-HP1(2)*	GGTGATAAAAGCGTTGCTGCATTTTACTCTTCTCCCCTCG GCAGCAACGCACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAA GAGCATGCCCATCCACTACTATGGCG	104	5'
S3-HP2(2)*	GGTGATAAAAGCGTTGCTGCCGAGGGGAGAAGAGTAAA ATGCAGCAACGCACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGA AGAGCATGCCCATCCACTACTATGGCG	104	5'
S4-HP1*	CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGCGTTGCT GCATTTTACTCTTCTCCCCTCGGCAGCAACGCAGGATGGG CATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	104	zentral
S4-HP2*	CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGCGTTGCT GCCGAGGGGAGAAGAGTAAAATGCAGCAACGCAGGATG GGCATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	104	zentral

Name	5'–3' Sequenz	Länge [nt]	HP-Position
<b>Oligonukleotide mit Hairpin-Sequenz HP 3 und HP 4</b>			
S4-HP 3	CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGCGTTGCT GCTTAAATTCTAGATCCGGCGCGCAGCAACGCAGGATGG GCATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	104	zentral
S4-HP 4	CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGCGTTGCT GCGCGCCGGATCTAGAATTTAAGCAGCAACGCAGGATGG GCATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	104	zentral
<b>Oligonukleotide mit Poly(dT)-Loop-Sequenz</b>			
S2-T poly-(dT)	CTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTTCGAGCGTTGCTG TGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGCAACGCACATGCGA GGGTCCAATACCGACGATTACAG	104	zentral
S2-T(2) poly-(dT)	CTTGCTACACGAGCGTTGCTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCAGCAACGCATTTCAGACTTAGGAATGTTTCGACATGCGA GGGTCCAATACCGACGATTACAG	104	5'
S3-T poly-(dT)	GGTGATAAAAGCGTTGCTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CAGCAACGCACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAAG AGCATGCCCATCCACTACTATGGCG	104	zentral
<b>Oligonukleotide mit Hairpin-Sequenz HP A, HP B, HP C und HP C2</b>			
S1-HP A	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAAAGCGTTG CTGCGCCCCGCTCTTCTCCCCTCGGCAGCAACGCATTTAT CACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	104	zentral
S1-HP B	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAAAGCGTTG CTGCATTTTACTCTTCTTTCTAGCAGCAACGCATTTATC ACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	104	zentral
S1-HP C	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAAAGCGTTG CTGCATTTTACCTCCTCCCCCTCGGCAGCAACGCATTTAT CACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	104	zentral
S1-HP C2	AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAAAGCGTTG CTGCATTTTACAGAAGACCCTCGGCAGCAACGCATTTA TCACCCGCCATAGTAGACGTATCACC	104	zentral
<b>Hairpin-Strukturen</b>			
HP1	GCGTTGCTGCATTTTACTCTTCTCCCCTCGGCAGCAACGC	40	-
HP2	GCGTTGCTGCCGAGGGGAGAAGAGTAAAATGCAGCAAC GC	40	-

**Tabelle 3: Übersicht aller sonstigen verwendeten Oligonukleotide.**

Für das *Strand Displacement-Annealing* (2.2.5.1) wurde ein lineares Oligonukleotid, das *Capping*-Oligonukleotid mit zur *Loop*-Sequenz komplementären Sequenz (rot) verwendet.

<b>Sonstige Oligonukleotide</b>		
Name	5'–3' Sequenz	Länge [nt]
<i>Capping</i> -Oligonucleotid	CGAGGGGAGAAGAGTAAAATTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAGGGGA GAAGAGTAAAAT	80

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung des DNA-Tetraeders

Zur Herstellung der Tetraeder aus reiner DNA wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Oligonukleotide kombiniert. Je vier Oligonukleotide (S1–S4) bilden einen unmodifizierten DNA-Tetraeder nach Goodman *et al.*, 2005. Nun konnten bis zu vier Originalstränge durch modifizierte Stränge ausgetauscht werden, und so Tetraeder mit bis zu vier zusätzlichen Stamm-*Loop*-Sequenzen erzeugt werden, die alle entweder die *Hairpin*-Sequenz 1 oder 2 aufwiesen. Alle Sequenzen wurden zuvor mit Hilfe entsprechender Software auf ungewollte Sekundärstrukturen überprüft. Die Hybridisierung (Assemblierung) der komplementären Bereiche erfolgte bei einer Gesamtkonzentration von 2  $\mu$ M DNA, wobei alle Stränge in equimolaren Mengen vorhanden waren. Als Hybridisierungspuffer wurde einfach-konzentrierter TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer verwendet. Zur Optimierung des geeigneten Hybridisierungspuffers für modifizierte Tetraeder wurden des Weiteren auch unter anderem, aus der Literatur bereits bekannte *Annealing*-Puffer für unmodifizierte Tetraeder getestet. Bei den getesteten Lösungen handelte es sich um einen TM-Puffer (Goodman *et al.*, 2005; Erben *et al.*, 2006; Leitner *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012) und TMA-Puffer (entspricht T4 Ligasepuffer, Thermo Scientific). Die Anlagerung der DNA-Stränge wurde durch einen Temperaturprogramm erreicht. Hierbei wurde zunächst für 2 min auf 95 °C erhitzt um die DNA-Stränge vollständig zu denaturieren. Ein anschließendes schnelles Abkühlen auf 4 °C innerhalb 1 min verursachte nun die Zusammenlagerung der Stränge zum vollständigen Tetraeder.

Kovalent verknüpfte Tetraeder ließen sich durch anschließende Ligation herstellen. Hierfür wurden zunächst bereits am 5'-OH-Ende phosphorylierte DNA-Stränge verwendet. Als Hybridisierungspuffer dient einfach-konzentrierter Quick-Ligationspuffer (Quick Ligation Reaction Buffer, New England BioLabs). Nach Assemblierung des Tetraeders konnte nun die T4 Ligase (0,5 Weiss units/ $\mu$ l) zugegeben werden und es wurde für 1 h bei 16 °C inkubiert. Um Reste der Ligase zu entfernen und die Proben mittels Gelanalyse analysieren zu können, musste ein Verdau mit Proteinase K durchgeführt werden. Dazu wurde 2  $\mu$ g/ $\mu$ l Enzym zugesetzt und 1 h bei 37 °C verdaut.

### **2.2.2 Kontrollverdau mit Exonuklease III und Restriktionsenzymen**

Zur Überprüfung, ob die Tetraeder korrekt assembliert und ligiert waren, konnte anschließend ein Kontrollverdau durchgeführt werden. Hierfür wurden die Tetraeder in einfach konzentriertem NEB-Puffer 1 mit ExoIII (1,5 units/ $\mu$ l) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Ein anschließender Proteinase K-Verdau mit 1  $\mu$ g/ $\mu$ l für 1 h bei 37 °C entfernte die Proteine und machte eine Gelanalyse möglich.

### **2.2.3 Gelextraktion kovalent verknüpfter DNA-Tetraeder**

Zur Aufreinigung der Ligationsprodukte wurden diese über Polyacrylamidgelelektrophorese von Nebenprodukten, Monomeren und Verdauprodukten separiert. Nicht mit ExoIII verdaute Proben konnten hierbei über denaturierende Gelelektrophorese (6 % TBE Urea-Gel) separiert werden. ExoIII-verdaute Produkte ließen sich auch auf nativen Gelen separieren (6 % TBE-Gel). Die Bande mit dem gewünschten Produkt konnte nun ausgeschnitten und das Polyacrylamid-Gelstück vorsichtig mit dem Skalpell zerkleinert werden. Mit ddH<sub>2</sub>O ließ sich das Produkt mittels Diffusion auswaschen. Der Überstand wurde über einen Mikro Bio-Spin-Filter gereinigt und der aufgereinigte Tetraeder gegebenenfalls anschließend durch Lyophilisation aufkonzentriert. Übermäßige Salzreste im Pellet konnten bei Bedarf mit eisgekühltem 70 % Ethanol ausgewaschen werden.

### **2.2.4 Kontrollverdau mit Restriktionsenzymen**

Um die Assemblierung zu einem vollständigen Tetraeder mit korrekter Paarung der Kanten zu gewährleisten, wurden ligierte und anschließend über Gelelektrophorese und Diffusion gereinigte Tetraeder mittels Restriktionsanalyse untersucht. Hierfür wurden jeweils Restriktionsenzyme gewählt, deren Schnittbereich in der Mitte einer Tetraederkante liegt: ScrFI = Kante A, Fat I = Kante B, DdeI = Kante E, AluI = Kante D (Abbildung 5). Einzel- und Doppelverdaue sollten so zu typischen Verdauprodukten (Ringe, Catenane, lineare Stränge) führen.

## 2.2.5 *Kissing-Loop-Annealing*

Das *Annealing* der *Loops* wurde durchgeführt, indem equimolare Mengen Tetraeder (insgesamt 2  $\mu\text{M}$ ) mit komplementären *Hairpin*-Sequenzen in einfach konzentriertem TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer auf Eis 5 min inkubiert wurden, abweichende *Annealing*-Bedingungen sind in den jeweils betreffenden Kapiteln im Detail aufgeführt. Nach Zugabe von nativem Ladepuffer wurden die Proben auf nativen 4 %-, 8 %- und 18 %-igen Polyacrylamidgelen (TAE/Mg<sup>2+</sup>) analysiert.

### 2.2.5.1 Auflösung einer *Kissing-Loop*-Struktur mittels *Capping*-Oligonukleotid

Um *Kissing-Loop*-Strukturen zwischen Tetraedern sequenzspezifisch auflösen zu können, wurden diese in verschiedenen Ansätzen mit einem *Capping*-Strang (Tabelle 2) inkubiert. Ziel war es, gezielt eine *Kissing-Loop*-Struktur, bestehend aus zwei miteinander hybridisierten 1-*Loop*-Tetraedern mit den komplementären *Loop*-Sequenzen HP 1 und HP 2, durch Bindung des *Capping*-Strangs an den Tetraeder mit *Loop*-Sequenz HP 1, aufzulösen. Zur Auflösung der *Kissing-Loop*-Strukturen wurde das *Capping*-Oligonukleotid für mindestens 25 min auf Eis oder bei 25 °C mit dem *Kissing-Loop*-Produkt inkubiert. Alle Kontrollen wurden ebenfalls unter diesen Bedingungen inkubiert. Als Kontrollen dienten das monomere *Capping*-Oligonukleotid und die monomeren Tetraeder mit HP 1 und HP 2, vor und nach Zugabe des *Capping*-Strangs. In einem weiteren zeitabhängigen Experiment wurde die Inkubationszeit auf 0,5 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 32 h und 48 h bei 25 °C erhöht. Für jedes Zeitintervall wurde sowohl eine Probe mit und ohne *Capping*-Oligonukleotid analysiert. In dem dazugehörigen Kontrollexperiment wurde unter gleichen Versuchsbedingungen und in denselben Zeitabständen auch der Komplex aus Tetraeder (HP 1) und hybridisiertem *Capping*-Strang mit dem konkurrierenden Tetraeder (*Loop*-Sequenz HP 2) inkubiert. Eine weitere Kontrolle enthielt keinen *Capping*-Strang und wurde 48 h inkubiert. In zusätzlichen Kontrollexperimenten wurden unter identischen Versuchsbedingungen weitere KL-Komplexe aus 2-*Loop*-, und 3-*Loop*-Tetraedern untersucht, die zugehörigen Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.3).

### 2.2.5.2 Einfluss der Temperatur auf das *Kissing-Loop-Annealing*

Zur Feststellung der Stabilität verschiedener *Kissing-Loop*-Komplexe mit variierender Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen pro Tetraeder, wurden diese bei unterschiedlichen Temperaturen auf Polyacrylamidgelen analysiert. Es wurden vier Temperaturstufen getestet: < 25 °C, 30–35 °C, 35–40 °C und 40–45 °C. Für die Feststellung, wie viel monomeres Tetraeder in *Kissing-Loop*-Produkt umgesetzt wurde, wurde die Monomerbande mittels ImageJ ausgewertet. Als

Null-Kontrolle dienten die jeweils unmodifizierten Tetraeder, welche keinen Umsatz zu *Kissing-Loop*-Produkt zeigten. Die Ergebnisse wurden anschließend in Diagrammen, die den Anteil an vorhandenem *Kissing-Loop*-Produkt zeigen, dargestellt. Die ermittelten Mittelwerte, die Standardabweichung und statistischen Tests basierten hierbei auf mindestens drei unabhängigen Analysen. Die auf die gewünschte Temperatur vortemperierten Proben mit equimolaren Mengen beider Tetraeder-Spezies (*Hairpin*-Sequenz 1 und 2), wurden nach Zugabe von Ladepuffer auf die entsprechend vortemperierten 4 %igen Polyacrylamidgele (TAE/Mg<sup>2+</sup>) geladen.

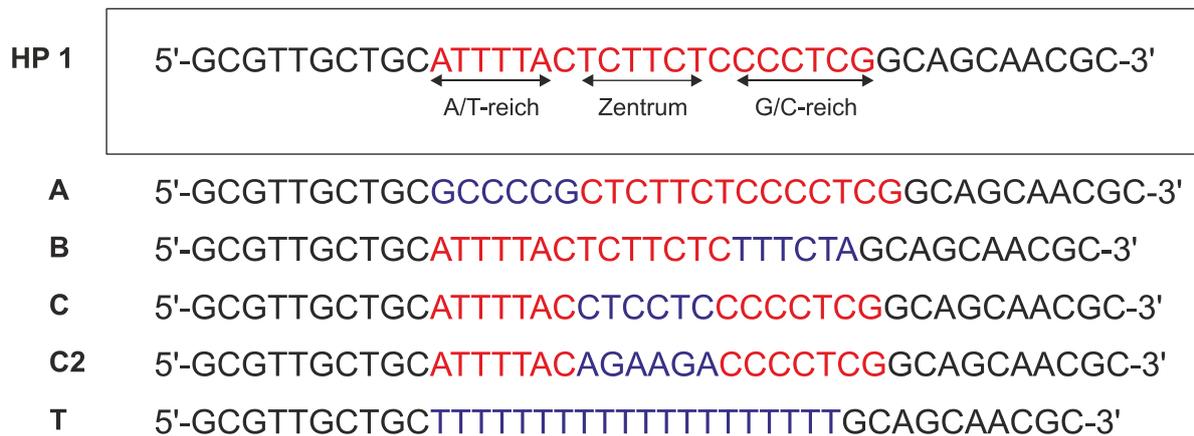
### 2.2.5.3 Einfluss der Ionenstärke auf das *Kissing-Loop*-Annealing

Ähnlich dem vorangegangenen Temperatur-Sensitivitätstest wurden verschiedene *Kissing-Loop*-Komplexe mittels Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Hierbei wurden alle Gele auf < 25 °C temperiert und nur die Ionenart- und -konzentration variiert. Für diesen Zweck wurden drei zweiwertige, positive Ionenarten (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) im Vergleich analysiert. Dabei wurden jeweils drei Ionenkonzentrationen getestet: 0,625 mM, 1,25 mM und 11,5 mM. Letztere Konzentration entspricht für Mg<sup>2+</sup> aus der Literatur bekannten Konzentrationen für DNA-*Kissing-Loop*-Hybridisierungen (Bois *et al.*, 2005). Der in den resultierenden Diagrammen dargestellte Mittelwert und die Standardabweichung der *Kissing-Loop*-Produkte, sowie die statistischen Tests beruhen auf mindestens drei unabhängigen Durchführungen. Als Null-Kontrolle dienten jeweils Gele ohne zugesetzte Ionen, wobei mittels ImageJ die Monomerbande ausgewertet wurde.

### 2.2.5.4 Charakterisierung der *Kissing-Loop*-Sequenz durch Verwendung von *Mismatch*-Sequenzen

Zur genaueren Analyse der Hybridisierungseigenschaften zweier im *Loop*-Bereich zueinander komplementärer Stamm-*Loop*-Strukturen, welche Teil jeweils eines funktionalisierten Tetraeders sind, wurden Tetraeder mit sich in ihrer *Loop*-Sequenz unterscheidenden Stamm-*Loop*-Strukturen hergestellt. Hierfür wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Oligonukleotide mit *Hairpin*-Sequenz A, B, C und C2, sowie T verwendet. Die Assemblierung erfolgte wie zuvor in Kapitel 2.2.1 aufgeführt, es erfolgte hierbei keine kovalente Verknüpfung. Das *Kissing-Loop*-Annealing fand unter den in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Standardbedingungen statt. Die veränderten Stamm-*Loop*-Strukturen wurden durch Austausch der pyrimidinhaltigen Nukleotide, sowie der purinhaltigen Nukleotide gegeneinander oder untereinander, innerhalb der *Hairpin*-Sequenz HP 1, erreicht. Ein Guanin (G) wurde somit durch ein Adenin (A) und

umgekehrt getauscht. Weiterhin wurden auch Thymin (T) und Cytosin (C) vertauscht. In der *Loop*-Sequenz C2 erfolgte jedoch ein Austausch von C durch A und T durch G. Die *Mismatch*-Sequenzen umfassten dabei sechs benachbarte Nukleotide im lateralen Bereich der *Loop*-Sequenz im 5'-OH-Bereich (*Loop* A), sowie im 3'-OH-Bereich (*Loop* B), wodurch das *Annealing* von *Loop* A in der ursprünglich A/T-reiche Sequenz und von *Loop* B in der ursprünglich G/C-reichen Sequenz, aufgrund fehlender Komplementarität zu *Hairpin*-Sequenz HP 2, unterbunden werden sollte. Durch *Mismatch*-Austausch im zentralen *Loop*-Sequenz (*Loop* C und *Loop* C2) konnte analog in diesem mittleren Sequenzbereich kein *Annealing* mit HP 2 mehr stattfinden. Als Negativkontrolle diente eine Poly(dT)-*Loop* mit 20 Thymin-haltigen Nukleotiden im *Loop* (*Loop* T). Durch anschließendes *Annealing* von modifizierten 1-*Loop*- und 2-*Loop*-Tetraedern mit einem Partnertetraeder mit *Loop*-Sequenz HP 2 sollte nun der Einfluss des veränderten Hybridisierungsbereichs auf das *Kissing-Loop-Annealing* ermittelt werden. Die Auswertung erfolgte über Polyacrylamidgelelektrophorese. Im Falle des 2-*Loop*-Tetraeders wurde nur einer der beiden Stamm-*Loop*-Strukturen verändert, der zweite *Loop* entsprach weiterhin der Originalsequenz HP 1.



**Abbildung 6: Modifizierte Hairpin-Sequenzen zur Charakterisierung der Hybridisierungsbereiche innerhalb der Loop-Sequenz für das Kissing-Loop-Annealing.**

Ausgehend von der Loop-Sequenz der Stamm-Loop-Struktur HP 1 wurden, durch Austausch von Guanin- und Adenin-haltigen Nukleotiden, sowie von Cytosin- und Thymin-haltigen Nukleotiden, gegeneinander, die Loop-Sequenzen A, B und C hergestellt. Die Loop-Sequenz C2 entstand durch Austausch von Cytosin-haltigen Nukleotiden gegen Adenin-haltige, sowie durch Austausch von Thymin- gegen Guanin-haltige Nukleotide. Loop A verlor durch die veränderte Nukleotidzusammensetzung seine Komplementarität zur Stamm-Loop-Struktur HP 2 im lateralen 5'-Bereich des Loops (sechs Nukleotide), welche ursprünglich den A/T-reichen Loop-Bereich darstellte. Loop B dagegen verlor seine Komplementarität zu HP 2 im lateralen 3'-Bereich des Loops (sechs Nukleotide), und damit den ursprünglich G/C-reichen Charakter dieses Bereiches. Loop C verlor durch den Basenaustausch die Komplementarität zum zentralen Loop-Bereich von HP 2, auch hier wurden sechs Nukleotide verändert. Der C/T-reiche Charakter der Sequenz blieb jedoch unverändert. Loop C2 wies im zentralen Bereich ebenfalls keine Komplementarität mehr zu HP 2 auf, allerdings wurde durch den Basenaustausch die C/T-reiche Zusammensetzung der Basen von einer A/G-reichen Sequenz ersetzt. Ein kompletter Austausch der Loop-Sequenz durch Thymin-haltige Nukleotide diente als Negativkontrolle (Loop T), da hierdurch die Komplementarität im gesamten Loop verloren ging. Die unveränderte Nukleotidsequenz im Loop von HP 1 ist in Rot dargestellt, verändert Nukleotide sind in blau eingefärbt.

## 2.2.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der Produkte wurden native und denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Hierzu diente das Whatman-Gelsystem der Firma Biometra. Die Glasplatten zur Herstellung der Gele wurden vor Verwendung mit 80 % Spiritus und Papier gesäubert und nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Die frisch gemischten Acrylamidlösungen wurden mittels 5 ml-Pipette langsam zwischen die Glasplatten gegossen, der Kamm für die Taschen wurde ebenfalls zuvor gereinigt und langsam in die gefüllten Kammern gesetzt. Dabei war darauf zu achten, dass keine störenden Luftblasen entstanden.

Als denaturierende Gele dienen 6-, 8- und 10-prozentige TBE-Gele mit 7,7 M Harnstoff. Der Harnstoff wurde hierzu vor Zugabe des Acrylamids im Wasser- und Pufferanteil gelöst (30–50 °C warmes Wasserbad) und anschließend 10 min im Exsikkator entgast. Zur Analyse der Kissing-Loop-Produkte wurden TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gele (Bois *et al.*, 2005) oder TA-Gele verwendet. Die TA-Gele enthielten für die Analyse zusätzlich nach Bedarf ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> oder KCl.

Höherprozentige Gele konnten nach vollständiger Polymerisierung sofort verwendet werden oder wurden bei Bedarf 1–3 Tage bei 4 °C oder Raumtemperatur gelagert. Gele mit unter 8 % Polyacrylamidanteil wurden über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer vollständig auspolymerisiert. Die elektrophoretische Trennung fand bei 250 V statt, ausschließlich die Elektrophorese von 18-prozentigen nativen TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gelen wurden bei 120 V durchgeführt. Hierfür wurden die Gele mit Glasplatten nach Entfernung des Dichtungsgummis in die Elektrophoresekammern eingebaut, die Kammern mit einfach konzentriertem Laufpuffer gefüllt und die Proben nach dem Ziehen der Kämmen in die Taschen pipettiert. Proben für denaturierende Gele wurden in einem Verhältnis 1:1 mit denaturierendem Ladepuffer (TBE Urea) versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und auf Eis schockgekühlt. Native Proben wurden mit einem Ladepuffer versetzt, der 25 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylene-Cyanol FF, 50 mM Tris-HCl, pH 8 enthält. Je nach Testverfahren wurden dem Laufpuffer 0,625 mM, 1,25 mM oder 11,5 mM MgAc<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> oder KCl zugesetzt.

**Tabelle 4: Rezepte für native Polyacrylamidgele.**

	4 %	8 %	18 %
<b>40 % Acrylamid (19,0: 1)</b>	1,6 ml	3,2 ml	7,2 ml
<b>10x Laufpuffer</b>	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	12,8 ml	11,2 ml	7,2 ml
<b>TEMED</b>	0,0075 ml	0,0075 ml	0,0075 ml
<b>10 % APS</b>	0,112 ml	0,112 ml	0,112 ml

**Tabelle 5: Rezept für ein denaturierendes Polyacrylamidgel.**

	6 %
<b>40 % Acrylamid (19,0: 1)</b>	3,35 ml
<b>10x Laufpuffer</b>	1,68 ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	7,81 ml
<b>TEMED</b>	0,0084 ml
<b>10 % APS</b>	0,084 ml
<b>gelöster Feststoff:</b>	
<b>Harnstoff</b>	6,96 g

### 2.2.7 Gelstar® -Färbung

Die Färbung der Gele für die Gelextraktion und den Schalenaufbau wurden mit dem Farbstoff GelStar® Nucleic Acid Stain (Lonza) gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich an Nukleinsäuren an und fluoresziert bei Anregung mit Blaulicht oder UV-Strahlung. Für die Färbung wurde 10 µl Farbstoff in 100 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Gele für 10 min in dieser Lösung gefärbt. Die gefärbten Gele wurden nach anschließendem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O mittels Blaulichttisch in einem abgedunkelten Raum mittels Kamera dokumentiert und ggf. die gewünschte

Produktbände für eine Gelextraktion ausgeschnitten. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes wurden dieser lichtgeschützt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.8 Silbernitrat-Färbung

Zur Färbung mit Silbernitrat wurde eine veränderte Version nach Sanguinetti *et al.*, 1994 verwendet. Hierfür wurden die Gele zunächst 5 min in Fixierlösung fixiert, um den Verlust durch Diffusion der Nukleinsäuren zu verhindern. Nach anschließendem zweimaligem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurde 6 min in Silbernitrat-Färbelösung gewaschen. Die Färbelösung wurde durch erneutes zweimaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt und die Gele in Entwicklerlösung entwickelt. Bei Erreichen der idealen Bandenintensität wurde die Entwicklung durch Austausch des Entwicklers gegen die benutzte Fixierlösung gestoppt und die Gele auf ein Glastablett überführt, Luftblasen zwischen Gel und Tablett wurden entfernt und das gefärbte Gel fotodokumentiert. Die Färbung basierte auf der Reaktion der Silberionen, welche sich auf Grund ihrer positiven Ladung vor allem an Nukleinsäuren im Gel anlagerten, mit dem formaldehydhaltigen Entwickler. Das durch die Reduktion entstehende metallische Silber wurde sichtbar und färbte die Nukleinsäuren von Gelb, über Rot bis Dunkelbraun.

**Tabelle 6: Übersicht der Lösungen für die Silbernitrat-Färbung.**

<b>Fixierlösung (1 Liter)</b>	895 ml ddH <sub>2</sub> O, 5 ml 100% Essigsäure, 100 ml EtOH 100%, pro Gel 100 ml Gebrauchsvolumen
<b>Färbelösung (1 Liter)</b>	0,75 g Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> ), 500 ml ddH <sub>2</sub> O, pro Gel 100 ml Gebrauchsvolumen mit 150 µl Formaldehyd (37%)
<b>Entwicklerlösung (1 Liter)</b>	15 g Natriumhydroxid (NaOH) in 1000 ml ddH <sub>2</sub> O, pro Gel 100 ml Gebrauchsvolumen mit 200 µl Formaldehyd (37%)

### 2.2.9 Statistische Auswertung

Für die Auswertung statistischer Daten wurde das Tabellenkalkulatorprogramm Excel (Microsoft-Office-Suite 2003) verwendet. Bei der Durchführung des t-Tests wurde das Signifikanzniveau wie in Tabelle 7 dargestellt festgelegt.

**Tabelle 7: Legende Signifikanzniveau.**

Wert für p	in Wort	Zeichenkürzel
$p > 0,05$	nicht signifikant	ns
$0,05 > p > 0,01$	signifikant	*
$0,01 > p > 0,001$	sehr signifikant	**
$p < 0,001$	höchst signifikant	***

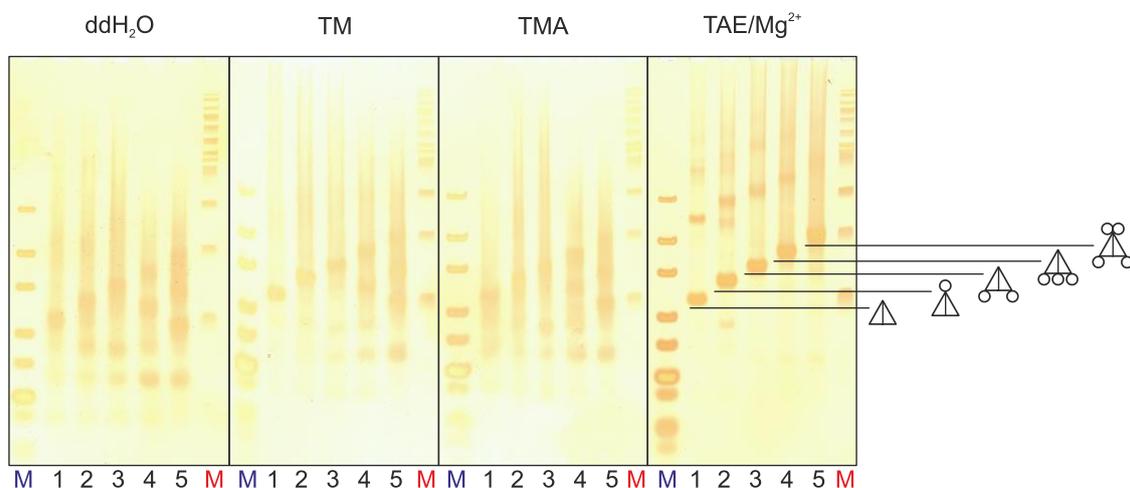
### 3 ERGEBNISSE

Tetraeder im Nanomaßstab, die durch eine Hybridisierung von vier DNA-Einzelstränge entstehen, wurden mit nach außen gerichteten DNA-*Hairpin*-Strukturen funktionalisiert. Eine Hybridisierung dieser funktionalisierten Tetraeder wurde anschließend über spezifisches *Kissing-Loop-Annealing* gewährleistet, wobei die Spezifität über die Hybridisierungssequenz im *Loop* erreicht wurde. Hierfür wurden *Loops* mit jeweils zueinander komplementären Basensequenzen verwendet. Die Funktionalisierung der Tetraeder mit variabler Anzahl und Position der *Hairpin*-Strukturen, sowie die Hybridisierungseigenschaften verschiedener *Loop*-Sequenzen mittels *Kissing-Loop-Annealing* unter variablen Umgebungsbedingungen wurde, im Hinblick auf einen nanotechnologischen Einsatz, untersucht.

#### 3.1 Mono- und Multi-Funktionalisierung der Tetraeder

Ein DNA-Tetraeder nach Goodman *et al.*, 2005 lässt sich durch das *Annealing* von vier 63 nt-Einzelsträngen erreichen. Durch Austausch der vier Einzelstränge, gegen ein bis vier modifizierte Stränge, wurde eine Funktionalisierung des Tetraeders durch ein bis vier nach außen gerichtete *Hairpin*-Strukturen erreicht. Die ausgetauschten Stränge waren daher um eine jeweils 40 nt-Sequenzen verlängert, welche zwei zueinander komplementäre 10 nt-Bereiche enthielten, die den Stamm der *Hairpin*-Struktur ausbildeten und während eine dazwischen liegende 20 nt-*Loop*-Sequenz einzelsträngig blieb. Um eine effektive Assemblierung der Tetraeder mit zusätzlicher *Hairpin*-Struktur zu gewährleisten, wurde eine Reihe von aus der Literatur bekannten Puffersystemen, auf ihre Verwendbarkeit für sowohl die Assemblierung von DNA-Tetraedern (TM- und TMA-Puffer; Goodman *et al.*, 2005, Erben *et al.*, 2006, Leitner *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012) als auch für das *Kissing-Loop-Annealing* von DNA-*Hairpins* (TAE/Mg<sup>2+</sup>; Bois *et al.*, 2005) getestet (Abbildung 7). Durch die äußerst sensitive Silberfärbung konnten auch geringe Konzentrationen an unvollständig, oder fehlerhaft assemblierten Nebenprodukten in Form von hoch- oder niedermolekularen, schwachen oder unklaren Banden sichtbar gemacht werden. Diese ungewollten Nebenprodukte nahmen mit zunehmender Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen pro Tetraeder unabhängig vom verwendeten Puffersystem und auch bei Verwendung von Reinstwasser zu, dies äußerte sich in einer geringeren Intensität, sowie einer zunehmenden Unschärfe der Tetraederproduktbande. Ausschließlich in Anwesenheit von 11,5 mM Mg<sup>2+</sup> aus Magnesiumacetat (TAE/Mg<sup>2+</sup>) konnte für alle funktionalisierten und nichtfunktionalisierten Tetraeder eine hohe Ausbeute in Form einer intensiven Produktbande

an korrekt assembliertem Tetraeder erreicht werden. Der unmodifizierte Tetraeder ließ sich dagegen sowohl in Reinstwasser, als auch in den verschiedenen Puffersystemen gut assemblieren, dennoch konnte eine wesentlich höhere Ausbeute in Anwesenheit von TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer dokumentiert werden. Die Silberfärbung der Analysegele zeigte sich, bei Austausch des Magnesiumchlorids durch Magnesiumacetat, wesentlich störfreier und deutlich intensiver, was unterstützend zu einem klareren Bandenbild führte. In allen Ansätzen mit TAE/Mg<sup>2+</sup>-Annealingpuffer fand sich zusätzlich eine hochmolekulare Bande, mit geringer Intensität, auf Höhe des doppelten Molekulargewichtes der monomeren Tetraeders. Der Vergleich innerhalb der Gelelektrophorese-Ergebnisse der verschiedenen Puffersysteme machte dabei eine starke Korrelation zwischen Erscheinen der hochmolekularen Zusatzbande, der Bandenschärfe und der Ausbeute an korrekt assembliertem Tetraeder deutlich. Der erhöhte Einsatz von Stamm-Loop-Strukturen pro Tetraeder führte zu einer leichten Unschärfe der Produktbanden, interessanterweise wurde jedoch auch eine reduzierte Menge an Nebenprodukten, insbesondere der bereits erwähnten Zusatzbande, gebildet. Für weiterführende Experimente wurden – im Anschluss an die Assemblierung – korrekt assemblierte Tetraeder von unerwünschten Nebenprodukte getrennt, um diese im Detail zu



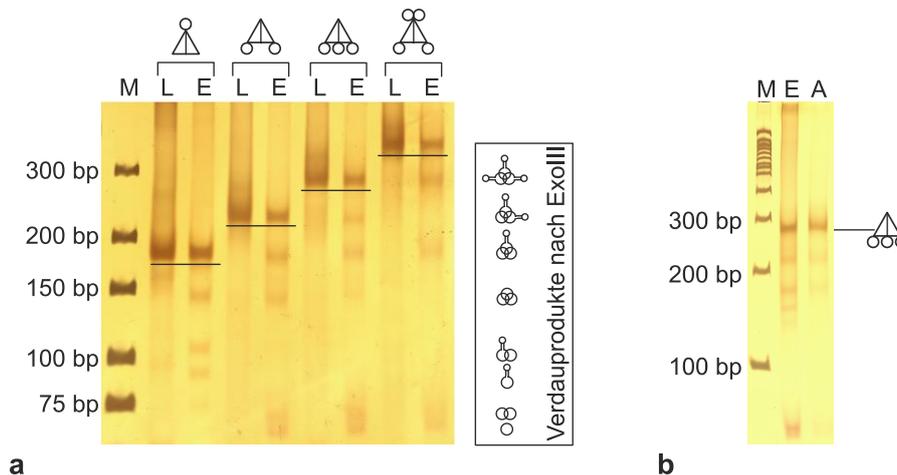
**Abbildung 7: Optimierung der Pufferbedingungen für ein optimales Annealing modifizierter Tetraeder.**

In vier parallelen Versuchsdurchläufen wurde die Wirkung des Puffermilieus auf die Assemblierung der Tetraeder getestet. Equimolare Mengen aller vier DNA-Stränge wurden in Reinstwasser (ddH<sub>2</sub>O), TM-Puffer (10 mM Tris, 5 mM Magnesiumchlorid, pH 8), TMA-Puffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7.8) und TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer (40 mM Tris, 19 mM Essigsäure, 10 mM EDTA und 12,5 mM Magnesiumacetat, pH 8) hybridisiert. Der nichtfunktionalisierte Tetraeder (Spur 1) ließ sich in allen Puffersystemen assemblieren. Tetraeder mit einer (Spur 2), zwei (Spur 3), drei (Spur 4) oder mit vier (Spur 5) zusätzlichen Stamm-Loop-Strukturen zeigten allerdings nur im TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer eine deutliche Produktbande mit nur wenigen hochmolekularen Nebenprodukten, welche durch die sensitive Silberfärbung sichtbar wurden. Eine weitere deutliche hochmolekulare Produktbande auf Höhe des doppelten Molekulargewichtes des monomeren Tetraeders erscheint in Anwesenheit von TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer, wird jedoch durch die Erhöhung der Anzahl an Hairpin-Strukturen pro Tetraedermolekül weiter reduziert. Als DNA-Marker dienten der GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (blau) und der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (rot) von Thermo Scientific. Die Proben wurden jeweils auf 8 % Polyacrylamidgelen analysiert.

analysieren. Dies machte eine weitere Modifikation der Tetraeder, wie im folgenden Kapitel erläutert, nötig.

### 3.2 Kovalente Verknüpfung durch Ligationsreaktion

Die etablierten Tetraeder wurden kovalent verknüpft, um sie stabiler gegen äußere Einflüsse (beispielsweise Nukleasen) zu machen. Hierfür wurden die offenen Einzelstrangbrüche (engl. *nick*) im DNA-Rückgrat der doppelsträngigen Kanten des Tetraeders mittels Ligationsreaktion geschlossen werden (Abbildung 8). Als Voraussetzung wurden hierfür bereits 5'-phosphorylierte DNA-Stränge für die Herstellung des Tetraeders verwendet und in Ligasepuffer assembliert. Die Assemblierung der Tetraeder konnte hierbei auch in Ligasepuffer (Quick Ligation Reaction Buffer, New England BioLabs) erfolgreich durchgeführt werden, weshalb für diese Proben auf einen Einsatz von TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer und eine anschließende Um-Pufferung verzichtet werden konnte. Ein Kontrollverdau und die Abtrennung von unvollständig ligierten Produkten wurde durch einen anschließenden Verdau durch die Exonuklease ExoIII erreicht. Der Verdau führte zu einer Reduzierung der Nebenproduktbanden bei einer gleichzeitig, weiterhin intensiven Tetraederproduktbande. Durch sensitive Silberfärbung konnten die in geringen Konzentrationen entstandenen niedermolekularen Verdauprodukte sichtbar gemacht werden. Darüber hinaus war es nun möglich die



**Abbildung 8: Tetraeder-Assemblierung nach Ligationsreaktion, sowie nach Exonuklease-Verdau und nativer Aufreinigung.**

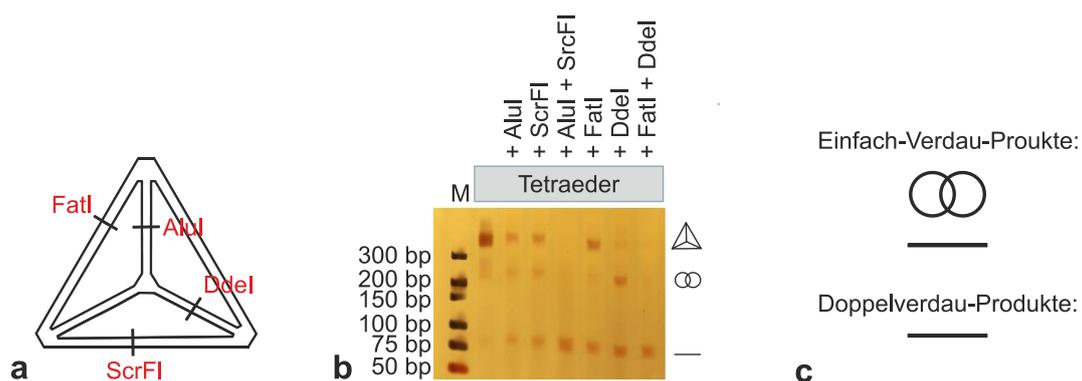
a) Dargestellt sind jeweils mono-, di-, tri- und tetrafunktionalisierte Tetraeder nach der Ligationsreaktion (L) auf einem nativen 8 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gel. Nach einem anschließenden Verdau durch ExoIII (E) werden nicht vollständig ligierte Produkte größtenteils abgebaut und sind als schwache, niedermolekulare Banden sichtbar. Die möglichen Ligations- und Verdauprodukte (analog zu Goodman *et al.*, 2005) wurden den jeweiligen, durch sensitive Silberfärbung sichtbar gemachten, Banden zugeordnet.

b) Eine Aufreinigung der ligierten und mit ExoIII inkubierten Proben (E) ist mittels Diffusion in ddH<sub>2</sub>O möglich (A). Hierbei wird die Produktbande ausgeschnitten und in einem Überstand aus ddH<sub>2</sub>O eluiert und durch Lyophilisation aufkonzentriert. Als Marker wurden der GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (a) und der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (b) von Thermo Scientific verwendet.

Produktbände auszuschneiden und das Gelstück in Reinstwasser zu überführen. Mittels Diffusion auf Eis wurde das Produkt eluiert und der Überstand durch Lyophilisation eingetrocknet und für die gelelektrophoretische Analyse in einem definierten gelöst. Für die in Abbildung 8a gezeigte Durchführung wurden 120 pmol DNA-Substrat eingesetzt, in Abbildung 8b wurden ebenfalls 120 pmol verwendet und nach Aufreinigung mittels Diffusion das lyophilisierte Pellet in 10 µl Reinstwasser gelöst.

### 3.3 Restriktionsanalyse des nichtfunktionalisierten Tetraeders

Für eine zusätzliche Überprüfung auf korrekte Assemblierung des Tetraeders, wurde exemplarisch ein nichtfunktionalisierter DNA-Tetraeder über denaturierende Gelextraktion gereinigt, um unvollständig ligierte Produkte abzutrennen. Der Tetraeder wurde anschließend über spezifische Restriktionsschnittstellen in den doppelsträngigen Kanten verdaut (siehe dazu Kapitel 2.2.2). Die Restriktionsschnittstellen sind in Abbildung 9a dargestellt. Es wurden ausschließlich Restriktionsenzyme verwendet, die innerhalb ihrer kurzen Erkennungssequenz schneiden. Hierbei wurden die Proben sowohl durch Einzel- als auch Doppelverdau prozessiert. Im Einzelverdau sollten, neben einem vollständig linearen Produkt, auch einzelsträngige Ringe, die als Resultat des *Annealings* je zu zweit ineinander verdrillt waren (DNA-Catenan), entstehen. Es konnten keine unspezifischen Verdauprodukte nachgewiesen werden. Die



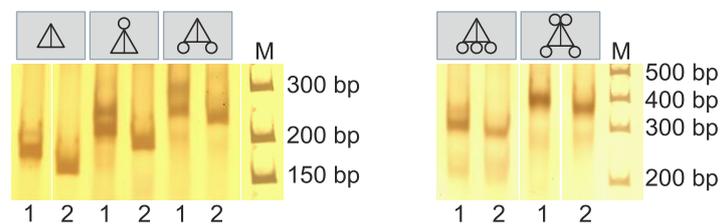
**Abbildung 9: Restriktionsanalyse des nichtfunktionalisierten Tetraeders – experimentelles Design nach Goodman *et al.*, 2005.**

- a) Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen in den jeweiligen Tetraeder-Kanten. Die Schnittstellen liegen innerhalb der Erkennungssequenz.
- b) Denaturierende Gelanalyse des gereinigten, kovalent geschlossenen Tetraeders, vor und nach der Restriktionsanalyse durch Einzel- und Doppelverdau. Als Marker wurde der GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific verwendet. Das 6 % Polyacrylamidgel wurde durch Silberfärbung gefärbt, um auch Verdauprodukte niedriger Menge anfärben zu können. Im Gegensatz zum Doppelverdau erscheinen im Einzelverdau auch geschlossene Einzelstrangringe, die durch die Ligation als Catenan ineinander verdrillt vorliegen.
- c) Schematische Darstellung der Einzel- und Doppelverdauprodukte des Tetraeders.

denaturierenden Analysegele wurden im Hinblick auf eine sensitivere Färbung von schwachen Produktbanden mittels Silberfärbung gefärbt.

### 3.4 Restriktionsanalyse der multifunktionalisierten Tetraeder

Für einen weitere Probenanalyse wurden vier funktionalisierte und durch Ligation kovalent verknüpfte Tetraeder mit ein, zwei oder drei *Loop*-Strukturen in jeweils gleicher 5'-3'-Orientierung auf einem nativen PAGE-Gel analysiert (Abbildung 10, Spur 2). Des Weiteren wurde ein vierter Tetraeder, welcher bis auf einen zusätzlichen Stamm-*Loop* dem trifunktionalen Tetraeder entspricht, untersucht. Dieser vierte Stamm-*Loop* besitzt jedoch eine den anderen *Loop*-Strukturen entgegengesetzte Direktionalität (siehe dazu Anhang 9.2). In einem weiteren Schritt wurden die Tetraeder jeweils mittels Restriktionssverdau durch DdeI verdaut, dieses besitzt seine Erkennungs- und Schnittsequenz innerhalb der Kante E des Tetraeders (siehe dazu Kapitel 2.2.4). Eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität nach Einsatz des Restriktionsenzym ist zu erkennen (Abbildung 10, Spur 1), wobei die geschnittenen Tetraeder während einer nativen Gelelektrophorese langsamer durch die Gelmatrix wandern.



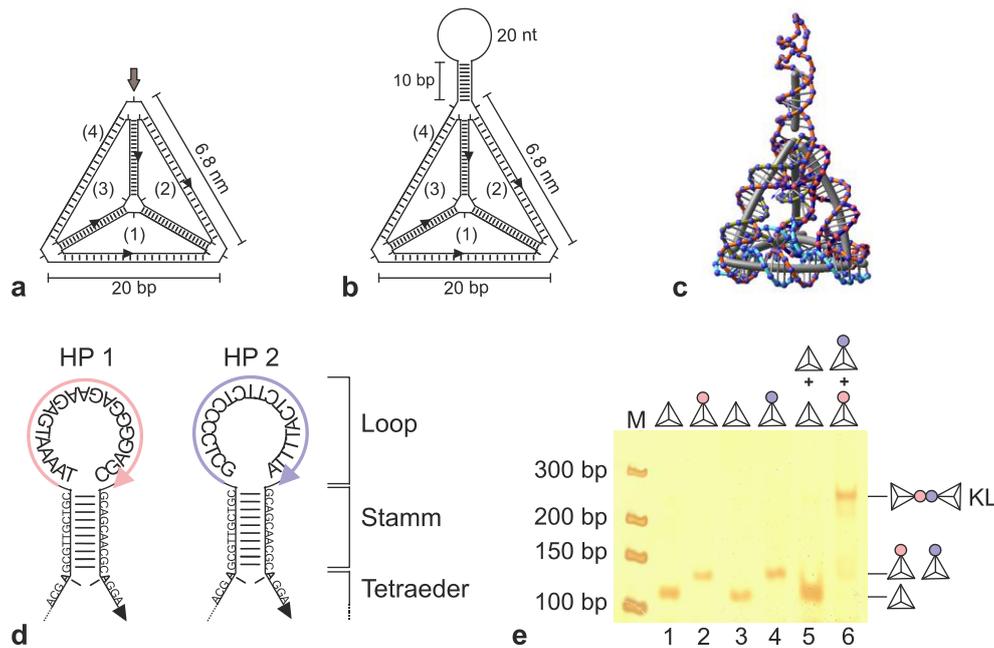
**Abbildung 10: Native Gelanalyse nach Restriktionsverdau multifunktionaler Tetraeder.**

Tetraeder mit ein, zwei, drei oder vier extravertierten Stamm-*Loop*-Strukturen an den Ecken wurden, nach kovalenter Verknüpfung der freien Enden, mittels DdeI verdaut. Dieses Enzym schneidet innerhalb seiner Erkennungssequenz, welche in einer Kante des Tetraeders liegt. In allen Fällen zeigt sich, nach Verdau (Spur 1) eine geringere elektrophoretische Mobilität, im Vergleich zur unverdauten Probe (Spur 2). Als Marker diente der GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific. Die Proben wurden auf einem mittels Silbernitratfärbung gefärbten 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgel analysiert.

### 3.5 *Kissing-Loop-Annealing* von kovalent geschlossenen Tetraedern

Die durch *Hairpin*-Strukturen funktionalisierten Tetraeder wurden über *Kissing-Loop*-Bildung zwischen den *Loop*-Bereichen miteinander hybridisiert werden. Für die Klärung der Frage, ob DNA-*Kissing-Loop*-Strukturen, als Teil der funktionalisierten Tetraeder, ausreichend Stabilität – beispielsweise auch bereits während der elektrophoretischen Trennung – gewährleisten, wurde zunächst das *Kissing-Loop-Annealing* zwischen monofunktionalisierten Tetraedern

charakterisiert. Dieser Aspekt der Bindungsstärke ist für nanotechnologische Anwendungen der *Kissing-Loop*-Hybridisierung von entscheidender Bedeutung. Im Folgenden wurden hierfür zwei monofunktionalisierte Tetraeder, mit je einer *Hairpin*-Struktur an einer Ecke des Tetraeders, hergestellt (Abbildung 11b). Beide Tetraeder unterschieden sich lediglich in ihrer *Loop*-Sequenz, die aus 20 komplett zueinander komplementären Nukleotiden bestand. In diesem Experiment wurden die *Loop*-Sequenzen HP 1 und HP 2 (verändert nach Bois *et al.*, 2005; Abbildung 11d). Im Vorfeld wurden weitere *Hairpin*-Strukturen untersucht, so unter



**Abbildung 11: Kissing-Loop-Annealing zwischen zwei DNA-Tetraedern mit komplementärer Loop-Sequenz.**

a) Gezeigt ist eine schematische Darstellung des DNA-Tetraeders nach Goodman *et al.*, 2005 mit einem nicht gepaarten Adenosin an jeder Tetraederecke. Die Zahlen (1)–(4) markieren die ursprünglichen DNA-Einzelstränge, wobei der geschlossene Nick nach Ligation durch eine schwarze Pfeilspitze innerhalb der doppelsträngigen Tetraederkanten symbolisiert wird.

b) Das erweiterte Schema stellt den Tetraeder nach Funktionalisierung durch eine Stamm-Loop-Sequenz im Austausch gegen das ursprüngliche Adenosin (a, grauer Pfeil) dar.

c) Des Weiteren ist der monofunktionalisierte Tetraeder in einer dreidimensionalen Darstellung abgebildet, die ursprünglichen DNA-Stränge sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet und die Achse der doppelsträngigen Tetraederkanten ist durch einen grauen Balken symbolisiert, während die Nucleobasen als blaue Kugeln dargestellt sind.

d) Zur Funktionalisierung der Tetraeder wurden zwei zueinander in ihrem *Loop*-Bereich komplementäre Stamm-Loop-Strukturen verwendet (nach Bois *et al.*, 2005). Hier sind sie als Teil des DNA-Strangs 4 (a, b) dargestellt und liegen an der Tetraederecke.

e) Gelelektrophoretische Auftrennung der nichtfunktionalisierten und monofunktionalisierten Tetraeder vor und nach *Kissing-Loop-Annealing* auf einem mit Silberfärbung gefärbten 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gel. Es wurden zwei Spezies kovalent verknüpfter 1-Loop-Tetraeder hergestellt, wobei sich die Tetraeder durch ihre Stamm-Loop-Sequenz (HP 1 = roter Loop, HP 2 = blauer Loop) unterscheiden. Als Kontrolle wurde ebenfalls kovalent verknüpfter nichtfunktionalisierter Tetraeder in einem *Kissing-Loop-Annealing*-Ansatz inkubiert. Im Vergleich zum *Annealing*-Ansatz mit nichtfunktionalisierten Tetraedern erscheint nach *Kissing-Loop-Annealing* der monofunktionalisierten Tetraeder eine Produktbande. 1, 3 = nichtfunktionalisierter Tetraeder, 2 = monofunktionalisierter Tetraeder mit HP 1, 4 = monofunktionalisierter Tetraeder mit HP 2, 5 = *Kissing-Loop-Annealing* mit nichtfunktionalisierten Tetraedern, 6 = *Kissing-Loop-Annealing* mit monofunktionalisierten Tetraedern. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

anderem auch eine Struktur mit nur zehn Nukleotiden Hybridisierungsbereich, für diese konnte ein weniger effektives *Kissing-Loop-Annealing* nachgewiesen werden (siehe dazu Anhang 9.1). Aus diesem Grund kamen im Folgenden nur entsprechend größere *Loop*-Sequenzen von 20 Nukleotiden zum Einsatz. Auch vorausgehende Daten aus Untersuchungen an *Hairpin*-Strukturen mit 20–40 Nukleotiden *Loop*-Bereich und resultierender erfolgreicher *Kissing-Loop*-Bildung unterstützen dies (Diplomarbeit Barth, 2010). Beide hier verwendeten Tetraeder wurden, nach einer kovalenten Verknüpfung des Tetraeders durch Ligase, mittels ExoIII-Verdau gereinigt und nach Zugabe von *Kissing-Loop-Annealing*puffer (TAE/Mg<sup>2+</sup>) bei einer Endkonzentration von 1 µM inkubiert (Abbildung 11e). Als Negativkontrolle wurde ein nichtmodifizierter Tetraeder im *Kissing-Loop-Annealing* eingesetzt (Abbildung 11a). Nach nativer Gelelektrophorese zeigte sich eine *Kissing-Loop*-Produktbande bei einer apparenten Laufhöhe, bezogen auf die DNA-Markerbanden, von ~ 230 bp, während der monofunktionalisierten Tetraeder knapp oberhalb der 100 bp-Bande lief. Im Kontroll-*Annealing* waren keine weiteren Banden nachweisbar.

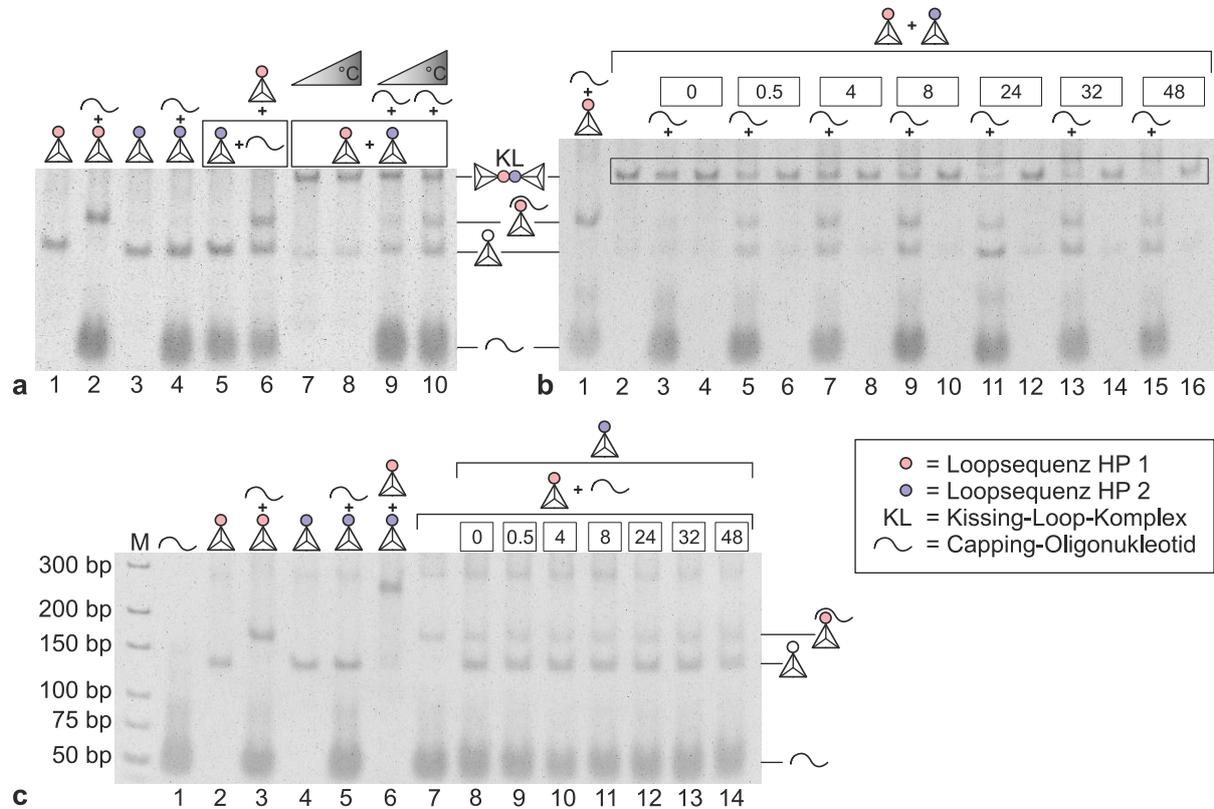
### 3.6 Sequenzspezifisch induzierbarer Zerfall der *Kissing-Loop*-Struktur

Die Bildung eines *Kissing-Loop*-Komplexes findet über einen 20 nt-Teilbereich des einzelsträngigen *Loops* statt, hierbei kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Nukleotide Basenpaare ausbilden können, da es zu torsionalen Spannungen kommt, die wegen dem Fehlen freier 5'- und 3'-Enden nicht relaxieren können. Aus diesem Grund ist eine weitere Hybridisierung mit einem weiteren Nukleinsäurestrang, die über freien Nukleotide stattfindet, denkbar. Um die Bindungsstärke der DNA-*Kissing-Loop*-Hybridisierung mit der einer klassischen Hybridisierung zwischen einer *Loop*struktur und einem linearen Einzelstrang (mit freien Enden) zu vergleichen, wurden Kompetetionsexperimente durchgeführt. Für die Bindung eines *Capping*-Strang (einzelnsträngig), mit vollständiger Komplementarität zum *Loop*-Bereich HP 1, bestehen im *Loop* jeweils ungepaarte Nukleotide für eine Basenpaarbindung. Von dieser ersten Bindung ausgehend, lässt sich der *Loop*-Bereich vollständig durch Bindung zum *Capping*-Oligonukleotid besetzen, wodurch eine schwächere bereits bestehende Bindung der beiden Tetraeder über den *Kissing-Loop* aufgelöst wird. Im folgenden Experiment wurde durch Inkubation des *Kissing-Loop*-Komplexes mit *Capping*-Oligonukleotid eine sequenzspezifische Auflösung des Komplexes (*Strand Displacement*) untersucht. Diese gezielte und sequenzspezifische Auflösung eines *Kissing-Loops* zwischen zwei monofunktionalisierten Tetraedern wurde im nachfolgenden Experiment realisiert (Abbildung 12). Das *Capping*-

Oligonukleotid konnte, in Abwesenheit des Tetraeders mit *Loop*-Sequenz HP 2, erfolgreich mit dem 1-*Loop*-Tetraeder (HP 1) hybridisiert werden, wobei das *Capping*-Oligo in einem zweifachen Überschuss zu Tetraeder HP1 eingesetzt wurde. Dabei fand ein nahezu vollständiges *Annealing* der Tetraeder mit dem *Capping*-Oligonukleotid statt, so dass die monomere Tetraederbande verschwand und stattdessen ein höhermolekulares Produkt zu detektieren war. Weiterhin war in einem analogen Experiment mit 1-*Loop*-Tetraeder (HP 2) konnte kein Umsatz zu einem Hybridisierungsprodukt aus Tetraeder und *Capping*-Oligo nachgewiesen werden, beide Monomerbanden, Tetraeder und *Capping*-Oligonukleotid blieben in ihrer Intensität unverändert und es war kein Hybridisierungsprodukt feststellbar. Wurde das *Capping*-Oligonukleotid in einem *Kissing-Loop-Annealing* zeitgleich mit Tetraeder HP 2 zugegeben, konnte sich kein *Kissing-Loop*-Komplex bilden. Stattdessen bildete sich ein Komplex aus *Capping*-Oligonukleotid und Tetraeder HP 1, während die monomere 1-*Loop*-Tetraederbande (HP 2) unverändert blieb.

Das *Kissing-Loop-Annealing* fand sowohl auf Eis (Abbildung 12a, Spur 7) als auch bei 25 °C (Abbildung 12a, Spur 8) statt. In beiden Fällen war das *Kissing-Loop*-Produkt stabil und bildete sich in vergleichbarer Bandenintensität. In einem weiteren Ansatz wurden nach dem *Annealing* auf Eis (Abbildung 12a, Spur 9) und bei 25 °C (Abbildung 12a, Spur 10) *Capping*-Oligonukleotid, unmittelbar nach Zugabe des Tetraeders HP 2 zum Tetraeder HP 1, in zweifachem Überschuss zugesetzt. Interessanterweise zeigte sich bei Zugabe zur 0 °C-Probe ein leichter Abbau des *Kissing-Loop*-Komplexes zu monomerem Tetraeder HP 2 und zu Gunsten der Bildung von Hybridisierungsprodukt aus Tetraeder HP 1 und *Capping*-Oligonukleotid. Dieser Zerfall verstärkte sich im 25 °C-Ansatz und es zeigten sich deutlichere Abbauproduktbanden des Hybridprodukts aus Tetraeder HP 1 und *Capping*-Oligo, sowie einer intensiveren Bande an Tetraeder HP 2. Um neben dem Effekt der Temperaturerhöhung auf den Abbau des *Kissing*-Komplexes auch eine Einschätzung für die zeitabhängige Entwicklung zu erhalten, wurde dieses Experiment über 48 h durchgeführt und für verschiedene Zeitintervalle Proben analysiert (Abbildung 12b). In einem parallelen Versuchsansatz sollte stattdessen der zuvor gebildete Komplex aus *Capping*-Strang und 1-*Loop*-Tetraeder HP 1 mit Tetraeder HP 2 inkubiert werden, um auszuschließen, dass es sich bei der Auflösung des *Kissing*-Komplexes durch *Strand Displacement* um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, bei der wieder *Kissing-Loop*-Produkt nach Auflösung des Komplexes von *Capping*-Strang und Tetraeder HP 1 entsteht (Abbildung 12c). Für jeden Zeitintervall in Abbildung 12b–c wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von *Capping*-Strang oder Tetraeder HP 2 analysiert, um einen nicht durch *Strand Displacement* induzierten Zerfall der Komplexe unter den gewählten Versuchsbedingungen

auszuschließen. Im Versuchsverlauf wurde deutlich, dass mit zunehmender Inkubationszeit ein Zerfall des *Kissing*-Komplexes voranschritt und sich vermehrt monomere Tetraeder HP 2 und eine intensiver werdende Bande an Hybridisierungsprodukt aus *Capping*-Strang und Tetraeder



**Abbildung 12: Sequenzspezifische Auflösung des *Kissing-Loop*-Komplexes aus monofunktionalisierten Tetraedern.**

a) Die Inkubation eines *Capping*-Oligonukleotids mit vollständiger Komplementarität zum *Loop*-Bereich des 1-*Loop*-Tetraeders HP 1 (1, rot) mit diesem bei 25 °C führt zur Bildung eines Komplexes mit geringerer Laufstrecke (2). Eine Inkubation des 1-*Loop*-Tetraeder HP 2 (3, blau) mit einem *Capping*-Oligos führt zu keiner Komplexbildung (4). Bei zeitgleicher Zugabe Tetraeder HP 2 und *Capping*-Oligo zu Tetraeder HP 1 konnte keine Bildung eines *Kissing-Loop*-Komplexes (KL) aus Tetraeder HP 1 und HP 2 beobachtet werden (6). Stattdessen bildete sich ein Komplex aus Tetraeder HP 1 und *Capping*-Oligonukleotid, wobei die Bande an monomerem Tetraeder HP 2 unverändert blieb. Eine stabile Bildung des *Kissing-Loop*-Komplexes aus Tetraeder HP 1 und HP 2 in Abwesenheit des *Capping*-Oligonukleotids war dagegen sowohl auf Eis (7) als auch bei 25 °C (8) möglich. Erst die Zugabe von *Capping*-Oligonukleotid auf Eis (9) und bei 25 °C (10) verursachte einen Zerfall des *Kissing-Loop*-Komplexes zu Gunsten der Bildung eines Komplexes aus *Capping*-Strang mit Tetraeder HP 1, wodurch auch monomere Tetraeder HP 2 entstand. Dieser Zerfall war unter dem Einfluss von höherer Temperatur bei 25 °C stärker, was sich in einer geringeren *Kissing-Loop*-Bande zeigte. Alle Proben wurde nach 25 min Inkubationszeit auf das 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgel geladen.

b) In einem Versuch zur Zeitabhängigkeit der Auflösung des *Kissing-Loop*-Komplexes aus 1-*Loop*-Tetraeder HP 1 und HP 2 durch *Strand Displacement Annealing* nach Zugabe von *Capping*-Oligonukleotid untersucht. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle ohne Zugabe des *Capping*-Strangs ein zunehmender Intensitätsverlust der KL-Bande mit verlängerter Inkubationszeit bis zu einem fast vollständigen Verschwinden nach 48 h (15). Alle Proben wurden bei 25 °C inkubiert und schließlich auf einem 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgel analysiert.

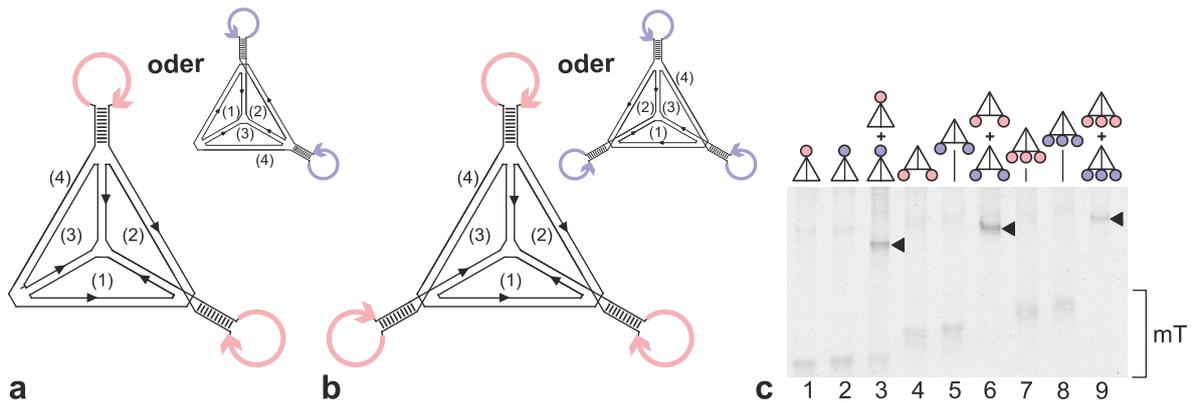
c) in einem weiteren Kontrolleexperiment wurde untersucht, ob der präformierte Komplex aus HP 1 und *Capping*-Oligonukleotid durch Zugabe von Tetraeder HP 2 aufgelöst werden kann. Hierfür wurde der Komplex aus *Capping*-Strang gebunden an den 1-*Loop*-Tetraeder HP 1 bei steigender Inkubationszeit mit Tetraeder HP 2 versetzt. Es ließ sich hierbei nach Analyse auf einem 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamid keine Veränderung der Bandenintensität feststellen. Als DNA-Marker diente der GenRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific (50–300 bp). Alle Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

HP 1 bildete. Eine nahezu vollständige Auflösung des *Kissing-Loop*-Komplexes konnte erst nach 48 h festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte über den gesamten Zeitverlauf keine für eine Gleichgewichtsreaktion sprechende Bildung eines *Kissing-Loop*-Komplexes und kein Zerfall des Komplexes aus *Capping*-Oligonukleotid und 1-*Loop*-Tetraeder HP 1 nachgewiesen werden. In den weiteren Analysen wurde daraufhin getestet, ob eine gezielte Auflösung von *Kissing-Loop*-Strukturen auch möglich ist, wenn diese von Tetraedern, die eine erhöhte *Loop*-Anzahl aufwiesen, gebildet wurden. Alle getesteten Komplexe erwiesen sich jedoch als nicht auflösbar (siehe dazu Anhang 9.3).

### **3.7 *Kissing-Loop*-Annealing von mono-, di- und trifunktionalisierten Tetraedern**

Wie bereits in Kapitel 3.1 dargestellt, ist es möglich Tetraeder durch mehrere nach außen gerichtete Stamm-*Loop*-Strukturen zu modifizieren. Die einzelnen *Hairpins* befanden sich an jeweils verschiedenen Ecken des Tetraeders. Zur Klärung der Frage, ob sich diese Tetraeder mit Funktionalisierung durch mehrere Stamm-*Loop*-Strukturen gleichermaßen zu *Kissing-Loop*-Produkten hybridisieren lassen, wurden mono-, di- und trifunktionalisierte Tetraeder jeweils untereinander hybridisiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die di- und trifunktionalisierte Tetraeder wurden durch Stamm-*Loop*-Strukturen in gleicher Direktionalität und mit gleicher Sequenzidentität verlängert, um ein simultanes *Annealing* aller drei *Loops* über *Kissing-Loop*-*Annealing* mit einem komplementären, aber gleichartigen Tetraeder möglich zu machen. Dieser komplementäre Tetraeder wies ebenfalls Stamm-*Loop*-Strukturen in gleicher Direktionalität auf, wobei die *Loop*-Sequenz vollständig komplementär zur *Loop*-Sequenz des Partner-Tetraeders war. Hierfür wurden die bereits in Kapitel 3.5 und Kapitel 3.6 verwendeten *Loop*-Sequenzen HP 1 und HP 2 eingesetzt. Der Einfluss der korrekten Direktionalität auf das *Kissing-Loop*-*Annealing* von Tetraedern, mit Stamm-*Loop*-Strukturen an verschiedenen Ecken, konnte in einem Vorversuch nachvollzogen werden (siehe dazu Anhang 9.2). In allen getesteten Fällen konnte nach *Kissing-Loop*-Hybridisierung eine klare Produktbande mit verringerter elektrophoretischer Mobilität beobachtet werden (Abbildung 13).

In bisherigen Versuchen wurden Stamm-*Loop*-Sequenzen an jeweils unterschiedlichen Ecken des Tetraeders angebracht, um eine Störung durch eventuelle sterische Hinderungen zu umgehen. In Bezug auf die Frage, ob mehrere Stamm-*Loops* pro Ecke dennoch möglich sind und ein erfolgreiches *Annealing* nicht behindern oder im Gegenteil dazu fördern können, sollten



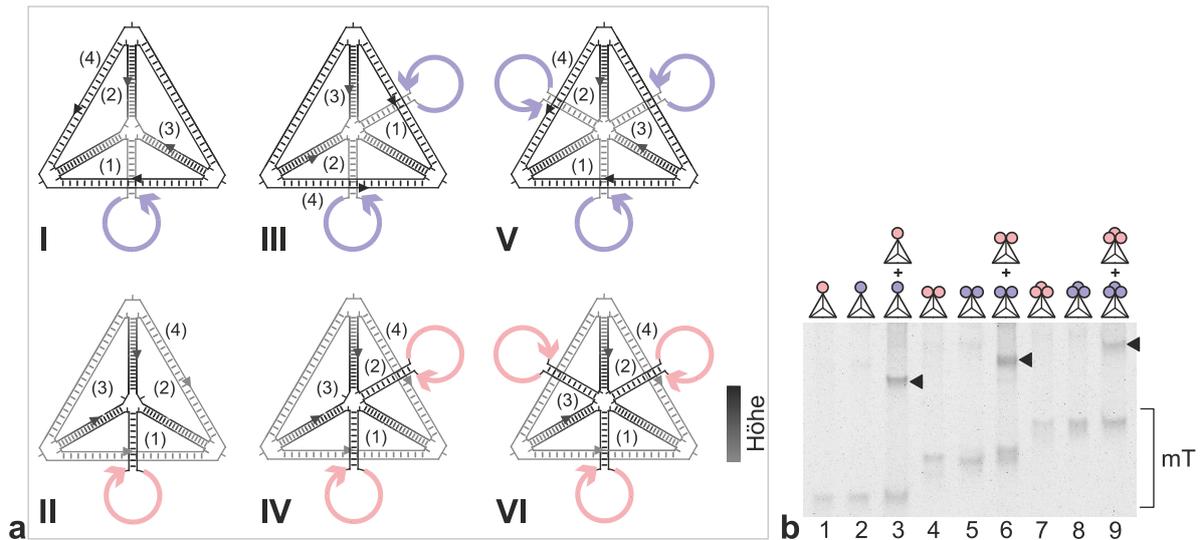
**Abbildung 13 : Kissing-Loop-Annealing von multifunktionalisierten Tetraedern an bis zu drei Ecken des Tetraeders.**

a) Das Schema zeigt zwei komplementäre, difunktionalisierte Tetraeder mit *Hairpin*-Sequenz 1 (HP 1, rot) oder der komplementären *Hairpin*-Sequenz 2 (HP 2, blau). Die jeweiligen Einzelstränge des Tetraeders sind durch Zahlen von 1–4 beschriftet und die 5'–3'-Direktionalität durch schwarze Pfeile an der Position der DNA-Einzelstrangbrüche dargestellt.

b) Ein gleichartiges Schema zeigt zwei komplementäre, trifunktionalisierte Tetraeder mit HP 1 (rot) oder HP 2 (blau). Auch hier wurden die Einzelstränge nummeriert (1–4) und die Direktionalität, sowie die Position der Nicks durch Pfeile markiert.

c) Im Vergleich wurden sowohl komplementäre mono-, di- und trifunktionalisierte Tetraeder über ihre *Loops* hybridisiert (HP 1 = rote *Loops*, HP 2 = blaue *Loops*). Die *Kissing-Loop*-Produktbanden sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben und laufen während der Elektrophorese langsamer als die Banden der monomeren Tetraeder (mT). Die Proben wurden auf einem nativen TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gel analysiert und mittels GelStar gefärbt. 1 = monofunktionalisierter Tetraeder HP 1, 2 = monofunktionalisierter Tetraeder HP 2, 3 = *Kissing-Loop-Annealing* der monofunktionalisierten Tetraeder, 4 = difunktionalisierter Tetraeder HP 1, 5 = difunktionalisierter Tetraeder HP 2, 6 = *Kissing-Loop-Annealing* der difunktionalisierten Tetraeder, 7 = trifunktionalisierter Tetraeder HP 1, 8 = trifunktionalisierter Tetraeder HP 2, 9 = *Kissing-Loop-Annealing* der trifunktionalisierten Tetraeder, mT = monomeres Tetraeder. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

weitere multifunktionalisierte Tetraeder mittels *Kissing-Loop-Annealing* aneinander gelagert werden. Die hierfür hergestellten Tetraeder besitzen je eine, zwei oder drei *Hairpin*-Strukturen an jeweils dergleichen Ecke (Abbildung 14). Auch hier wurde die 5'–3'-Direktionalität der *Loops* so ausgewählt, dass theoretisch alle ein bis drei *Loops* mit den komplementären *Loops* gleichartigen Tetraeders über *Kissing-Loop-Annealing* hybridisieren können. Dies wurde erreicht, indem beide Tetraeder in den jeweils gleichen Positionen innerhalb identischer DNA-Stränge modifiziert wurden. Aus diesem Grund sind auch diese Partner-Tetraeder bis auf die *Loop*-Sequenz identisch. Analog zu den zuvor analysierten Tetraedern besitzen auch diese Tetraeder entweder *Loop*-Sequenz HP 1 oder die dazu komplementäre Sequenz HP 2. Auch in diesem Experiment konnte in allen getesteten Fällen ein *Kissing-Loop-Annealing* festgestellt werden. Die Banden der monomeren Tetraeder (mT) laufen dabei deutlich unterhalb der entstandenen Produktbande. Wie im vorangegangenen Versuch unterscheiden sich die *Kissing-Loop*-Produkte in diesem Fall auch nur gering in ihrer Laufhöhe, wohingegen ein größerer Laufunterschied der Monomere feststellbar ist.



**Abbildung 14: Kissing-Loop-Annealing von multifunktionalisierten Tetraedern an einer Ecke.**

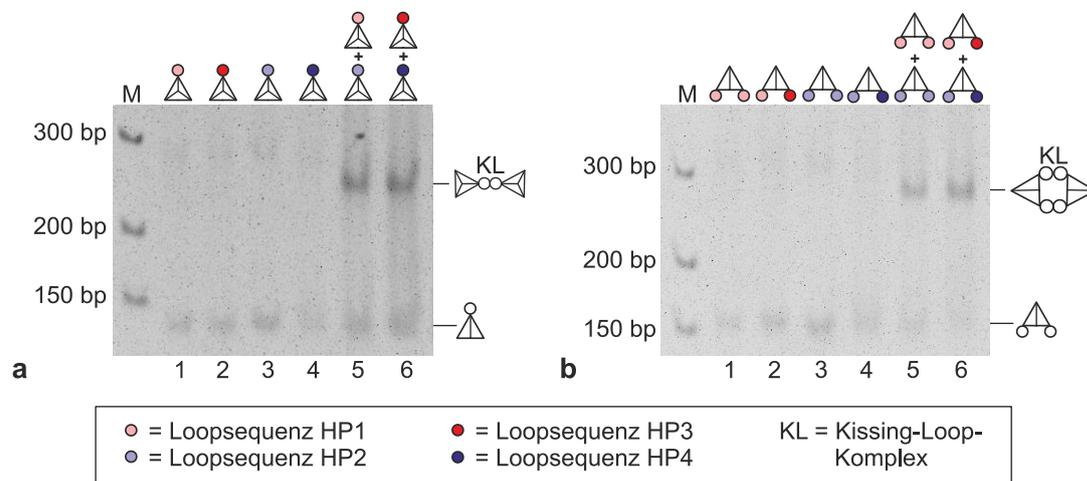
a) Als Schema dargestellt sind mono- (I, II), di- (III, IV) und trifunktionalisierte (V, VI) Tetraeder, deren nach außen gerichtete Stamm-Loop-Strukturen an derselben Tetraederecke liegen. Die gleichartigen Tetraeder stellen jeweils komplementäre Paare, mit der Loop-Sequenz HP 1 (rote Loops) und HP 2 (blaue Loops), dar. Die Einzelstränge der Tetraeder sind durch Zahlen von 1–4 gekennzeichnet und die 5'–3'-Direktionalität durch Pfeile an der Position des DNA-Einzelstrangbruchs angegeben.

b) Im Vergleich wurden jeweils beide komplementäre mono-, di- und trifunktionalisierte Tetraeder untereinander durch Kissing-Loop-Annealing hybridisiert (HP 1 = rote Loops, HP 2 = blaue Loops). Die Kissing-Loop-Produktbanden sind durch schwarze Pfeile (◄) hervorgehoben. Die Proben wurden auf einem nativen TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gel analysiert und mittels GelStar gefärbt. 1 = monofunktionalisierter Tetraeder HP 1 (II), 2 = monofunktionalisierter Tetraeder HP 2 (I), 3 = Kissing-Loop-Annealing von Tetraeder I mit II, 4 = difunktionalisierter Tetraeder HP 1 (IV), 5 = difunktionalisierter Tetraeder HP 2 (III), 6 = Kissing-Loop-Annealing von Tetraeder III mit IV, 7 = trifunktionalisierter Tetraeder HP 1 (VI), 8 = trifunktionalisierter Tetraeder HP 2 (V), 9 = Kissing-Loop-Annealing von Tetraeder V mit VI, mT = monomerer Tetraeder. Die Proben wurden auf einem 4 % PAGE-Gel (TAE/Mg<sup>2+</sup>) analysiert und mittels Gelstar-Färbung sichtbar gemacht. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

### 3.8 Kombiniertes Einsatz unterschiedlicher Kissing-Loop-Sequenzen

In den voran gegangenen Experimenten wurden ausschließlich Tetraeder mit identischen Stamm-Loop-Strukturen hergestellt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit über Kissing-Loops zu hybridisieren analysiert. Wie aber bereits erläutert (Kapitel 3.5) wurden weitere Hairpin-Strukturen auf ihre Eignung als Modifikation von Tetraedern getestet. Der Einsatz zusätzlicher Hairpin-Strukturen eröffnet die Möglichkeit mehrere nicht identische, aber gleichzeitig nicht zueinander komplementäre Stamm-Loop-Strukturen als Funktionalisierung an ein und demselben Tetraeder zu verwenden. Im Zuge dessen wurden zwei neue Loop-Sequenzen entwickelt, welche analog zu Loop-Sequenz HP 1 und HP 2 eine typische Verteilung der Basen aufwiesen. Beide Loop-Sequenzen zeichnen sich durch einen Adenin (A)- und Thymin (T)-reichen 5'-Bereich und einen dem gegenüber liegenden Guanin (G)- und Cytosin (C)-reichen 3'-Bereich aus. Dies wird in einem späteren Kapitel (3.12) ausführlich untersucht. Die zwei neuen Loop-Sequenzen HP 3 und HP 4 weisen eine ähnliche Verteilung in A/T- und G/C-reiche

Bereiche auf, sind jedoch nicht zu HP 1 oder HP 2 komplementär. Tetraeder mit Monofunktionalisierung durch HP 3 und HP 4 zeigten, im Vergleich zu solchen mit HP 1- und HP 2-Funktionalisierung, eine identische Effektivität bei der Bildung von *Kissing-Loop*-Strukturen (Abbildung 15a). Wurde nun ein Tetraeder mit zwei Stamm-*Loop*-Strukturen modifiziert, war es möglich zwei *Hairpin*-Strukturen zu kombinieren. Im Folgenden Versuch wurden pro Tetraeder jeweils Sequenz HP 1 und HP 3, als auch HP 2 und HP 4 kombiniert. Im Vergleich zueinander zeigten sowohl die mit zwei gleichen *Loop*-Sequenzen ausgestatteten Tetraeder, als auch die mit den zwei kombinierten Stamm-*Loop*-Strukturen ein vergleichbares *Kissing-Loop*-Annealing (Abbildung 15b). Die *Kissing-Loop*-Produkte migrieren hierbei im Vergleich zur Bandenlaufhöhe der Markerbanden bei einem verdoppelten apparenten Molekulargewicht (Dimerisierung), während keine weiteren Produktbanden detektierbar sind.



**Abbildung 15: Kombination unterschiedlicher *Kissing-Loop*-Strukturen.**

a) Tetraeder lassen sich durch unterschiedliche Stamm-*Loop*-Strukturen modifizieren. Bei anschließendem *Kissing-Loop*-Annealing zeigen sowohl die komplementären 1-*Loop*-Tetraeder mit HP 1 (rot, 1) und HP 2 (blau, 3), als auch die zwei Tetraeder mit HP 3 (dunkelrot, 2) und HP 4 (dunkelblau, 4) ein effektives *Kissing-Loop*-Annealing (5–6).

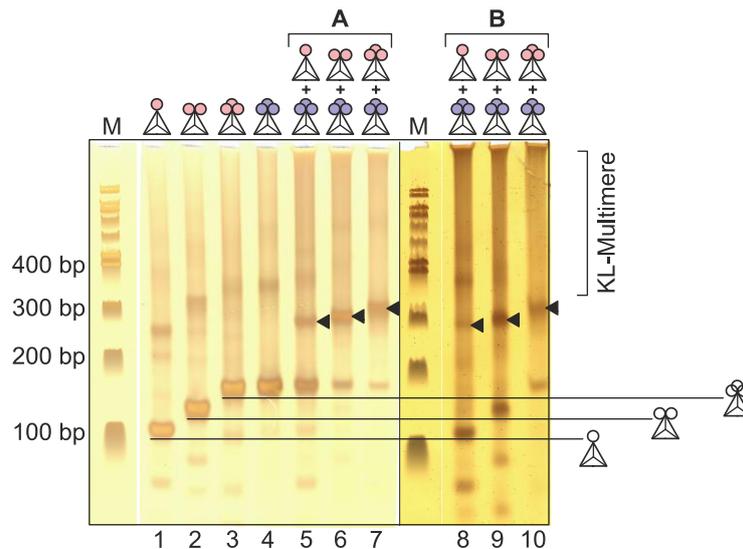
b) An einem 2-*Loop*-Tetraeder können sowohl zwei gleiche *Loop*-Sequenzen (zweimal HP 1 = rote *Loops* (1), zweimal HP 2 = blaue *Loops* (3)), also auch zwei unterschiedliche *Loop*-Sequenzen (HP 1 und HP 3 = roter und dunkelroter *Loop* (2), HP 2 und HP 3 = blauer und dunkelblauer *Loop* (4)) kombiniert werden. Die Stammsequenz ist bei allen Stamm-*Loop*-Strukturen identisch. Die Kombination von zwei unterschiedlichen *Kissing-Loop*-Sequenzen ermöglicht im gezeigten Fall die Bildung von *Kissing-Loop*-Strukturen (KL) mit vergleichbarer Effektivität, wie sie 2-*Loop*-Tetraeder mit identischen *Loop*-Sequenzen zeigen. Die Laufhöhe der *Kissing-Loop*-Produkte im Vergleich zum Größenstandard deutet bei allen Ansätzen auf eine Verdoppelung des apparenten Molekulargewichtes, die *Kissing-Loop*-Produkte sind schematisch dargestellt. Als Größenstandard wurde der GenRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific verwendet (300 bp, 200 bp, 150 bp). Für die Analyse wurden native 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgelle verwendet. Abbildung verändert nach Barth *et al.*, 2016.

### 3.9 Einfluss der *Loop*-Anzahl auf die *Kissing-Loop*-Multimerbildung

Weiterhin wurden Hinweise gesucht, ob zwischen zwei multifunktionalen und zueinander komplementären Tetraedern mehrere *Kissing-Loop*-Strukturen ausgebildet werden können. In einem ersten Versuchsdurchlauf wurde mit Tetraedern, welche mit ein bis drei Stamm-*Loop*-Strukturen an derselben Ecke funktionalisiert wurden, gearbeitet. Hierbei wurde ein Tetraeder mit drei *Loops* pro Ecke (HP 1) in drei parallelen Ansätzen jeweils mit einem komplementären 1-*Loop*-Tetraeder, einem 2-*Loop*-Tetraeder und einem 3-*Loop*-Tetraeder (HP 2) zusammen gebracht (Abbildung 16). Die Reaktionsansätze A und B unterschieden sich dabei in den jeweils eingesetzten Mengen an Tetraeder. So wurden in Ansatz A identische Mengen beider Tetraeder kombiniert, während in Ansatz B die Tetraedermengen so angeglichen wurde, dass komplementäre *Loops* in gleicher Anzahl vorlagen. Um auch niedermolekulare Produkte sichtbar zu machen, wurden alle Gele mittels Silberfärbung gefärbt. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten konnte auch hier ein deutliches *Kissing-Loop*-Produkt auf Höhe der 300 bp-Bande des DNA-Markers bestätigt werden, während die Monomerbanden deutlich weiter migrierten. Nach der Inkubation von komplementären Tetraedern in identischen Mengen (Ansatz A) war, nach Färbung, in allen Ansätzen eine prominente Produktbande zu finden. Hierbei ließ sich für die drei getesteten Kombinationen feststellen, dass eine erhöhte Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen des *Annealing*-Partners mit einer gesteigerten Ausbeute an dimerem *Kissing-Loop* korrelierte. Die intensivste Produktbande konnte nach *Annealing* zweier komplementärer 3-*Loop*-Tetraeder festgestellt werden, wobei in diesen Ansätzen eine equimolare Menge Partnertetraeder und identische Mengen komplementärer *Loop* für das *Kissing-Loop-Annealing* zur Verfügung standen.

Zur Klärung der Frage, ob neben Dimeren auch höhermolekulare *Kissing-Loop*-Komplexe entstehen, konnte Versuchsansatz B Antwort liefern. Hier wurde die Entstehung weiterer hochmolekularer *Kissing-Loop*-Produkte durch die Anpassung der Tetraedermengen erreicht, so dass der Menge an 3-*Loop*-Tetraeder (HP 2) jeweils die dreifache Menge 1-*Loop*-Tetraeder oder 1,5-fache Menge 2-*Loop*-Tetraeder als *Kissing-Loop*-Partner zur Verfügung stand. Die Angleichung der Menge an komplementären *Loop*-Bereiche erhöhte somit die Anzahl an Partner-Tetraedermolekülen, resultierte aber in einer geringeren Ausbeute an Dimerbande (~ 300 bp) bei gleichzeitiger Förderung von hochmolekularen Produkten.

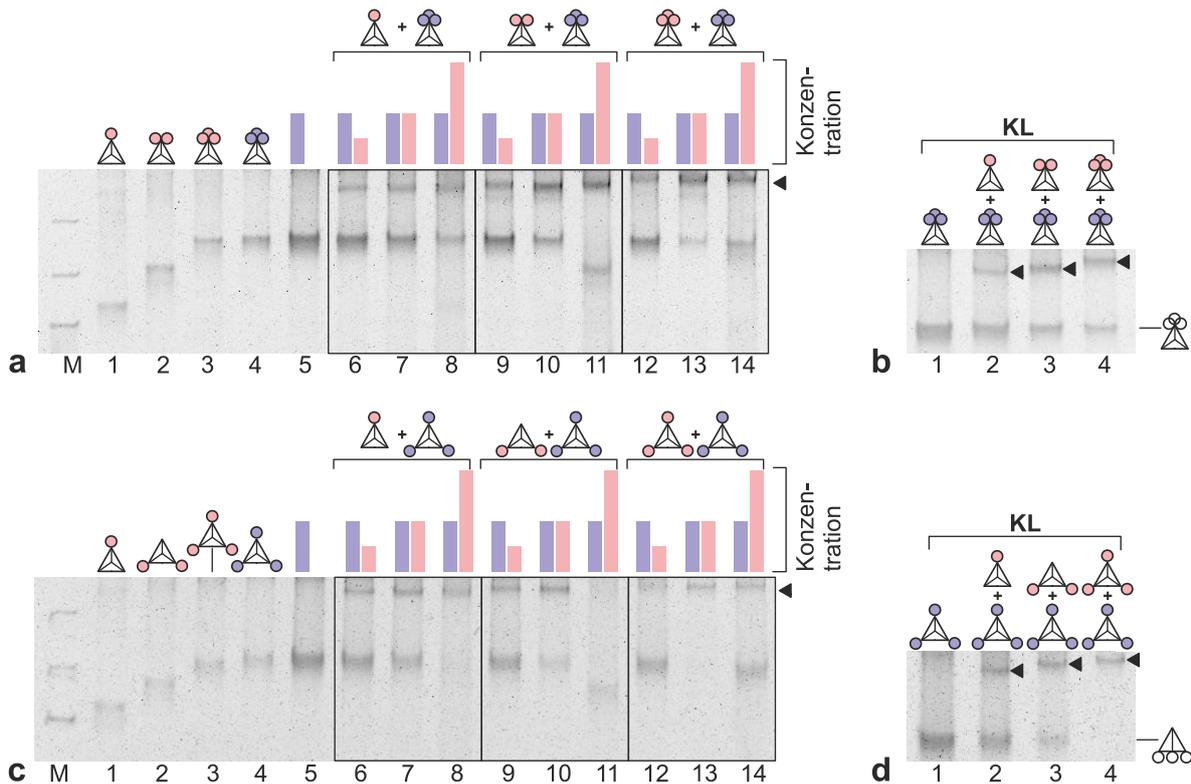
Auch die Zu- und Abnahme an monomeren Tetraedern (~ 100–200 bp) unterstützt diese Beobachtungen, so lässt sich in Ansatz A eine deutlichere Abnahme der 1- und 2-Loop-Tetraedern feststellen, als eine Abnahme an 3-Loop-Tetraedern. Ein nahezu vollständiger Umsatz der Monomere zu *Kissing-Loop*-Produkten, nach Inkubation zweier 3-Loop-Tetraeder, korreliert mit einer maximalen Ausbeute an dimerem *Kissing-Loop*-Produkt. Ansatz B stellt jedoch, mit einem vollständigen Verbrauch des hier im Unterschuss eingesetzten 3-Loop-Tetraeders und einem geringeren Umsatz an 1- und 2-Loop-Tetraeder, den Gegenfall dar.



**Abbildung 16: Beeinflussung der Multimerisierung von DNA-Tetraedern durch Anpassung der Loop-Anzahl im *Kissing-Loop*-Annealing.**

In zwei Parallelansätzen (A und B) wurde ein 3-Loop-Tetraeder (*Hairpin*-Sequenz 2, blauer Loop) mit jeweils einem 1-Loop-Tetraeder, einem 2-Loop-Tetraeder und einem 3-Loop-Tetraeder (*Hairpin*-Sequenz 1, roter Loop) inkubiert. Die Monomere sind in Spur 1–4 dargestellt. Der Ansatz A enthielt hierbei identische Mengen Tetraeder (Spur 5-7 1:1 Tetraeder HP1 zu Tetraeder HP 2), bei unterschiedlichem Verhältnis zueinander komplementärer Loop-Strukturen (Spur 5 1:3, Spur 6 1:1,5, Spur 7 1:1 Loop HP1 zu HP2), die sich aus der Anzahl der Loop-Strukturen der kombinierten Tetraeder ergab. Der Ansatz B wurden die Menge an komplementären Loop-Strukturen angeglichen (Spur 8-10 1:1), indem unterschiedlicher Mengen an Tetraedermolekülen eingesetzt wurden (Spur 8 3:1, Spur 9 1,5:1 Spur 10 1:1 Tetraeder HP zu HP2). Die prominentesten Produktbanden nach *Kissing-Loop*-Annealing (Spur 5–10) sind durch schwarze Rechtecke hervorgehoben, sie wandern auf einer Höhe mit der 300 bp-Bande des Markers, während das eingesetzte Monomer bei 150 bp migriert. In Ansatz A korrelierte hierbei die Bandenintensität dieser Produktbande mit der Anzahl an Stamm-Loop-Strukturen des Annealingpartners. Die intensivste Bande war in Spur 7 nach Inkubation zweier 3-Loop-Tetraeder mit equimolarer Molekül- und Loop-Menge zu finden. Eine Zunahme an zusätzlichen höhermolekulare Produkten bei gleichzeitiger, starker Abnahme der in Ansatz A prominenten Produktbande und des 3-Loop-Tetraeder-Monomers, wurde in Ansatz B deutlich (Spur 8). Dieses Phänomen zeigte sich auch in Spur 9, hier entstand nach Inkubation mit einem 2-Loop-Tetraeder ein Bereich oberhalb der 300 bp-Markerbande mit Komplexen multipler molekularer Größen, welcher wiederum im Vergleich zu Ansatz A (Spur 6) eine geringere Intensität auswies. Als Kontrolle wurde auch in Ansatz B eine Probe mit equimolaren Mengen 3 Loop-Tetraeder aufgetragen (Spur 10, identisch zu Spur 7). Die gelelektrophoretische Trennung der Probe fand auf 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gelen statt, die anschließend zur Visualisierung auch minimaler Nebenprodukte mittels Silberfärbung gefärbt wurden. Als Größenmarker (M) diente der 100 bp DNA Ladder von Thermo Scientific.

Um dieses Ergebnis näher zu untersuchen, wurden in einem weiteren Experiment eine definierte Menge 3-Loop-Tetraeder (HP 2) mit einer steigenden Konzentration an komplementärem 1-Loop-, 2-Loop- und 3-Loop-Tetraeder (HP 1) titriert. Dieser Versuch wurde sowohl für Tetraeder durchgeführt, welche die Stamm-Loop-Strukturen an dergleichen Ecke aufwiesen (Abbildung 17a–b), als auch mit Tetraedern, deren Stamm-Loop-Sequenzen an verschiedene Ecken positioniert waren (Abbildung 17c–d). Die Menge an 3-Loop-Tetraeder



**Abbildung 17: Titration mit Tetraedern variabler Loop-Anzahl.**

In zwei parallelen Versuchsdurchläufen wurde jeweils ein 3-Loop-Tetraeder (roter Loop = Loop-Sequenz HP 2) mit einer steigenden Anzahl komplementärer 1-, 2-, und 3-Loop-Tetraedern (blauer Loop = Loop-Sequenz HP 1) titriert.

a) Spur 1–4 zeigt die eingesetzten Monomere mit Loops jeweils an einer Ecke. In Spur 5–14 wurden *Kissing-Loop*-Ansätze mit unterschiedlichem Konzentrationsverhältnis von Tetraeder HP 1 und Tetraeder HP 2 aufgetragen. Die Bandenlaufhöhe der daraus hervorgegangenen *Kissing-Loop*-Produkte mit doppeltem Molekulargewicht der entsprechenden Monomere, wurde durch schwarze Pfeile markiert. Die einzelnen Mengenverhältnisse wurden als Balken oberhalb der Taschen verdeutlicht, blaue Balken markieren hierbei die Menge an 3-Loop-Tetraeder (HP 2) und rote Balken die Menge an komplementärem 1-, 2- oder 3-Loop-Tetraeder mit Loop-Sequenz HP 1.

b) Auf einem weiteren Gel wurden die einzelnen Kombinationen mit equimolaren Mengen Tetraeder noch einmal nebeneinander aufgetragen. Da zwischen der Bandenlaufhöhe von 3-Loop-Tetraeder mit HP 1 und HP 2 kein Unterschied besteht, wurde deren gemeinsame Bandenlaufhöhe durch einen Tetraeder mit weißen Loops dargestellt.

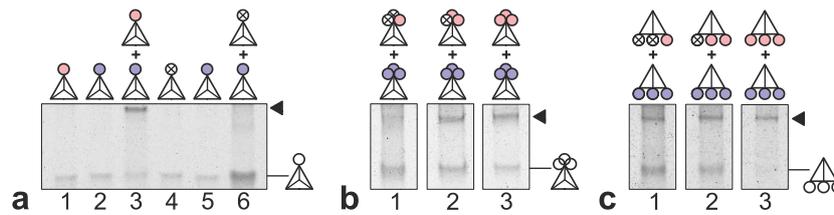
c) Analog zu (a) wurden hier in Spur 1–4 die einzelnen Monomere aufgetragen, die sich durch ihre Loop-Position an verschiedenen Ecken unterscheiden, sowie die dazugehörigen *Kissing-Loop*-Ansätze in Spur 5–14. Auch hier markieren schwarze Pfeile die Bandenlaufhöhe der *Kissing-Loop*-Produktbande und farbige Balken über den Taschen geben die Konzentrationsverhältnisse der Tetraeder an (rot = HP 1, blau = HP 2).

d) In einem weiteren Gel wurden alle drei getesteten Kombinationen der Tetraeder (mit Loop-Strukturen an verschiedenen Ecken) in einem equimolaren Mischverhältnis zueinander in einem extra Gel gemeinsam aufgetragen.

Alle Proben wurden auf fluoreszenzgefärbten 8 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Gelen analysiert. Als Größenstandard wurde der Ultra Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific (300 bp, 200 bp, 150 bp) verwendet.

(HP 2) war in allen Ansätzen identisch. Einer Kontrollprobe wurde kein Tetraeder HP 1 zugesetzt, wohingegen in den weiteren *Kissing-Loop*-Ansätzen die Menge an Tetraeder HP 1 entweder die Hälfte von Tetraeder HP 2 betrug (2:1), identisch war (1:1) oder doppelt so hoch (1:2) lag. Diese Mengenverhältnisse sind in Abbildung 17 durch rote und blaue Balken verdeutlicht. Es ließ sich auch hier bestätigen, dass ein maximaler Umsatz des Monomers – was sich durch eine schwache Intensität der Monomerbande zeigte – und die gleichzeitig maximale Ausbeute an *Kissing-Loop*-Produktbande, bei Einsatz equimolarer Mengen an komplementären Tetraedern zu finden war. Dies wurde vor allem im Fall des 3-*Loop*-Tetraeders mit einer Funktionalisierung durch mehrere *Loops* an dergleichen Ecke deutlich (Abbildung 17a). In Abbildung 17b–d sind erneut alle *Kissing-Loop*-Ansätze mit equimolaren Mengen Tetraeder gemeinsam aufgetragen. Hier wird weiterhin deutlich, dass mit einer Zunahme an zum *Loop* HP 2 komplementären *Loop* HP 1 pro Partnertetraeder auch der Umsatz an 3-*Loop*-Tetraeder-Monomer zunimmt. In Ansätzen mit equimolaren Mengen Tetraeder ist darüber hinaus festzustellen, dass Tetraeder mit nur einem oder zwei komplementären *Loop*-Strukturen (HP 1) im *Annealing* mit einem 3-*Loop*-Tetraeder in geringem Maß mehr umgesetzt werden, als der 3-*Loop*-Tetraeder, und eine Bande auf entsprechender Höhe in der Fluoreszenzfärbung nicht mehr nachweisbar war, während noch eine monomere Bande des 3-*Loop*-Tetraeder sichtbar blieb.

Um diese Ergebnisse mit einer zweiten Methode zu verifizieren, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem nun ausschließlich 3-*Loop*-Tetraeder miteinander hybridisiert wurden. Wieder wurden sowohl Tetraeder mit einer Multifunktionalisierung an dergleichen Ecke, sowie an unterschiedlichen Ecken analysiert. Eine Reduzierung der Anzahl zueinander komplementärer *Loops* wurde durch Austausch der *Loop*-Sequenz HP 1 durch Poly(dT)-*Loops* erreicht. Diese Stamm-*Loop*-Strukturen besitzen einen zu HP 1 und HP 2 identischen Stammbereich, jedoch wurde die gesamte *Loop*-Sequenz aus 20 Nukleotiden durch eine Sequenz von 20 Thymidin-haltigen Nukleotiden ausgetauscht, welche nicht mit HP 1 oder HP 2 hybridisieren konnte. Dies wurde experimentell am Beispiel eines monofunktionalisierten Tetraeders gezeigt (Abbildung 18a), sowie auch durch die vorherige Analyse mittels DNA-Sekundärstruktur-Analyseprogrammen (siehe dazu Kapitel 22). In allen Fällen konnte erneut eine Abhängigkeit zwischen der Abnahme der Monomere, Zunahme des *Kissing-Loop*-Komplexes und der Anzahl zur Verfügung stehender, komplementärer *Loops* dokumentiert werden. So zeigte sich bei einer Zunahme an durch Poly(dT)-*Loop*-Strukturen ausgetauschten HP 1-*Loops* auch eine stärkere Intensität an nicht umgesetzten Monomeren im *Kissing-Loop*-*Annealing* (Abbildung 18b, c). Weiterhin wurde deutlich, dass mit einer Zunahme an Poly(dT)-



**Abbildung 18: Titration mit Tetraedern variabler *Loop*-Anzahl durch Austausch gegen Poly(dT)-Stamm-*Loop*-Sequenzen.**

a) In Spur 1, 2, 4, 5 sind jeweils monomere 1-*Loop*-Tetraeder aufgetragen worden. Sie unterscheiden sich in ihrer *Loop*-Sequenz, wobei ein rote *Loop*-Sequenz HP 1 darstellt, ein blaue die dazu komplementäre *Loop*-Sequenz HP 2 und ein *Loop* mit Kreuz eine *Hairpin*-Struktur symbolisiert, deren *Loop* aus 20 Thymin-haltigen Nukleotiden besteht (Poly(dT)-*Loop*), wobei letzterer nicht mit HP 1 oder HP 2 hybridisieren kann. Das entsprechende Kontroll-*Annealing* von monofunktionalisiertem Tetraeder HP 2 und einem Poly(dT)-Tetraeder ist in Spur 6 dargestellt. Im Vergleich dazu ist in Spur 3 das *Annealing* der zueinander vollständig komplementären Tetraeder mit HP 1 und HP 2 zu sehen, sowie eine deutliche *Kissing-Loop*-Bande, deren Bandenlaufhöhe durch einen schwarzen Pfeil (◄) markiert ist.

b) In einem weiteren *Annealing*experiment wurde bei einem 3-*Loop*-Tetraeder mit *Loop*-Sequenz HP 1 (roter *Loop*), diese in zwei (1), einem (2) oder keinem (3) *Loop* durch eine Poly(dT)-Sequenz (schwarzer *Loop*) ausgetauscht und anschließend mit einem komplementären 3-*Loop*-Tetraeder (HP 2) inkubiert. Im Vergleich zum *Kissing-Loop*-Ansatz mit drei vollständig komplementären *Loop*-Sequenzen (3) des 3-*Loop*-Tetraeders (HP 1) nimmt die Intensität nicht umgesetzten Monomers deutlich zu. Gleichzeitig wird die *Kissing-Loop*-Produktbande unschärfer, je weniger komplementäre *Loop*-Sequenzen (HP 1) zur Verfügung stehen. Des Weiteren zeigt sich in Spur 1 mit nur einer verbleibenden *Loop*-Sequenz HP 1 eine unscharfe Bande auf Höhe des *Kissing-Loop*-Produkts.

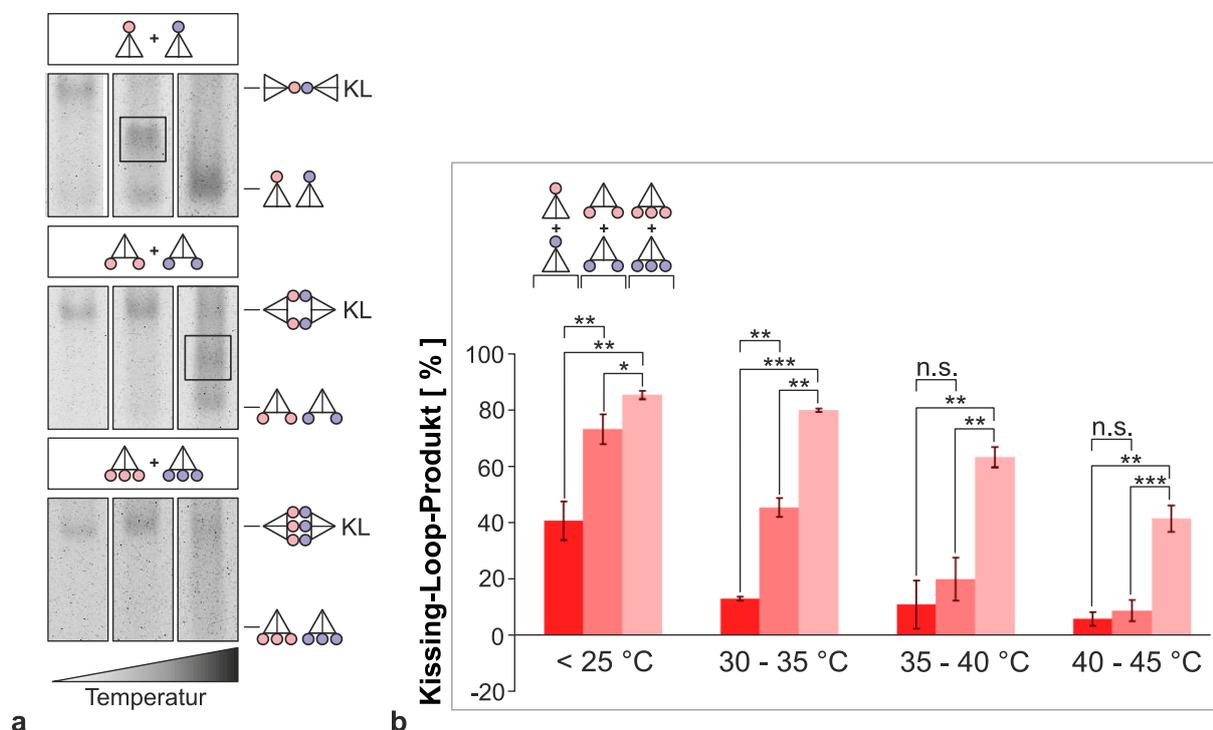
c) Dieses Experiment wurde ebenfalls für 3-*Loop*-Tetraeder mit Stamm-*Loop*-Strukturen an verschiedenen Ecken durchgeführt. Auch hier konnte eine Zunahme an nicht umgesetztem Monomer, bei erhöhter Anzahl an Poly(dT)-*Loops* und einer gleichzeitig verringerten Anzahl an *Loop*-Sequenz HP 1, festgestellt werden. Im Falle nur eines verbliebenen *Loop* mit Sequenz HP 1 (1) ließ sich im Gegensatz zum 3-*Loop*-Tetraeder aus (b) eine weniger ausgeprägter Unschärfe der *Kissing-Loop*-Produktbande feststellen. Alle Proben wurden auf fluoreszenzgefärbten 8 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgelen analysiert. Da aufgrund der gemeinsamen Laufhöhe der Monomerbanden nicht zwischen den einzelnen *Loop*-Spezies unterschieden werden kann, sind diese durch Tetraeder mit weißen *Loops* dargestellt. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

*Loop*-Sequenzen auch die Bandenschärfe abnahm, was vor allem im Falle des 3-*Loop*-Tetraeders mit Stamm-*Loop*-Strukturen an dergleichen Ecke in Form einer ausgeprägten Unschärfe der *Kissing-Loop*-Bande deutlich wurde.

### 3.10 Einfluss der Temperatur auf die Bildung des *Kissing-Loop*-Produkts

Zur weiteren Charakterisierung von Faktoren, die eine Dissoziation von *Kissing-Loop*-Komplexen bewirken, wurde die Temperatur als Einflussgröße untersucht. Hierfür wurden drei verschiedene Tetraeder-*Kissing-Loop*-Strukturen untersucht. Es handelte sich hierbei um über *Kissing-Loop*-Hybridisierung verbundene Tetraeder mit einem, zwei oder drei *Loops* pro Tetraedermolekül, welche wiederum an verschiedenen Ecken lokalisiert waren. Um einen Zerfall der *Kissing-Loop*-Strukturen in Monomere zu detektieren, wurden die *Kissing-Loop*-Proben bei der zu testenden Temperatur inkubiert und anschließend in einer ebenso temperierten Elektrophoresekammer über 4 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Um ein

eindeutigeres Messergebnis zu erzielen, wurde die Intensität der Monomerbanden nach Fluoreszenzfärbung gemessen und als Umsatz des *Kissing-Loop*-Substrates dargestellt. Hierbei wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, die Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt und mittels statistischem t-Test ausgewertet. Es zeigte sich, dass ein Zerfall der *Kissing-Loops*-Strukturen abhängig von der Anzahl der für ein *Kissing-Loop* zur Verfügung stehenden *Loops* war. So zerfiel ein Produkt aus zwei miteinander hybridisierten 1-*Loop*-Tetraedern bereits bei einer Temperatur ab 30 °C und keine klare *Kissing-Loop*-Bande war ab einer Temperatur von 35 °C nach gelelektrophoretischer Trennung sichtbar. Ein Produkt aus zwei 2-*Loop*- oder zwei 3-*Loop*-Tetraedern wies dagegen auch bei 35–40 °C noch eine *Kissing-Loop*-Bande auf (Abbildung 19a). Erst ab einer Temperaturerhöhung auf über 40 °C



**Abbildung 19: Temperatur-Sensitivität der *Kissing-Loop*-Komplexe.**

*Kissing-Loop*-Produkte (KL) von miteinander hybridisierten 1-*Loop*-, 2-*Loop*- und 3-*Loop*-Tetraedern wurden auf temperierten 4 % Polyacrylamidgelen (TAE/Mg<sup>2+</sup>) auf ihre Stabilität unter erhöhter Temperatur getestet. Die Funktionalisierung durch Stamm-*Loop*-Strukturen aller getesteten Tetraeder befand sich an verschiedenen Tetraederecken. Es wurden je zwei gleichartige Tetraeder miteinander hybridisiert, wobei sie sich nur durch ihre Hybridisierungssequenz im *Loop* unterschieden (roter *Loop* = HP 1, blauer *Loop* = HP 2).

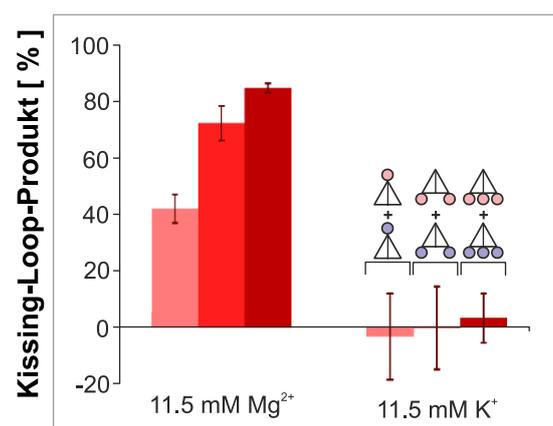
a) Beobachtete man das Bandenmuster der Proben zeigte sich bei niedrigen Temperaturen < 25 °C in allen Proben eine *Kissing-Loop*-Bande. Bei Temperaturerhöhung auf 30–35 °C konnte bereits bei einem Produkt aus hybridisierten 1-*Loop*-Tetraedern ein Zerfall beobachtet werden. Neben einer Monomerbande war hier auch eine Bande eines Intermediats (schwarzes Rechteck) zu sehen. Bei 35–40 °C lag der 1-*Loop*-Tetraeder ausschließlich als Monomer vor und ein Zerfall des Komplexes aus 2-*Loop*-Tetraedern konnte beobachtet werden. Auch hier zeigte sich eine intermediäre Bande, wohingegen das Produkt aus 3-*Loop*-Tetraedern stabil blieb und nur eine leichte Unschärfe der *Kissing-Loop*-Bande während des Gellaufes erkennbar wurde.

b) In einem Diagramm wurde der Zerfall der *Kissing-Loop*-Strukturen unter den jeweiligen Elektrophoresebedingungen dargestellt und statistisch ausgewertet. Interessanterweise lag auch bei über 40 °C das *Kissing-Loop*-Produkt aus 3-*Loop*-Tetraedern noch nicht vollständig dissoziiert in Form von Monomeren vor. Für dieses *Kissing-Loop*-Produkt konnte die höchste Temperaturstabilität festgestellt werden. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

waren sowohl die Strukturen aus 1-Loop- und 2-Loop-Tetraeder zerfallen, wohingegen noch nicht die gesamte Menge an 3-Loop-Tetraeder als Monomer vorlag, aber aufgrund der hohen Elektrophoretetemperatur eine *Kissing-Loop*-Bande mit starker Unschärfe wahrnehmbar war (siehe dazu Kapitel 9.4). Des Weiteren zeigte sich beim Zerfall der *Kissing-Loop*-Produkte auch eine weitere Bande zwischen der ursprünglichen Laufhöhe der *Kissing-Loop*-Produktbande und der Monomerbande, kurz bevor eine Temperatur erreicht wurde, an der alle Tetraeder als Monomer vorlagen. Dieses Intermediat war sowohl beim Auflösen des 1-Loop-, als auch beim Zerfall des 2-Loop-Tetraeders sichtbar. Im Falle des 3-Loop-Tetraeders zeigte sich bei 35 °C zwischen *Kissing-Loop*-Produkt und Monomerlaufhöhe eine nach unten auslaufende Unschärfe der *Kissing-Loop*-Bande (Abbildung 19a), die ab einer Temperatur von 40 °C an Intensität zunahm, während die Monomerbande intensiver wurde (Abbildung 28).

### 3.11 Einfluss der Ionenstärke auf die Bildung des *Kissing-Loop*-Produkts

Die Notwendigkeit der Anwesenheit von Magnesium oder alternativer Kationen bei der erfolgreichen Ausbildung eines *Kissing-Loop* konnte sowohl für RNA- (Barbault *et al.*, 2002; Mundigala *et al.*, 2014), als auch für DNA-Strukturen (Bois *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2014) gezeigt werden. In einem weiteren Stabilitätstest sollten daher *Kissing-Loop*-Strukturen auf eine Sensitivität gegenüber der Ionenkonzentration getestet werden. Hierfür wurden dieselben Stamm-Loop-Strukturen verwendet, welche auch zur Multimerisierung der Tetraeder zum Einsatz kamen. In einem weiteren Vorversuch wurden des Weiteren mit diesen *Hairpins*

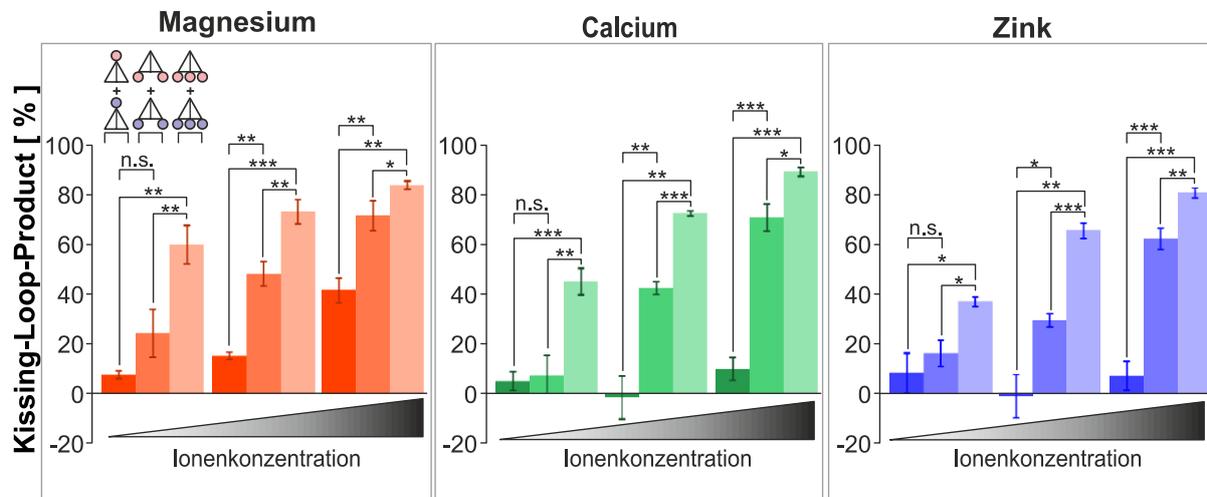


**Abbildung 20: *Kissing-Loop*-Annealing mono- und multifunktionaler DNA-Tetraeder in Anwesenheit von Magnesium- und Kaliumionen.**

In Anwesenheit von 11,5 mM Mg<sup>2+</sup> lässt sich für die drei getesteten *Kissing-Loop*-Produkte aus zwei miteinander hybridisierten 1-Loop-, zwei 2-Loop- und zwei 3-Loop-Tetraedern ein erfolgreiches *Kissing-Loop*-Annealing zeigen. Nach Austausch des Mg<sup>2+</sup> gegen K<sup>+</sup> kann, bei gleicher Versuchsdurchführung, kein *Kissing-Loop*-Produkt nachgewiesen werden. Die Proben wurden bei < 25 °C auf 4 % Polyacrylamidgelen (TA) mit jeweils 11,5 mM Mg<sup>2+</sup> und 11,5 mM K<sup>+</sup> aufgetrennt und nach Elektrophorese mittels Fluoreszenzfärbung gefärbt. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mittels ImageJ. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

multimerisierte DNA-Tetraeder in einem Ansatz mit 11,5 mM  $Mg^{2+}$ , sowie einem weiteren Ansatz mit 11,5 mM des einwertigen Kaliums ( $K^+$ ) getestet. Hierbei zeigte sich, dass ein Austausch des  $Mg^{2+}$  gegen  $K^+$  ein *Kissing-Loop-Annealing* verhinderte (Abbildung 20). Für die Auswertung der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbten 4 % PAGE-Gele wurde die Intensität der Monomerbande gemessen, so konnte aus einer Zunahme an Monomer der Zerfall des entsprechenden *Kissing-Loop*-Produkts beobachtet werden und die Menge an *Kissing-Loop*-Produkt bei der jeweilig eingesetzten Ionenkonzentration ermittelt werden.

Die Wirkung weiterer bivalenter Kationen auf die Stabilität der *Kissing-Loop*-Produkte wurde durch den Austausch von  $Mg^{2+}$  gegen  $Ca^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  getestet (Abbildung 21). Hierfür wurden erneut mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, um eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Der Einfluss der Ionenstärke wurde für jedes Ion bei 0,625 mM, 1,25 mM und 11,5 mM getestet. Erstaunlicherweise ließ sich  $Mg^{2+}$  sowohl durch  $Ca^{2+}$  und als auch  $Zn^{2+}$  als zweiwertige Kationen wirkungsvoll ersetzen, was vor allem bei erhöhter *Loop*-Zahl (2-*Loop*- und 3-*Loop*-Tetraeder) deutlich wurde. Dabei war allerdings für Zink ein leicht verringerter Effekt nachweisbar, was sich wiederum durch eine leicht reduzierte Menge an

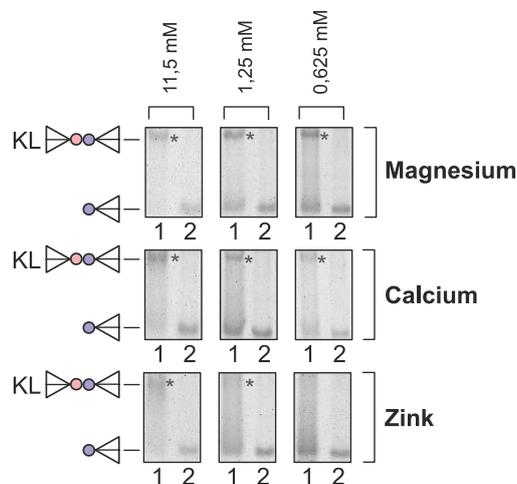


**Abbildung 21: Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität von *Kissing-Loop*-Strukturen**

Sowohl in Anwesenheit von Magnesium (orange), Calcium (grün) und Zink (blau) konnte eine Stabilität der *Kissing-Loop*-Produkte von 1-*Loop*-, 2-*Loop* und 3-*Loop*-Tetraeder nachgewiesen werden. Die *Kissing-Loop*-Produkte bildeten sich durch *Annealing* der zueinander komplementären *Loop*-Bereiche der Stamm-*Loop*-Strukturen HP 1 (roter *Loop*) und HP 2 (blauer *Loop*). Die Stabilität der *Kissing-Loop*-Produkte hing dabei von der Art der Kationen und der Anzahl der für ein *Kissing-Loop* zur Verfügung stehenden *Loops* ab. Es wurde jeweils eine Konzentration von 0,625 mM, 1,25 mM, und 11,5 mM getestet. Die höchste Stabilität der *Kissing-Loop*-Komplexe zeigte sich bei hybridisierten Tetraedern, die drei *Loop*-Strukturen besaßen und in Anwesenheit von 11,5 mM hybridisiert wurden, wohingegen 1-*Loop*-Tetraeder-Komplexe nur in Anwesenheit von 11,5 mM  $Mg^{2+}$  eine hohe Stabilität aufwiesen.  $Zn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  konnten hier Magnesium nicht wirkungsvoll ersetzen. Auch 2-*Loop*-Tetraeder-Komplexe wiesen bei niedrigeren Konzentrationen eine leicht verringerte Stabilität, bei Austausch von  $Mg^{2+}$  gegen  $Ca^{2+}$  und  $Zn^{2+}$ , auf. Für die Ermittlung der Ergebnisse wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und die fluoreszenzgefärbten 4 % Polyacrylamidgele mittels ImageJ ausgewertet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

*Kissing-Loop*-Produkt aus hybridisierten *2-Loop*- und *3-Loop*-Tetraedern bemerkbar machte. In allen getesteten Fällen konnte der höchste Umsatz zu *Kissing-Loop*-Produkt bei der höchsten getesteten Konzentration (11,5 mM), in Kombination mit der höchsten getesteten Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen pro Tetraeder (*3-Loop*-Tetraeder-*Annealing*), festgestellt werden.

Ausschließlich die *Kissing-Loop*-Produkte von *1-Loop*-Tetraedern zeigten eine starke Abhängigkeit zum jeweilig eingesetzten Kation. So konnten  $Zn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  in diesem Fall die Wirkung von  $Mg^{2+}$  bei gleicher Konzentration nur schwach kompensieren, dies zeigte sich durch einen deutlich größeren Zerfall zu Monomeren. Die geringste Stabilität wiesen Komplexe in Zink-Puffer auf (Abbildung 22). In Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  konnte bei jeder Konzentration eine *Kissing-Loop*-Produktbande beobachtet werden. Bei Einsatz von Zinkpuffer ließ sich nur eine schwache *Kissing-Loop*-Bande nachweisen, die erst bei einer Konzentration von 1,25 mM sichtbar wurde. Die Ergebnisse zeigten zusammengefasst eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen, welche über Ausbildung eines *Kissing-Loop* hybridisieren können, und der Wahl und Konzentration des jeweiligen Kations.

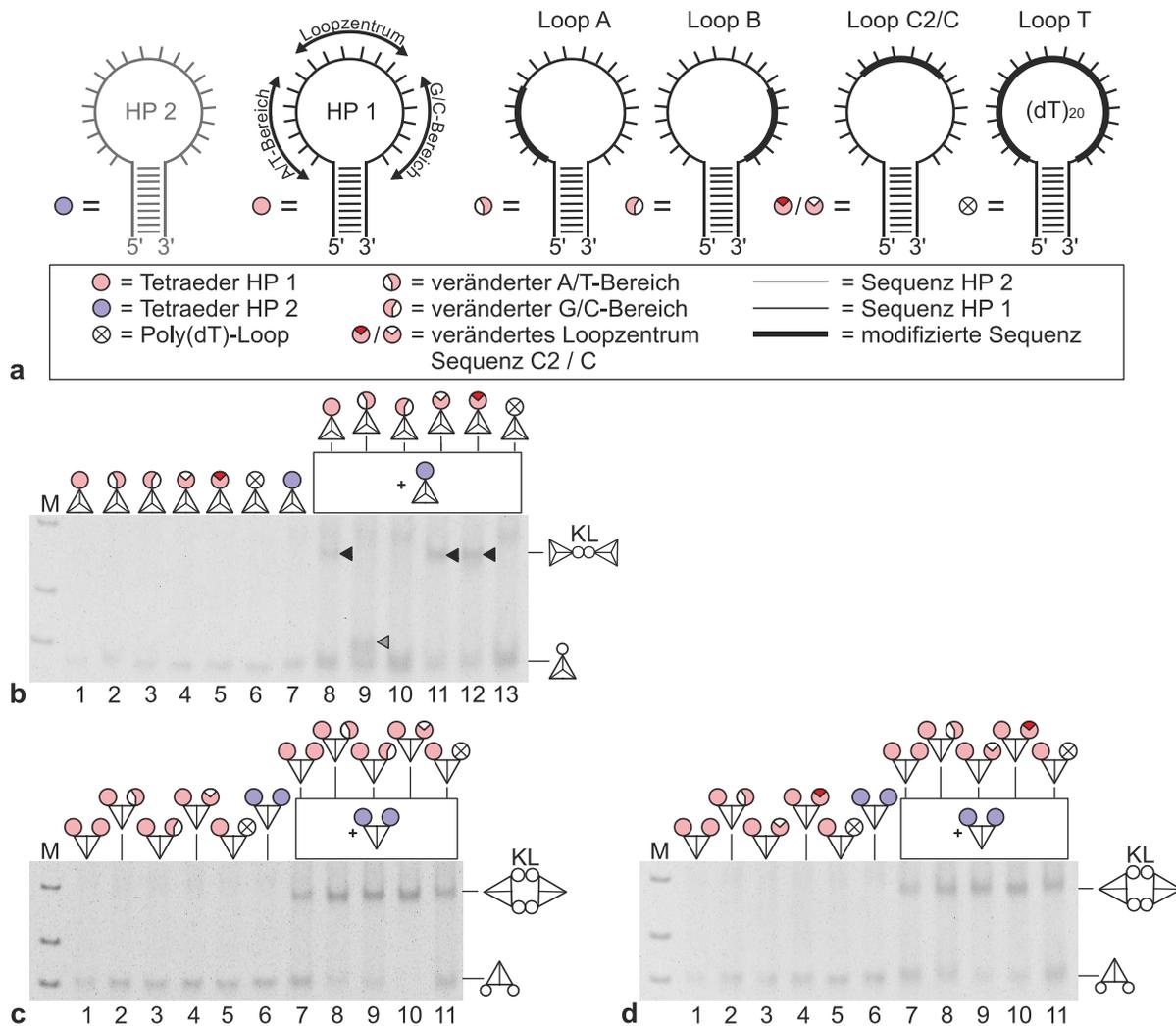


**Abbildung 22: Einfluss von Magnesium, Calcium und Zink auf die Bildung einer *Kissing-Loop*-Bande am Beispiel von hybridisierten *1-Loop*-Tetraedern.**

In Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ , im Austausch gegen  $Mg^{2+}$ , konnte nur eine sehr schwache *Kissing-Loop*-Komplex-Bande (\*) bei 0,625 mM nachgewiesen werden, die bei *Annealing* in Zink-Puffer fehlt. Erst ab einer Konzentration von 1,25 mM lässt sich für diesen Tetraeder auch eine *Kissing-Loop*-Komplex-Bande in Gegenwart von Zink nachweisen. Insgesamt sind die Banden in Anwesenheit von Zink weniger scharf, als unter Einfluss von Calcium und Magnesium. Die Monomerkontrolle (2) und der *Kissing-Loop*-Ansatz (1) wurden bei  $< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  jeweils auf fluoreszenzgefärbten 4 % Polyacrylamidgelen mit der entsprechenden Ionenkonzentration (0,625 mM, 1,25 mM, 11,2 mM) analysiert.

### 3.12 Identifikation der hybridisierenden Bereiche innerhalb des *Loops*

In der Literatur finden sich zur DNA-*Kissing-Loop*-Hybridisierung verschiedene Modelle dazu, über welche Bereiche des *Loops* ein *Annealing* stattfindet. Nicht hybridisierende Bereiche bieten beispielsweise Angriffspunkte für ein gezieltes und verbessertes *Strand Displacement*, darüber hinaus kann die Basenzusammensetzung der paarenden Bereiche, die die Anzahl sich bildender Wasserstoffbrücken festlegt, die Stabilität gegenüber den bereits getesteten Einflussfaktoren, Ionenkonzentration und Temperatur, beeinflussen. Auch im Vorfeld durchgeführte Versuche gaben einen Hinweis darauf, dass die Position des Hybridisierungsbereichs innerhalb des *Loops* einen wichtigen Einfluss auf das *Kissing-Loop-Annealing* hat (siehe auch Kapitel 9.1). Zur weiteren Klärung dieser Frage wurde im Folgenden die *Loop*-Sequenz HP 1 an drei Bereichen gezielt durch Basenaustausch verändert (Kapitel 2.1.6, Abbildung 6). Der Austausch der Basen hatte einen Verlust der totalen Komplementarität zur *Loop*-Sequenz HP 2 zur Folge. Die veränderten *Loop*-Sequenzen besaßen entweder sechs *Mismatch*-Basen im 5'-lateralen A/T-reichen Bereich (*Loop A*), sechs ausgetauschte Basen im 3'-lateralen G/C-reichen Bereich (*Loop B*) oder eine Folge von sechs *Mismatch*-Basen im zentralen *Loop*-Bereich. Für die Analyse des zentralen Bereiches standen jeweils zwei verschiedene Sequenzen zur Verfügung, *Loop C* wurde durch den Basenaustausch, analog zu *Loop A* und B, nicht in seinem Purin- und Pyrimidingehalt verändert, wodurch sich die Zusammensetzung aus Cytosin- und Thyminbasen nicht veränderte. Aus diesem Grund wurde eine weitere *Loop*-Sequenz (*Loop C2*) getestet, welche durch den Austausch in einer A/G-reichen Sequenz im zentralen *Loop* verändert wurde (Abbildung 23a). Die Fähigkeit zur *Kissing-Loop*-Bildung der veränderten *Loop*-Strukturen wurde getestet, indem 1-*Loop*-Tetraeder mit den veränderten Stamm-*Loop*-Strukturen funktionalisiert wurden. Diese wurden in einem Standard-*Kissing-Loop-Annealing* mit einem Tetraeder HP 2 hybridisiert und die Ausbeute an entstandenem *Kissing-Loop*-Produkt analysiert (Abbildung 23b, d). Weiterhin wurden auch 2-*Loop*-Tetraeder getestet, indem ein Tetraeder sowohl mit einer *Loop*-Sequenz HP 1, als auch jeweils mit einer der zu testenden veränderten *Mismatch-Loop*-Sequenzen, funktionalisiert wurde (Abbildung 23d, e). Nach Hybridisierung mit einem 2-*Loop*-Tetraeder der zwei HP 2-*Loop*-Sequenzen besaß, wurde auch hier die Effektivität des *Kissing-Loop-Annealing* ausgewertet. Als Vergleichskontrollen dienten jeweils Tetraeder mit der vollständigen HP 1-Sequenz, als auch Tetraeder mit einer Poly(dT)-Sequenz. Letztere konnte aufgrund einer vollständig veränderten *Loop*-Sequenz mit 20 aufeinander folgenden Thyminhaltigen Nukleotiden an keiner Hybridisierung mit HP 2 mehr teilnehmen (Abbildung 23a).



**Abbildung 23: Mismatch-Analyse von Kissing-Loop-Komplexen.**

a) Zur Identifizierung der bei einem *Kissing-Loop* (◄, KL) ausgebildeten Basenpaare wurden sechs verschiedene *Loop*-Sequenzen eingesetzt. Ausgehend von *Loop*-Sequenz HP 1 (rot) wurden drei veränderte Varianten getestet, diese wiesen jeweils sechs Nukleotide lange Basenaustauschsequenz auf. *Loop* A wurde durch Basenaustausch im 3'-lateralen AT-reichen Bereich verändert und *Loop* B hatte im Vergleich zu *Loop* HP 1 im 5'-lateralen G/C-reichen Bereich sechs ausgetauschte Nukleotide. *Loop* C und C2 wurden im zentralen *Loop*-Bereich verändert. Durch den Austausch entstand in *Loop* A aus der A/T-reichen 3'-lateralen Sequenz eine G/C-reiche Sequenz und umgekehrt im *Loop* B eine zweite A/T-reiche Sequenz. *Loop* C verlor ebenfalls seine Komplementarität im veränderten *Loop*-Bereich, behielt jedoch einen C/T-reiche zentralen Bereich, im Vergleich dazu erhielt *Loop* C2 eine A/G-reiche Zentralsequenz. Als Negativkontrolle ohne Komplementarität zu HP 2 wurde eine Stamm-*Loop*-Struktur mit Poly(dT)-*Loop* (*Loop* T) eingesetzt. Alle *Loop*-Strukturen wurden mit *Loop*-Sequenz HP 2 (blau) hybridisiert.

b) 1-*Loop*-Tetraeder mit *Loop*-Sequenz HP 1 (1), A (2), B (3), C (4), C2 (5) und T (6) wurden jeweils mit dem 1-*Loop*-Tetraeder HP 2 (7) inkubiert (8–13). Kein *Kissing-Loop-Annealing* fand nach Inkubation mit *Loop* T (13) und *Loop* B (10) statt. In Anwesenheit von *Loop* A entstand ein intermediäres Produkt (grauer Pfeil), jedoch wurde nur ein Teil des Monomers umgesetzt (9). Die Hybridisierung mit *Loop* C und C2 führte im Vergleich zur Inkubation mit *Loop* HP 1 (8) ebenfalls zu einem *Kissing-Loop*-Produkt, dieses jedoch in leicht erhöhter KL-Ausbeute, sowie einer parallel dazu stärkeren Abnahme an Monomer (11, 12).

c) Weiterhin wurden ebenfalls 2-*Loop*-Tetraeder mit jeweils einer *Loop*-Sequenz HP 1 und einem zweiten veränderten Stamm-*Loop* in einem *Kissing-Loop*-Ansatz mit dem 2-*Loop*-Tetraeder HP 2 (6) hybridisiert. Hierfür wurden 2-*Loop*-Tetraeder mit *Loop* A (2), *Loop* B (3), *Loop* C (4) und *Loop* T (5), sowie eine Kontrolle mit zwei *Loop*-Sequenzen HP 1 (1) eingesetzt.

Die Fortsetzung der Legende befindet sich auf der nächsten Seite.

**Fortsetzung Legende Abbildung 23**

d) Analog zu den getesteten Tetraedern (*Loop* HP 1 (1), *Loop* A (2), *Loop* C (3) und *Loop* T (5)) aus (c) wurde in einem weiteren Versuchsansatz zusätzlich ein 2-*Loop*-Tetraeder mit *Loop*-Sequenz C2 (4) mit dem 2-*Loop*-Tetraeder HP 2 (6) inkubiert. Die Hybridisierung von 2-*Loop*-Tetraedern mit veränderter zentraler *Loop*-Region (*Loop* C und C2) und 2-*Loop*-Tetraeder HP 2 führte, im Vergleich zur Kontrolle mit HP 1 (7) und *Loop* T (11) zu einem stark verbesserten Umsatz von Monomer zu *Kissing-Loop*-Produkt (c10, d9, d10). Auch die Analyse von 2-*Loop*-Tetraedern mit *Loop*-Sequenz A (c8, d8) und *Loop* B (c9) weisen eine erhöhte Menge *Kissing-Loop*-Produkt im Vergleich zur Hybridisierung mit dem 2-*Loop*-Tetraeder HP 1 (7).

Alle Proben wurden auf niedrig temperierten 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgelen analysiert. Als Größenstandard wurde der GenRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific (300 bp, 200 bp, 150 bp) verwendet. Abbildungen verändert nach Barth *et al.*, 2016.

Die Effizienz der Hybridisierung, nach Inkubation der veränderten 1-*Loop*-Tetraeder mit Tetraeder HP 2, wiesen deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Ansätzen auf. Im Vergleich zu Negativkontrolle konnte nur bei *Loop* C und *Loop* C2 ein *Kissing-Loop*-Produkt auf Höhe des doppelten Molekulargewichtes der Monomere (~ 250 bp) nachgewiesen werden. Keine Hybridisierung fand dagegen in Anwesenheit von *Loop* B und mit fehlendem G/C-reichen 3'-lateralen Bereich, statt und war identisch mit der Negativkontrolle (Poly(dT)-*Loop*). Im Vergleich dazu erschien nach Inkubation von Tetraeder *Loop* A mit Tetraeder HP 2 jedoch eine intermediäre Bande, welche bereits beim temperaturabhängigen Zerfall von *Kissing-Loop*-Produkten nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.10). Im Vergleich der Intensität der *Kissing-Loop*-Produktbande und der Abnahme an Monomer zwischen *Loop* C und C2 fiel kein Unterschied auf, jedoch zeigte sich im Vergleich zur Positivkontrolle (*Loop* HP 1) eine leicht erhöhte Ausbeute, was vor allem durch eine gering schwächer gefärbte Monomerbande deutlich wurde. Die für 1-*Loop*-Tetraeder beobachteten Ergebnisse ließen sich auch im Versuch mit dem 2-*Loop*-Tetraeder reproduzieren, so konnte ein 2-*Loop*-Tetraeder mit einem *Loop* C oder *Loop* C2 wesentlich besser zu *Kissing-Loop*-Produkt umgewandelt werden, was sich in einer deutlich schwächeren Monomerbande und einer intensiveren *Kissing-Loop*-Bande widerspiegelte. Im Versuch mit dem 2-*Loop*-Tetraeder konnte allerdings auch *Kissing-Loop*-Produkt gebildet werden, wenn ein Poly(dT)-*Loop* verwendet wurde, dies spiegelte sich auch in den Proben mit *Loop* A und *Loop* B wider, hier lag die Ausbeute an *Kissing-Loop* jedoch deutlich höher und konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen auch ein wesentlich verbessertes *Kissing-Loop*-Annealing im Vergleich zum 2-*Loop*-Tetraeder mit zwei *Loop*-Sequenzen HP 1 erreichen. Die Ausbeutemenge lag nur knapp unter der mit *Loop* C und *Loop* C2 erreichten, aber deutlich über der der Kontrollen.

## 4 DISKUSSION

Nanomaterialien spielen in Wissenschaft und Technik eine immer größere Rolle. Dabei müssen sowohl Chancen als auch Risiken der verwendeten Nanomaterialien gegeneinander abgewogen werden. Im Spezialfall der medizinischen Anwendung von Nanomaterialien im Menschen müssen verschiedenen Aspekte berücksichtigt werden. Einerseits müssen sich Nanomaterialien durch eine gewisse Stabilität auszeichnen, damit sie nach Applikation den gewünschten Zielort im Organismus erreichen, ohne bereits vorher in erheblichen Maße abgebaut zu werden. Andererseits sollte eine nicht zu lange Halbwertszeit im menschlichen Organismus ermöglichen, dass diese Nanomaterialien, nach einer gewissen Zeit rückstandsfrei abgebaut sein können. Für den medizinischen Einsatz müssen Nanomaterialien biokompatibel sein, d.h. weder allergische noch toxische Reaktionen auslösen. Auch die Herstellung solcher Nanomaterialien sollte einfach und preiswert zu verwirklichen sein. Für den gezielten Einsatz sollte es darüber hinaus möglich sein, erwünschte Eigenschaften durch eine zusätzliche Funktionalisierung zu erhalten. Diese Funktionalisierung könnte z.B. den Kontakt zu Zielzellen herstellen oder zur Bindung und gezielten Freisetzung von Wirkstoffen führen (Komplexbildung und -dissoziation). Dies setzt aber eine genaue Kenntnis der hierfür entscheidenden Reaktionsparameter voraus. Im Weiteren soll diskutiert werden, warum die hier vorgestellten mit Stamm-*Loop*-Sequenzen funktionalisierten DNA-Tetraeder besonders für biomedizinische Anwendungen geeignet sind und welche neuen Erkenntnisse über Reaktionsparameter und Charakteristika des *Kissing-Loop-Annealings* von DNA-Tetraedern gewonnen werden konnten.

### 4.1 DNA-Tetraeder in der Nanotechnologie

Die in dieser Arbeit untersuchten DNA-Tetraeder weisen, für den Einsatz als Nanostrukturen, vielversprechende Eigenschaften auf. Komplette aus dem Biomolekül Desoxyribonukleinsäure bestehend, sind sie gut abbaubar, da der Organismus über die enzymatische Grundausstattung verfügt, diese zu erkennen und innerhalb einer bestimmten Inkubationszeit rückstandslos abzubauen. Auch in der Umwelt haben biologische Materialien wie die DNA eine relativ kurze Lebensdauer, während nicht-biologische Stoffe, beispielweise Metall-Nanopartikel, länger für Organismen verfügbar bleiben, ehe sie agglomerieren und im Erdreich sedimentieren (Möller *et al.*, 2013). Die Gefahr der Akkumulation DNA-basierender Nanopartikel in

lebensnotwendigen und stark durchbluteten Geweben wird durch den natürlichen Abbau im Organismus reduziert. Somit ist bei diesen DNA-basierenden Tetraedern nicht mit krankheitsbegünstigenden Langzeitnebenwirkungen, wie sie für nichtbiologische Nanomaterialien zahlreich nachgewiesen sind (Möller *et al.*, 2013), zu rechnen. Durch moderne Verfahren, wie chemische Oligonukleotid-Festphasensynthese, lassen sich Nukleinsäuren zunehmend kostengünstiger produzieren, weshalb DNA-basierende Materialien in Zukunft auch für nanotechnologische Einsatzbereiche ökonomisch attraktiver werden. Weiterhin bietet sich auch eine molekular- und biotechnologische Verarbeitung und Produktion an, wie bereits für DNA-Tetraeder durch eine partielle *in vivo* Synthese des DNA-Tetraeders gezeigt werden konnte (Li, *et al.*, 2009). Der Einsatz bereits etablierter molekularbiologischer Enzyme, wie den DNA-Polymerasen in der Polymerasekettenreaktion (PCR), wird durch die Prozessierung von DNA-Strukturen durch weitere Enzyme wie Endonukleasen (beispielsweise Restriktionsenzyme), Exonukleasen, Ligasen oder Polynukleotidkinasen ergänzt. Weiterhin stehen durch die sehr große Anzahl natürlich vorkommender DNA-assoziiertes Biomoleküle neben unzähligen Proteinen auch Lipide oder weitere Nukleinsäure-Moleküle (bspw. Ribonukleinsäure-Moleküle) für die Modifikation der DNA-Nanostruktur zur Verfügung (Lee *et al.*, 2012; El Tannir *et al.*, 2015; Stephanopoulos *et al.*, 2015). Mit diesen DNA-assoziierten Strukturen gehen dabei auch wieder neue Eigenschaften und somit neue Einsatzmöglichkeiten für die Zukunft einher.

## 4.2 Funktionalisierung von DNA-Tetraedern durch *Hairpin*-Strukturen

Die hier zur Modifikation von DNA-Tetraedern eingesetzten *Hairpin*-Strukturen sind ein auf dem Vorbild der Natur basierendes Biomimikry. In der Natur kommen *Hairpin*-Strukturen hauptsächlich als Sekundärstruktur von einzelsträngiger RNA vor. In dieser Arbeit sollte ihre Einsatzfähigkeit als Funktionalisierung von DNA-Tetraedern getestet werden.

Bei einer Funktionalisierung mit *Hairpin*-Strukturen stellte sich die Frage, an welcher Position des Tetraeders eine Sekundärstruktur sinnvoll anzubringen ist. Eine einzelne *Hairpin*-Struktur konnte zuvor bereits an einer Kante eines DNA-Tetraeders angebracht werden, was diesen für einen Einsatz als molekularen Schalter (Abi *et al.*, 2014) oder Lichtsensor (Han *et al.*, 2011) geeignet machen könnte. Die Kanten des in dieser Arbeit verwendeten Tetraeders bestehen aus 20 Basenpaaren und gewährleisteten die korrekte und effektive Assemblierung des Tetraeders (Goodman *et al.*, 2005). Eine größere Anzahl an *Hairpin*-Strukturen innerhalb der Kanten könnte demnach die Assemblierung des Tetraeders negativ beeinflussen, würde man die

Kantenlänge und somit die Größe des Tetraeders nicht anpassen. Um diesen Umstand zu umgehen, aber dennoch eine hohe Anzahl an *Hairpin*-Strukturen pro Tetraeder zu erreichen, wurden diese, in der vorliegenden Arbeit, an den Ecken der Tetraeder positioniert. Ein nichtfunktionalisierter Tetraeder besitzt hier pro DNA-Strang ein ungepaartes Nukleotid (Adenin-Base), welches wie ein Gelenk fungiert und die Faltung des Tetraeders ermöglicht. Durch Austausch dieses Nukleotids gegen eine *Hairpin*-Struktur, welche wiederum von nun zwei ungepaarten Adeninen flankiert wurde, konnte die Flexibilität für die Assemblierung aufrechterhalten werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zunächst bis zu vier zusätzliche *Stamm-Loop*-Strukturen pro Tetraeder getestet, was einer noch erweiterten Modifikation des Systems durch eine höhere Anzahl an *Hairpin*-Strukturen jedoch nicht widerspricht. Die *DNA-Hairpin*-Strukturen waren dabei in jeweils einen der vier, den Tetraeder aufbauenden Stränge integriert (Abbildung 5), wodurch es möglich war viele verschiedene Tetraedermodelle aus einer geringen Anzahl an DNA-Strängen, ähnlich einem Baukastenprinzip, zu etablieren. Durch die Verwendung verschiedener DNA-Stränge für die Funktionalisierung mit *Hairpin*-Strukturen ergibt sich also ein modulares System und verschiedene DNA-Tetraeder können, im Gegensatz zu DNA-Origami (Ke *et al.*, 2009), aus nur wenigen kurzen Oligonukleotidsträngen assembliert werden. Hierbei ist es möglich mit nur wenigen Änderungen der Sequenz (beispielsweise durch Austausch nur eines Strangs) Strukturänderungen herbeizuführen. Allerdings ist auch die bereits erwähnte Herstellung von DNA-Tetraedern mit zusätzlicher DNA-Funktionalisierung durch Replikation *in vitro* oder auch *in vivo* in Zukunft nicht ausgeschlossen (Li *et al.*, 2009), da zusätzliche *Hairpin*-Strukturen alternativ auch in einen einzigen, den Tetraeder bildenden, Strang integrierbar sind. Da sich pro Tetraederecke jeweils drei DNA-Stränge treffen, kann jeder von ihnen durch eine *Stamm-Loop*-Struktur erweitert werden. Dies ermöglicht beispielsweise bei den insgesamt vier Ecken pro Tetraeder bereits  $3^4 = 81$  verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, wenn nur jeweils ein *DNA-Hairpin* pro Ecke hinzugefügt werden soll. Da aber prinzipiell jeder Strang pro Ecke genutzt werden kann, um weitere *Stamm-Loop*-Strukturen anzubringen, erhöht sich die Anzahl der Kombinationsmöglichkeiten. Auch der Einsatz unterschiedlicher *Stamm-Loop*-Strukturen kann die Möglichkeiten noch einmal weiter vergrößern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Multifunktionalisierung an derselben Ecke als auch an verschiedenen Tetraederecken gleichzeitig möglich ist.

So gelang neben der Herstellung von monofunktionalisierten und an jeweils verschiedenen oder jeweils der gleichen Ecke di- oder trifunktionalisierten Tetraedern, auch die Assemblierung eines Tetraeders mit einer Kombination aus je einer DNA-*Hairpin*-Struktur an zwei Ecken und zwei weiteren DNA-*Hairpin*-Strukturen an der dritten Ecke (Kapitel 3.1). Dies verdeutlicht für das in dieser Arbeit gewählte System eine nicht nur theoretische sondern auch praktisch umsetzbare Vielzahl von möglichen Kombinationen für die Funktionalisierung der Tetraeder. Die Funktionalisierung der Tetraeder durch Stamm-*Loop*-Strukturen ist demnach vorrangig nur durch den Zweck der angedachten Anwendung begrenzt, die unter entsprechenden Umständen eine bestimmte Kombination modifizierter Ecken mit einer bestimmten Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen sinnvoll macht. Dies soll im Weiteren erläutert werden.

#### 4.2.1 Assemblierung funktionalisierter Tetraeder

Zu Beginn der Arbeit musste geklärt werden, wie eine störungsfreie Assemblierung der Tetraeder auch mit zusätzlichen sekundären Strukturen zu gewährleisten ist (Kapitel 3.1). Bereits bei der Auswahl geeigneter Reaktionspuffer zeigte sich, dass sich funktionalisierte Tetraeder aufgrund der zusätzlichen Stamm-*Loop*-Strukturen anders verhalten als der nichtfunktionalisierte Tetraeder. Während eine Assemblierung nichtfunktionalisierter Tetraeder bereits in Reinstwasser oder salzarmem TM-Reaktionspuffer gelingt, kommt es beim korrekten Zusammenbau der modifizierten Tetraeder zu Ausbeuteverlusten durch falsch hybridisierte Sekundärprodukte. Dieser Effekt nimmt mit der Anzahl an Stamm-*Loop*-Strukturen, die für die Funktionalisierung eines Tetraeders verwendet werden, zu. Dies ist auf die Verlängerung der DNA-Stränge zurück zu führen. Dennoch erhöhen zusätzliche *Hairpin*-Strukturen die Ausbeute an korrekt hybridisierten Tetraedern, sobald eine ausreichende Menge an Salzen mit einem bivalenten Kation zugeführt wird (Abbildung 7). Dieses Kation ist im Standardhybridisierungspuffer Magnesium ( $Mg^{2+}$ ). Dies wiederum führt bei einer zunehmenden Anzahl an *Hairpin*-Stammbereichen auch zu einer begünstigteren, zunehmend verlustfreien Assemblierung der Tetraeder. Der Originaltetraeder ohne Stamm-*Loop*-Strukturen bildet unter erhöhten Salzkonzentrationen (beispielsweise in Reaktionspuffern für Nukleasen oder Ligasen) eine mengenmäßig bedeutsame Sekundärstruktur, die aufgrund ihrer Bandenlaufhöhe auf Höhe eines Dimers, als teilweise catenierter, inkorrekt assemblierter Tetraeder verstanden werden kann. Dieses Nebenprodukt lässt sich jedoch mit zunehmender Anzahl an verwendeten Stamm-*Loop*-Strukturen nur noch in sehr geringem Umfang nachweisen. Zusammengefasst zeigt dies, dass bei Verwendung zusätzlicher

Sekundärstrukturen auch ein verändertes Assemblierungsverhalten zu berücksichtigen ist, welches in hohem Maß auch von den gewählten Pufferbedingungen abhängt.

#### 4.2.2 *Kissing-Loop-Annealing* funktionalisierter Tetraeder

Die Möglichkeit einer Funktionalisierung von DNA-Tetraedern konnte in Arbeiten anderer Autoren gezeigt werden, indem einer der den Tetraeder bildenden DNA-Stränge über den Tetraeder hinaus verlängert wurde (Bu *et al.*, 2013). Der Einzelstrang konnte in Anwesenheit von ATP dieses binden und somit als Teil eines Biosensors für den ATP-Nachweis fungieren. Ein so angebrachter Einzelstrang ermöglichte auch weitere Interaktionen, wie z.B. eine ungeordnete Multimerisierung (Zhou *et al.*, 2014), oder die Anheftung von weiteren Molekülen, wie Streptavidin-bedeckte Quantenpunkte (engl. *quantum dots*) (Wang *et al.*, 2012). Auch zur Immobilisierung von Tetraedern an Oberflächen (z.B. Goldoberflächen; Leitner *et al.*, 2011), sowie zur Biofunktionalisierung dieser durch Bindung weiterer funktioneller Biomoleküle (z.B. Biotin und Avidin) wurde ein DNA-Einzelstrang verwendet (Schlapak *et al.*, 2012).

Die in dieser Arbeit verwirklichte Funktionalisierung von DNA-Tetraedern durch nach außen gerichtete DNA-*Hairpin*-Strukturen bietet einige wichtige Vorteile gegenüber der Funktionalisierung durch DNA-Einzelsträngen oder andere Biomoleküle.

Zunächst kann hier aufgeführt werden, dass die kovalente Verknüpfbarkeit der Einzelstränge des DNA-Tetraeders (Goodman *et al.*, 2005) auch mit zusätzlicher Funktionalisierung durch *Hairpin*-Strukturen erhalten bleibt. Dies verleiht den DNA-Tetraedern eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber exogenen Einflüssen, wie beispielsweise nukleolytischem Abbau durch Exonukleasen (Kapitel 3.2). Diese Widerstandsfähigkeit konnte auch für die Präparation von funktionalisierten Tetraedern genutzt werden, indem z.B. ein exonukleolytischer Verdau der fehlerhaften Sekundärprodukte und eine anschließende Gelextraktion nach elektrophoretischer Trennung durchgeführt werden konnten.

Der entscheidende Vorteil, den die gewählte Art der Funktionalisierung durch *Hairpin*-Strukturen gegenüber anderen Funktionalisierungen aufweist, ist ihre Fähigkeit, über komplementäre *Loop*-Bereiche miteinander zu hybridisieren (*Kissing-Loop-Annealing*). Die *Kissing-Loop*-Struktur ist dabei wesentlich variabler einzusetzen als z.B. andere Biomoleküle und bietet eine große Anzahl möglicher Steuerparameter zur Kontrolle der *Kissing-Loop*-Bildung und -Auflösung, wie später ausführlich diskutiert wird. Biomoleküle die, wie Avidin und Biotin, immer gleiche Zielstrukturen binden begrenzen den möglichen Einsatzbereich.

DNA-*Hairpin*-Strukturen sind dagegen nicht in ihrer *Loop*-Sequenz festgelegt und können stark variiert werden, was durch Austausch der entsprechenden Sequenz leicht gewährleistet werden kann. Denkbar ist auch ein Einsatz mehrerer unterschiedlicher *Loop*-Sequenzen um verschiedene Funktionen zu vermitteln.

*Hairpin*-Strukturen erfüllen *in vivo* unterschiedliche Aufgaben (Brunel *et al.*, 2002). Zum einen kann über die einzelsträngige *Loop*-Region der *Hairpin*-Strukturen eine komplementäre Zielsequenz erkannt werden wie z.B. bei der Codon-Erkennung durch den Anticodon-Arm der t-RNA. Zum anderen kann über die komplementären *Loop*-Regionen auch eine Dimer- und Multimerisierung erfolgen, wie z.B. bei der *BCD*-mRNA-Akkumulation in *D. melanogaster*. Dies ist beides auch für durch Stamm-*Loop*-Strukturen modifizierte künstliche Tetraeder denkbar, daraus ergibt sich sowohl die Möglichkeit eines Einsatzes als Sonde (Feng *et al.*, 2014; Martín-Fernández *et al.*, 2015), als auch die gezielte Bildung von Multimeren für verschiedene Einsatzbereiche. Wie auch in der Natur setzt dies jeweils eine entsprechende Komplementarität der einzelsträngigen *Loop*-Regionen voraus.

In dieser Arbeit wurden unter anderem zwei *Hairpin*-Strukturen (verändert nach Bois *et al.*, 2005; Abbildung 11) zur Funktionalisierung der Tetraeder verwendet, deren 20 Nukleotide langen *Loop*-Sequenzen (*Hairpin*-Sequenz (HP) 1 und *Hairpin*-Sequenz (HP) 2) vollständig komplementär zueinander waren. Wurden DNA-Tetraeder mit jeweils einem *Hairpin* HP 1 und einem *Hairpin* HP 2 miteinander inkubiert, führte dies in Anwesenheit von Magnesiumhaltigem Puffer (TAE/Mg<sup>2+</sup>) zum Erscheinen einer neuen Bande nach gelelektrophoretischer Trennung. In Anbetracht der Laufstrecken von Monomer und der neu auftretenden Bande, dem *Kissing-Loop*-Produkt, im Vergleich zum DNA-Größenstandard und unter Berücksichtigung weiterer Ergebnisse dieser Arbeit ließ sich für das entstandene Produkt vermuten, dass eine Dimerisierung über die einzelsträngigen *Loop*-Bereiche stattgefunden hatte (Abbildung 11). Weitere Experimente (s.u.) bestätigten die Dimerisierung. Weitere Produktbanden erschienen nicht, dies deutet darauf hin, dass keine zusätzlichen Hybridisierungen erfolgten (z.B. Trimer- oder Tetramerbildung). In der Negativkontrolle, bei der nichtfunktionalisierte Tetraeder unter identischen Bedingungen inkubiert wurden, erschienen keine Hybridisierungsprodukte, weswegen eine unspezifische Reaktion zwischen den Tetraedern ausgeschlossen werden kann. Durch die vorangegangene kovalente Verknüpfung der freien Enden und eine Aufreinigung der Tetraeder durch exonukleolytischen Verdau, kann auch eine Störung durch unspezifische Sekundärprodukte aus dem Assemblierungsschritt ausgeschlossen werden. Mit diesen

Ergebnissen konnte erstmals eine Hybridisierung von komplexeren DNA-Nanostrukturen, wie den hier verwendeten DNA-Tetraedern, über *Kissing-Loop-Annealing* gezeigt werden.

### 4.3 Sequenzspezifisch induzierbarer Zerfall der *Kissing-Loop*-Struktur

Für einen nanotechnologischen Einsatz besteht die Notwendigkeit nanoskalige Strukturen nicht nur fehlerfrei aufzubauen, sondern auch gezielt auflösen zu können, beispielsweise um die Bindung zur Zielstruktur aufzulösen oder um die Abgabe von eingeschlossenen Cargo zu ermöglichen. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten experimentell durch Einsatz eines sogenannten Katalysatorstrangs (engl. *opening strand*) für bestimmte vollständig komplementäre Stamm-*Loop*-Sequenzen und der daraus entstandenen DNA-*Kissing-Loop*-Struktur verwirklicht. Der Katalysatorstrang weist dabei eine vollständige Komplementarität zur 3'-Stammsequenz eines der zwei *Hairpins* auf. Durch eine *Strand Displacement*-Reaktion kommt es zur Verdrängung des 5'-Endes dieses Stammbereichs. Dieser frei werdende Einzelstrangbereich kann nun ebenfalls als Katalysator für die Auflösung des zweiten *Hairpin*-Stammbereiches dienen, da beide Stammbereiche identisch sind. Aufgrund der vollständigen Komplementarität wird der Katalysatorstrang schließlich aus dem Komplex verdrängt. Die Bindestelle des Katalysatorstrangs nennt man auch *Toehold* (aus dem Englischen für Ansatzpunkt). Dieser kann extern (Green *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2014) oder intern (Bois *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2006) bezogen auf den Stammbereich liegen. Letzterer löst eine *Strand Displacement*-Reaktion, durch das Fehlen oder die reduzierte Anzahl an freien Nukleotiden, deren Bindung für den Reaktionsstart nötig ist, wesentlich schlechter aus (Green *et al.*, 2006). Eine Degradierung der *Kissing-Loop*-Strukturen erfolgt bei der *Strand Displacement*-Reaktion durch eine streng sequenzspezifische Bindung, was unerwünschte Nebeneffekte verhindert. Die Bildung eines Duplex aus den DNA-*Hairpins* stellt eine irreversible Reaktion dar, da die Entstehung eines Duplex gegenüber der *Kissing-Loop*-Struktur thermodynamisch favorisiert wird.

Für nanotechnologische Anwendungen ist aber gerade eine reversible Reaktion sinnvoll (z.B. für molekulare Schalter). Hier bietet die kovalente Bindung von DNA-*Hairpin*-Strukturen an einen DNA-Tetraeder eine sehr gute Lösung. Als Resultat der kovalenten Bindung entsteht eine stabile *Hairpin*-Struktur. Dies führt auf der Ebene der *Kissing-Loop*-Komplexe, im Gegensatz zur metastabilen *Kissing-Loop*-Struktur einfacher DNA-*Hairpins*, zu einer *Kissing-Loop*-Struktur, die nicht in einen Duplex übergehen kann. Die Zugabe eines komplementären DNA-Einzelstrangs kann hier demnach die Auflösung der *Kissing-Loop*-Struktur verursachen, aber

die *Hairpin*-Struktur bleibt bestehen und damit auch die Möglichkeit eines erneuten *Kissing-Loop-Annealings* (z.B. durch Entzug des DNA-Einzelstrangs).

Im Falle eines funktionalisierten Tetraeders existieren Einzelstrangbereiche nur im *Loop* und im sehr kurzen „Gelenk“ am Ansatz des Stammbereichs. Letzteres wird durch je zwei den Stamm flankierende freie Adenin-haltige Nukleotide gebildet. Ein DNA-Einzelstrang muss, um eine solche *Kissing-Loop*-Struktur auflösen zu können daher einen einzelsträngigen Bereich im *Loop*, auch nach erfolgreichem *Kissing-Loop-Annealing*, binden können. Die hier getesteten 20 Nukleotide langen *Loop*-Bereiche (Bois *et al.*, 2005) können bei einem *Kissing-Loop-Annealing* nicht vollständig paaren, da eine Basenpaarung durch die helicale Windung des entstehenden Doppelstrangs zu torsionalem Stress führt (Romano *et al.*, 2012). Aus diesem Grund bleiben Nukleotide im *Loop* ungepaart und dienen als interner *Toehold* für den Einzelstrang. Die Verwendung von externen *Toeholds*, zur Auflösung der *Kissing-Loop*-Struktur, ist dagegen nur für *Hairpin*-Strukturen mit freien Enden möglich und findet bei der Auflösung von *Kissing-Loop*-Komplexen aus DNA-Tetraedern keine Verwendung. Die Auflösung der *Kissing-Loop*-Struktur muss daher über *Strand Displacement*-Reaktion im *Loop*-Bereich stattfinden. Für diesen Zweck kam ein Einzelstrang zum Einsatz, der eine zu HP 1 vollständige Komplementarität im *Loop*-Bereich (Tabelle 8) aufwies. Durch Verwendung dieses *Capping*-Oligonukleotids ließ sich im Folgenden ein DNA-*Kissing-Loop*-Komplex aus Tetraedern erfolgreich sequenzspezifisch auflösen. Für den Versuch wurden zwei miteinander über *Kissing-Loop*-Bindung hybridisierte monofunktionalisierte Tetraeder mit dem *Capping*-Oligonukleotid inkubiert und die Reaktion über 48 h beobachtet. Hierbei konnte eine deutliche Dissoziation des *Kissing-Loop*-Komplexes durch *Strand Displacement*-Reaktion erst nach Ablauf von 24 h beobachtet werden, und auch nach Ende der Beobachtungszeit lag noch *Kissing-Loop*-Produkt in geringem Umfang vor. Dies deutet auf eine bei 25 °C Inkubationstemperatur langsam stattfindende Reaktion hin und somit auf eine gewisse Stabilität des *Kissing-Loop*-Komplexes. In einem Kontrollexperiment wurde darüber hinaus Tetraeder HP 1 mit *Capping*-Oligonukleotid vorinkubiert, und anschließend Tetraeder HP 2 zugeführt. Der Komplex aus *Capping*-Oligonukleotid und HP 1 blieb über 48 h stabil und es ließ sich keine Bildung eines *Kissing-Loop*-Komplexes beobachten. Dies schließt eine Gleichgewichtsreaktion aus, was wiederum eine positive Eigenschaft für die Verwendung für nanotechnologische Anwendungen darstellt. Soll in Zukunft diese Reaktion als Teil eines Systems Einsatz finden, könnte die Reversibilität dieser Reaktion z.B. durch Entzug des *Capping*-Oligonukleotids aus dem Reaktionsansatz umgesetzt werden. Eine solche Rückreaktion wäre ebenfalls steuerbar, was einen großen Vorteil darstellt. Sie könnte über die

Paarung eines weiteren Einzelstrangs mit vollständiger Komplementarität zum *Capping*-Strang erreicht werden. Hierfür ließe sich der *Capping*-Strang durch einen externen *Toehold* ergänzen, der nun als Kontakt für den zweiten DNA-Einzelstrang dient. Die Reaktion mit dem zweiten Einzelstrang müsste dabei durch Anpassung der Sequenzlänge (Verlängerung) des *Toehold* energetisch begünstigt werden. Ähnliche Prozesse konnten an einfachen DNA-Substraten gezeigt werden (Seelig *et al.*, 2006; Zhang und Seelig, 2011). Der in dieser Arbeit eingesetzte *Capping*-Strang wies dabei bereits eine verlängerte Sequenz auf (80 Nukleotide, Tabelle 3), die als *Toehold* dienen könnte. Die bisherigen Ergebnisse zeigten keinen negativen Einfluss der Überlänge des *Capping*-Oligonukleotids auf die *Strand Displacement*-Reaktion.

#### **4.4 Einfluss der *Loop*-Anzahl auf die Stabilität von *Kissing-Loop*-Komplexen**

Für den nanotechnologischen Einsatz ist eine ausreichende Stabilität der *Kissing-Loop*-Strukturen notwendig. Zum Beispiel ist eine frühzeitige, unspezifische Auflösung, z.B. bei einem Transport von Cargomolekülen, zu verhindern, damit das Cargomolekül erst am Zielort entlassen wird. Im Weiteren wurden daher Tetraeder auch auf ihre Fähigkeit zur Bildung stabiler *Kissing-Loop*-Komplexe untersucht. Im Gegensatz zum monofunktionalisierten Tetraeder verfügen die multifunktionalisierten Tetraeder über die Möglichkeit auch über mehrere *Loop*-Bereiche zu hybridisieren, was neben dimeren auch multimeren Komplexe als Resultat möglich macht (Kapitel 3.9). Experimente mit variablen Konzentrationen an Tetraedern und verschiedenen Kombinationen an Tetraedern mit unterschiedlicher *Loop*-Anzahl zeigten deutlich, dass über die Angleichung der Konzentration an Hybridisierungspartnern gezielt eine Bildung von Multimeren verhindert und eine Dimerisierung gefördert werden kann. So führte in allen Ansätzen mit identischen Hybridisierungspartnern der Einsatz gleicher Konzentrationen zu einem prominenten *Kissing-Loop*-Produkt, (Abbildung 13, Abbildung 14) mit verdoppeltem apparentem Molekulargewicht im Vergleich zum eingesetzten DNA-Doppelstrang-Größenstandard, sowie zur beobachteten Bandenlaufhöhe des *Kissing-Loop*-Dimers des 1-*Loop*-Tetraeders (Abbildung 11). Für die hier bevorzugte Dimerisierung war die identische Anzahl der zueinander komplementären *Loop*-Bereiche entscheidend. Im Gegensatz dazu wurde bei Kombination von Tetraedern unterschiedlicher *Loop*-Anzahl der Bindungspartner mit jeweils reduzierter *Loop*-Anzahl stärker verbraucht (Abbildung 16). Letzteres deutet wiederum auf eine konkurrierende Multimerbildung hin, wobei in den jeweiligen Ansätzen auch entsprechende Multimerbanden

mit schrittweise zunehmendem Laufhöhenunterschied sichtbar wurden (Abbildung 16, Ansatz B, Spur 8 und 9). Im Vergleich der verschiedenen Tetraeder (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 17) untereinander fiel auf, dass eine Hybridisierung multifunktionalisierter Tetraeder verstärkt zu Dimerbildung führte, wenn die Stamm-*Loop*-Strukturen an derselben Tetraederecke positioniert waren. Tetraeder, deren *Hairpin*-Strukturen an verschiedenen Ecken lagen, wurden effektiver zu *Kissing-Loop*-Produkt umgesetzt, was an einem stärkeren Verbrauch der Monomere zu erkennen war. Doch führte dies nicht gleichzeitig zu einer erhöhte Ausbeute an Dimer. Dennoch blieb auch hier das Dimer die mengenmäßig bedeutsamste Produktbande. Verluste an Ausbeute sind daher vorrangig durch Multimerisierung zu größeren Komplexen mit stark verringerter Stabilität zu erklären, die während einer Gelelektrophorese rasch zerfallen. Dimere weisen demgegenüber eine erhöhte Stabilität auf, da sie über mehrere parallele *Kissing-Loop*-Strukturen verbunden sein können. Eine Denaturierung der *Kissing-Loop*-Bindungen hat somit nicht sofort die Auflösung des Dimers zur Folge, da ein anderes *Loop*-Paar beide Tetraeder in räumlicher Nähe zusammen hält und weiterhin eine Re-Hybridisierung der aufgelösten *Kissing-Loop*-Struktur begünstigt. Dieser Effekt ist wesentlich größer bei Tetraedern, deren *Hairpin*-Strukturen unmittelbar nebeneinander an einer Ecke liegen. Dieser stabilisierende Effekt zeigte sich auch insbesondere im Vergleich zu Tetraedern, welche nur über einen *Loop* miteinander hybridisieren konnten und somit ein weniger stabiles Dimer bildeten. Solche dimeren Produktbanden wiesen nach gelelektrophoretischer Trennung eine stärkere Bandenunschärfe auf (Abbildung 17). Dieser Effekt wurde noch einmal verstärkt, sobald zusätzliche, sterisch störende *Loop*-Strukturen vorhanden waren, die aufgrund fehlender Komplementarität selber keine *Kissing-Loop*-Bindung eingehen konnten. Experimentell wurde dies durch Austausch der *Loop*-Sequenz HP 1 durch eine Poly(dT)-*Loop*-Sequenz gezeigt (Abbildung 18). Eine Steuerung der Multimerisierung, um definierte und stabilisierte, multimerer oder dimerer Produkte zu erhalten, könnte weiterhin über den Einsatz verschiedener *Kissing-Loop*-Sequenzen erfolgen. In einem Experiment wurden daher auch alternative *Loop*-Sequenzen verwendet (HP 3 und HP 4) und in Kombination mit den Sequenzen HP 1 und HP 2 an einem 2-*Loop*-Tetraeder getestet (Abbildung 15). Die resultierenden 2-*Loop*-Tetraeder besaßen entweder *Loop*-Sequenz HP 1 in Kombination mit HP 3, oder *Loop*-Sequenz HP 2 und HP 4. Über *Kissing-Loop*-Hybridisierung konnte nun HP 1 mit HP 2, sowie HP 3 mit HP 4 hybridisieren und ein dimeres *Kissing-Loop*-Produkt bilden. Als Erweiterung dieses Modells könnten in Zukunft weitere *Loop*-Sequenzen zur Bildung definierter Trimere, Tetramere und anderer Oligomere eingesetzt werden.

## 4.5 Der DNA-Tetraeder als pharmazeutischer Nanotransporter

Eine Dimerisierung oder Multimerisierung kann für nanotechnologische Anwendungen eine Verkapselung von Cargomolekülen und auch deren anschließenden Transport ermöglichen. Zur Verkapselung könnte zwischen zwei miteinander über *Kissing-Loop*-Strukturen verbundene 3-*Loop*-Tetraeder ein Cargomolekül eingeschlossen werden, die entsprechende Anpassung an die Größe des Cargos könnte dann sowohl über die Kantenlänge der Tetraeder (Goodman *et al.*, 2005; Goodman *et al.*, 2008; Mastroianni *et al.*, 2009) als auch über die Stammlänge der *Hairpin*-Strukturen erfolgen. Aufgrund der niedrigen und konstanten Hybridisierungstemperatur bietet sich das *Kissing-Loop-Annealing* vor allem für den Einschluss von z.B. thermolabilen Proteinen hervorragend an. Eine Verkapselung eines Proteins innerhalb eines Tetraeders gelang erstmals 2006 und 2007 (Erben *et al.*, 2006; Duckworth *et al.*, 2007). Hierbei war jedoch eine kovalente Bindung eines Proteins (Cytochrom c, Grün-fluoreszierendes Protein (GFP)) an die DNA im Vorfeld der Assemblierung nötig. Dies wäre bei einem Einschluss zwischen *Kissing-Loop*-Tetraedern nicht nötig. Eine weitere Möglichkeit zur Verpackung eines Proteins innerhalb eines Tetraeders ist die Verwendung einer Bindungssequenz, zu der dieses Protein eine Affinität besitzt, wie am Beispiel des Transkriptionsfaktors CAP (engl. catabolite activator protein) gezeigt wurde (Crawford *et al.*, 2013). Jedoch kann sich dieses auch ohne entsprechende Kontrolle wieder aus dem Tetraeder lösen. Ein möglicher Einsatzbereich nanoskaliger Transportbehälter liegt z.B. in der Medizin, beim Transport von in der Chemotherapie verwendeter Medikamente ins Tumorgewebe. Hier könnte durch einen gezielten Transport des Medikaments dessen Einsatzmenge, und somit die für den Körper schädliche Wirkung, verringert werden. Ein derartiges Prinzip wird auch beim Einsatz von nanoskaligen mesoporesen Silica-Partikeln verfolgt, wobei tumorspezifisch exprimierte Enzyme (z.B. Metalloproteinase 9) das Medikament (Cisplatin) durch Verdau einer Zielstruktur (Heptapeptid-Linker-Molekül) am Zielort aus der Matrix lösen (van Rijt *et al.*, 2015). Auch wesentlich biokompatiblere DNA-Tetraeder konnten bereits gezielt zu tumorösem Gewebe innerhalb eines Organismus transportiert (Lee *et al.*, 2012), und die transportierten Moleküle (durch Basenpaarung gebundene siRNA, und in den DNA-Tetraeder interkaliertes Doxorubicin oder kovalent gebundenes Cyanin) in die Zielzellen aufgenommen werden (Lee *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013a; Kim *et al.*, 2013b). Die Stabilität der DNA-Tetraeder im Blutkreislauf ist dabei sehr hoch ( $T_{1/2} = 24,2$  min; Lee *et al.*, 2012), wobei sie über die Blutbahn vor allem gut durchblutete Gewebe, zu denen auch Tumore zählen, effektiv erreichen können. Es wird vermutet, dass Nanopartikel mit 10–100 nm Durchmesser der Ausscheidung über die Nieren (renal) entgehen

und daher lange genug im Blutkreislauf zirkulieren, um das Tumorgewebe zu erreichen (Davis *et al.*, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten DNA-Tetraeder liegen mit einer Kantenlänge von 6,8 nm und einem daraus resultierenden Umkugelradius von 4,2 nm, sowie einem Durchmesser von 8,4 nm in einer vergleichbaren Größenordnung und können durch Anpassung der Kantenlänge vergrößert und verkleinert werden (Goodman *et al.*, 2005; Mastroianni *et al.*, 2009). Eine Kantenverlängerung um nur 4 Basenpaare (1,36 nm) führt bereits zu einem Durchmesser von 10 nm, ausreichend um die renale Ausscheidung zu verhindern. In der Zielzelle selbst sind Tetraeder mindestens 48 h Stunden stabil (Walsh *et al.*, 2011).

#### 4.6 Einfluss der Temperatur auf die Bildung des *Kissing-Loop*-Produkts

Ein Einsatz von *Kissing-Loop*-Komplexen aus DNA-Tetraedern für pharmazeutische Anwendungen setzt in erster Linie eine ausreichende Stabilität unter physiologischen Bedingungen voraus. Bereits beim Einsatz eines *Capping*-Oligonukleotids zur Auflösung einer *Kissing-Loop*-Struktur miteinander komplexierter 1-*Loop*-Tetraeder (Kapitel 3.6) fiel auf, dass eine erhöhte Temperatur in Anwesenheit des *Capping*-Oligonukleotids die Auflösung des *Kissing-Loop*-Komplexes begünstigte. Dies lässt vermuten, dass der Temperatureinfluss auch in niedrigen Temperaturbereichen einen entscheidenden Faktor für die Stabilität der *Kissing-Loop*-Komplexe darstellt. In einem weiteren Experiment wurde daher die Stabilität verschiedener *Kissing-Loop*-Komplexe innerhalb physiologisch relevanter Temperaturbereiche getestet (Abbildung 19). Die getesteten Temperaturbereiche reichten von 30–35 °C, 35–40 °C bis 40–45 °C im Vergleich zu < 25 °C. Die Körperkerntemperatur des Menschen liegt bei 37 °C, kann aber um einige Grad schwanken. Für die Stabilität der getesteten *Kissing-Loop*-Interaktionen zwischen verschiedenen Tetraedern, ließ sich eine Korrelation zwischen Temperatur und *Loop*-Anzahl beobachten. Mit zunehmende *Loop*-Anzahl konnte eine gesteigerte Stabilität der *Kissing-Loop*-Komplexe gegenüber erhöhten Temperaturen festgestellt werden. Komplexe aus zwei miteinander hybridisierten 1-*Loop*-Tetraedern zerfielen bereits bei Temperaturen über 30 °C. Dies liegt im Temperaturbereich der auch für RNA-*Kissing-Loop*-Komplexe nachgewiesen wurde (20–55 °C; Livshits *et al.*, 2011). *Kissing-Loop*-Komplexe aus zwei 2-*Loop*-Tetraedern zerfielen ab einer Temperatur von 35 °C. Komplexe aus zwei 3-*Loop*-Tetraeder zeigten jedoch erst ab einer Temperatur über 40 °C eine starke Dissoziation. Diese Stabilität kann erneut mit dem durch die größere Anzahl an *Loop*-Sequenzen erhöhten Potenzial für *Kissing-Loop*-Bindungen erklärt werden. Existieren mehrere

*Kissing-Loop*-Strukturen an einem Tetraeder, kann eine initiale *Kissing-Loop*-Bildung auch den Abstand der anderen zueinander komplementären *Loops* verringern und deren Hybridisierung begünstigen. Eine erhöhte Anzahl an Basenpaarungen, bedingt durch eine größere Anzahl an *Kissing-Loop*-Bindungen, führt auch zu einer höheren Schmelztemperatur des gesamten Komplexes. Interessanterweise konnte beim Zerfall der *Kissing-Loop*-Komplexe die Entstehung eines intermediären Zerfallsprodukts beobachtet werden. So lagen beispielsweise bei 30–35 °C nicht alle 1-*Loop*-Tetraeder vollständig als Monomere vor. Ein Großteil konnte als intensive intermediäre Bande zwischen der Bandenlaufhöhe des *Kissing-Loop*-Produkts und dem Monomer detektiert werden. Diese Beobachtung wiederholte sich bei 35–40 °C für den *Annealing*-Ansatz mit dem 2-*Loop*-Tetraeder und bei 40–45 °C für den Ansatz mit dem 3-*Loop*-Tetraeder. Die hohe Stabilität des *Kissing-Loop*-Produkts aus 3-*Loop*-Tetraedern lässt auf eine gute potentielle Einsatzfähigkeit als Bestandteil therapeutischer Nanopartikel für Human- und Veterinärmedizin hoffen. Als weitere Ergänzung könnte auch eine induzierte Hyperthermie (z.B. durch Rotlicht und andere Wärmequellen) denkbar sein, durch die an gezielten Körperbereichen eine Freisetzung von Cargos aus *Kissing-Loop*-Komplexen möglich wäre.

#### **4.7 Einfluss der Ionenstärke auf die Bildung des *Kissing-Loop*-Produkts**

Für einen therapeutischen Einsatz ist jedoch auch das biologische Milieu zu beachten, in welchem ein *Kissing-Loop*-Komplex über eine ausreichende Zeitspanne stabil bleiben muss. Wie bereits für natürliche und künstliche RNA-*Kissing-Loop*-Strukturen gezeigt (Kapitel 1.5), ist die Gegenwart von Magnesiumionen eine wichtige Voraussetzung für ein effektives *Annealing* und die Stabilität des RNA-*Kissing-Loop*-Produkts (Takahashi *et al.*, 2000; Mundigala *et al.*, 2014). In dieser Arbeit konnte für die getesteten DNA-*Kissing-Loop*-Produkte aus Tetraedern ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Magnesiumionen und der *Kissing-Loop*-Hybridisierung festgestellt werden. Für dieses Experiment wurden jeweils 1-*Loop*-, 2-*Loop*- und 3-*Loop*-Tetraeder in Anwesenheit der Kationen von Kalium, Magnesium, Calcium und Zink miteinander hybridisiert (Kapitel 3.11). Kalium, als Monovalent, ermöglichte keine *Kissing-Loop*-Hybridisierung. Dabei konnte keine Produktbande, analog zur Negativkontrolle in TA-Puffer (ohne Zusatz von Kationen), nach gelelektrophoretischer Trennung detektiert werden (Abbildung 20). Untersuchungen an RNA-*Kissing-Loop*-Komplexen legen sogar die Vermutung nahe, dass monovalente Kationen wie Kalium, durch eine Konkurrenz mit Magnesiumionen um die Bindungsstelle und Verdrängung dieser aus dem *Kissing-Loop*-Komplex, die Stabilität der *Kissing-Loop*-Komplexe negativ

beeinflussen (Mundigala *et al.*, 2014). Dieser Effekt wurde bisher jedoch nicht für DNA-Modelle untersucht. Erst in Anwesenheit zweiwertiger Kationen ließ sich für alle getesteten Tetraeder ein effektives *Kissing-Loop-Annealing* feststellen. Interessanterweise konnte im Austausch gegen Magnesium auch in Gegenwart der Bivalente von Zink und Calcium *Kissing-Loop-Annealing* stattfinden.

Magnesium ist ein für den Menschen essentielles Mengenelement, so ist es beispielsweise ein wichtiger Cofaktor für Enzyme, ATP und die Nukleinsäuren RNA und DNA (Li *et al.*, 2012). Die extrazellulär nachweisbare Konzentration an ionisiertem Magnesium im Blutplasma eines Erwachsenen liegt bei 0,55–0,75 mM (Saris *et al.*, 2000). Weiterhin gehört auch Calcium zu den essentiellen Mengenelementen und ist auf zellulärer Ebene z.B. als *Second messenger* für Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinasen zu finden. Im Vollblut von Erwachsenen finden sich 1,12–1,32 mM ionisiertes Calcium (Dörner, 2009). Zink als Spurenelement ist beim Menschen intrazellulär vor allem wichtig für die Funktion von über 100 zinkabhängigen Enzymen. Bei Erwachsenen beträgt der Gesamtgehalt im Blut 67,3–131,5  $\mu\text{M}$  und im Plasma 10,7–18,3  $\mu\text{M}$  (Günzler *et al.*, 1996).

Für die Versuchsdurchführung wurden daher verschiedene, physiologisch relevante (0,625 mM, 1,25 mM), sowie sehr hohe Ionenkonzentrationen (11,5 mM; Bois *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2014) im Vergleich getestet. Für jede Kationenart und jeden getesteten Tetraeder konnte eine Mindestionenkonzentration ermittelt werden, bei der eine *Kissing-Loop*-Hybridisierung noch möglich war (Abbildung 21, Abbildung 22). Für das *Annealing* mit Magnesium konnte eine Mindestkonzentration von 0,625 mM ermittelt werden. Auch in Gegenwart von 0,625 mM Calcium bildete sich noch *Kissing-Loop*-Produkt. Zink jedoch wurde in einer höheren Mindestkonzentration von 1,25 mM nötig, um ein *Kissing-Loop-Annealing* der 1-*Loop*-Tetraeder zu gewährleisten. Für die 2-*Loop*- und 3-*Loop*-Tetraeder war bereits eine Konzentration von 0,625 mM Zink ausreichend. In diesem Experiment konnte erneut eine Korrelation zwischen der Anzahl an zur Verfügung stehenden Stamm-*Loop*-Strukturen und der Stabilität der *Kissing-Loop*-Produkte festgestellt werden. Maximale *Kissing-Loop*-Bildung wurde für jedes Bivalent bei einer Maximalkonzentration von 11,5 mM für den 3-*Loop*-Tetraeder festgestellt. Je weniger *Loop*-Strukturen vorhanden waren, umso größer war der Einfluss der Ionen-Konzentrationsabnahme in Bezug auf den Nachweis von *Kissing-Loop*-Dimeren (weniger Dimere). Für Calcium und Magnesium liegen die Mindestkonzentrationen innerhalb der, aus der Literatur bekannten, physiologischen Konzentrationsbereichen an extrazellulär verfügbarem, freien Ion im Blutkreislauf. Nur der erhöhte Bedarf an Zink für ein nachweisbares *Kissing-Loop-Annealing* liegt außerhalb der physiologisch verfügbaren

Konzentrationen an freiem Zink im Blut. In Summe sprechen diese Ergebnisse jedoch für eine ausreichende Stabilität für den Transport von *Kissing-Loop*-Komplexen über die Blutbahn des Menschen, was einen pharmazeutischen Einsatz begünstigen würde.

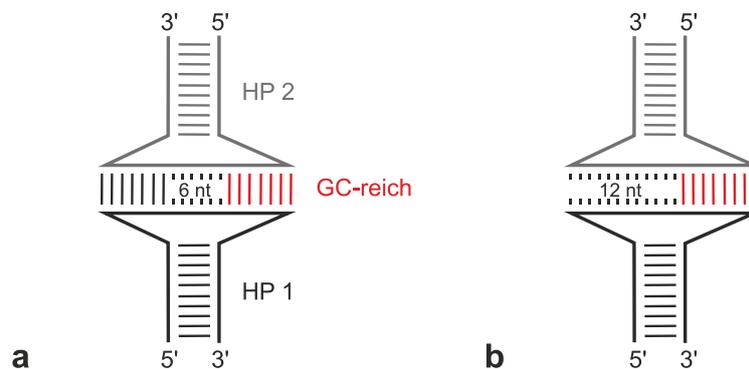
Sowohl die Temperatur als auch die Ionenstärke stellen wichtige Einflussfaktoren für einen nanotechnologischen Einsatz *in vivo* dar. Vor allem Tetraeder mit erhöhter Stamm-*Loop*-Anzahl zeigen sich hierbei besonders geeignet, da sie sich durch eine zunehmende Stabilität unter beiden Einflussgrößen auszeichnen.

#### 4.8 Identifikation der hybridisierenden Bereiche innerhalb des *Loops*

Um einen erfolgreichen Einsatz von *Kissing-Loop*-Strukturen in der Nanotechnologie präziser zu gestalten ist außerdem eine Aufklärung der molekularen Struktur von DNA-*Kissing-Loop*-Strukturen nötig. So ist beispielsweise, wie bereits erläutert, für die erfolgreiche Auflösung des Komplexes durch eine *Strand Displacement*-Reaktion, die für eine initiale Bindung des *Capping*-Oligonukleotids zur Verfügung stehende ungepaarte Nukleotidsequenz entscheidend. Auch die Stabilität der *Kissing-Loop*-Produkte wird durch die Struktur der *Kissing-Loop*-Bindung beeinflusst, da unter anderem eine erhöhte Anzahl an Basenpaarungen im *Loop*, und somit eine erhöhte Anzahl an stabilisierenden Wasserstoffbrücken, einen Einfluss auf die Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen wie Temperatur und Ionenstärke mit sich bringt.

In der Literatur wurden verschiedene dreidimensionale Modelle (engl. *coarse-grained DNA model*) von DNA-*Kissing-Loop*-Strukturen aus DNA-*Hairpin*-Strukturen publiziert. Hierbei wurde für zwei der in dieser Arbeit verwendeten *Hairpin*-Strukturen (HP 1 und HP 2; Bois *et al.*, 2005) von Romano *et al.*, 2012 eine *Kissing-Loop*-Struktur als *Four-Way-Junction* beschrieben (Abbildung 24). Beide *Loop*-Sequenzen hybridisieren laut diesem Modell über die lateralen Bereiche, indem jeweils sieben Basenpaare ausgebildet werden, der mittlere *Loop*-Bereich bleibt über sechs Nukleotide ungepaart. Šulc *et al.*, 2012 stellte diesem nach sequenzabhängiger Parametrisierung ein zweites mögliches Modell gegenüber. Die *Loop*-Sequenz der analysierten *Hairpin*-Strukturen besteht aus den lateralen, G/C-reichen und A/T-reichen Bereichen, sowie einer C/T-reichen, zentralen Sequenz. Das Modell von Šulc *et al.*, 2012 beschreibt hierbei eine Hybridisierung im G/C-reichen Bereich und in Teilen der zentralen *Loop*-Sequenz (C/T-Sequenz) über insgesamt acht Basenpaare. Die A/T-reiche Sequenz, sowie der größte Teil des zentralen *Loop*-Bereichs bleiben ungepaart (zwölf Nukleotide). Zur

Überprüfung dieser Modelle ist eine weitere experimentelle Charakterisierung notwendig. Dies gelang erstmals in der vorliegenden Arbeit.



**Abbildung 24: Theoretische Modelle von DNA-Kissing-Loop-Komplexen nach Romano *et al.*, 2012 und Šulc *et al.*, 2012.**

Die dargestellten Modelle basieren auf den von Bois *et al.* (2005) publizierten DNA-Hairpin-Sequenzen HP 1 (schwarz) und HP 2 (grau), welche auch in dieser Arbeit als Funktionalisierung von DNA-Tetraedern eingesetzt und experimentell charakterisiert wurden. Unter Berücksichtigung unterschiedlicher Parameter ließen sich zwei Modelle der DNA-Kissing-Loop-Struktur simulieren (engl. *coarse-grained DNA model*, Romano *et al.*, 2012). Eine Parametrisierung nach Romano *et al.* (2012) führte zu einer *Four-Way-Junction* (a; Romano *et al.*, 2012; Šulc *et al.*, 2012) während eine zusätzliche Berücksichtigung der *Loop*-Sequenz (sequenz-abhängige Parametrisierung; Šulc *et al.*, 2012) eine zweite möglichen Struktur lieferte (b), bei der ein laterales *Annealing* nur im G/C-reichen Bereich (rot) postuliert wurde.

Entsprechend der sequenz-abhängigen Parametrisierung nach Šulc *et al.*, 2012 kann sich die Basenabfolge im *Loop*-Bereich auf die entstehende *Kissing-Loop*-Struktur auswirken. Da in dieser Arbeit ausschließlich *Hairpin*-Strukturen verwendet wurden, deren Basensequenz einen A/T-reichen und einen G/C-reichen lateralen Bereich aufwiesen (HP 1, HP 2, HP 3, HP 4), wäre für an Tetraeder immobilisierte *Hairpin*-Strukturen ein laterales *Annealing* nach Šulc *et al.*, 2012 möglich. Tatsächlich ist jedoch die Ausgangssituation stark verändert. Durch die Bindung an den Tetraeder wird die Fähigkeit zur Duplexbildung und die damit verbundene Auflösung des gesamten Stammbereichs unterdrückt. Statt einer metastabilen entsteht eine stabilisierte *Kissing-Loop*-Struktur, was wiederum Auswirkungen auf gepaarten Bereiche im *Loop* haben könnte. Weiterhin ist unklar, ob das *Kissing-Loop-Annealing* durch den Tetraeder sterisch behindert wird, z.B. durch Abstoßung der negativ geladenen Nukleotide des Tetraeders, oder ob dies durch die Gegenwart zweiwertiger Kationen aufgehoben werden könnte. Besonderen Einfluss könnte die vorgegebene Position der komplementären Stamm-*Loop*-Strukturen zueinander haben, wenn, wie im Fall zweier miteinander hybridisierter 2-*Loop*- oder 3-*Loop*-Tetraeder, bereits eine *Kissing-Loop*-Bindung vorhanden ist, und sich die zweite und dritte *Kissing-Loop*-Struktur in veränderter Weise ausbilden muss. Aus diesem Grund, und weil bisher ausreichende experimentelle Erkenntnisse zur Struktur von DNA-Kissing-Loop-

Komplexen fehlten, wurden hier die für das *Annealing* wichtigen *Loop*-Bereiche identifiziert (Kapitel 3.12). Für dieses Experiment wurden vier neue, veränderte HP 1-*Loop*-Sequenzen eingesetzt. *Hairpin A*, verlor durch Nukleotidaustausch (Pyrimidin- gegen Pyrimidinbase, und Purin- gegen Purinbase) die A/T-reiche Sequenz und die Fähigkeit zur Hybridisierung mit HP 2 in diesem Bereich. *Hairpin B* verlor den G/C-reichen Bereich und ebenfalls die Komplementarität zu HP 2 in dieser Sequenz. *Hairpin C* war durch *Mismatch*-Austausch nicht mehr fähig im zentralen *Loop*-Bereich zu hybridisieren, genauso *Hairpin C2* (Abbildung 6). Letztere *Loop*-Sequenz verlor jedoch durch Austausch von Pyrimidin- gegen Purinbasen auch den C/T-reichen Charakter und besaß nun eine A/G-reiche Sequenz. Alle Sequenzen wurden auf ihre Fähigkeit zur Hybridisierung mit HP 2 untersucht, hierfür wurden sowohl 1-*Loop*-Tetraeder als auch 2-*Loop*-Tetraeder verwendet. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass auch hier die G/C-reiche Sequenz wichtig für das effektive *Annealing* ist (Abbildung 23). Durch eine erhöhte Anzahl an Wasserstoffbrücken trägt sie zur Stabilität des *Kissing-Loop*-Komplexes bei. In Abwesenheit der G/C-reichen Sequenz entsteht kein *Kissing-Loop*-Komplex aus 1-*Loop*-Tetraedern. Im Vergleich dazu kann auch ein Verlust der A/T-reichen Sequenz kaum kompensiert werden. Hier entsteht ein intermediäres Produkt, welches in seiner Bandenlaufhöhe dem entspricht, welches auch bereits beim Zerfall unter Temperatureinwirkung zu beobachten war. Ein Verlust der Komplementarität im zentralen *Loop*-Bereich zeigte jedoch kaum Einfluss auf die Hybridisierung, was den Rückschluss zulässt, dass dieser für ein erfolgreiches *Kissing-Loop-Annealing* nicht essentiell ist. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch im Fall der Hybridisierung von 1-*Loop*-Tetraedern über *Kissing-Loop*-Komplex-Bildung ein nach Romano *et al.*, 2012 ähnliches Hybridisierungsverhalten stattfindet, wobei eine hauptsächliche Bindung über den G/C-reichen Bereich erfolgt. Ohne zusätzlichen intakten A/T-Bereich kann jedoch auch kein stabiles *Kissing-Loop*-Produkt gebildet werden und es entsteht ein intermediäres Produkt. Auch von RNA-*Kissing-Loop*-Komplexen ist mittlerweile eine Hybridisierung innerhalb des lateralen Bereiches beschrieben. Hierbei entsteht diese nach initialem Kontakt im *Loop*-Zentrum und einer darauf folgenden Verlagerung der Basenpaarung in einen der lateralen *Loop*-Bereiche (Wagner und Brantl, 1998; Mundigala *et al.*, 2014). Im Anschluss daran entsteht mit zeitlicher Verzögerung ein voller Duplex der RNA-Stränge. Im Fall einer zwischen DNA-Tetraedern gebildeten stabilen *Kissing-Loop*-Struktur scheint eine Unterdrückung der zentralen Interaktionen und eine somit erzwungene, initiale laterale Hybridisierung (*Loop C* und *C2*) die Ausbeute an *Kissing-Loop*-Produkt leicht zu steigern.

Interessanterweise konnte die *Kissing-Loop*-Hybridisierung weiterhin stark verbessert werden, sobald ein *2-Loop*-Tetraeder in einer der HP 1-Sequenzen durch *Loop*-Sequenz A, B, C oder C2 ausgetauscht wurde. In allen Fällen konnten durch den verbliebenen HP 1-*Loop* *Kissing-Loop*-Komplexe mit dem *2-Loop*-Tetraeder HP 2 gebildet werden. Im Vergleich, zu sowohl der Negativkontrolle mit einem zusätzlichen Poly(dT)-*Loop* als auch zur Positivkontrolle mit zwei intakten HP 1-Sequenzen, zeigte sich ein deutlich erhöhter Umsatz zu *Kissing-Loop*-Produkt. Zu erkennen war dies sowohl an der Abnahme der Monomerbande, als auch an der Zunahme der *Kissing-Loop*-Produktbandenintensität. Dies deutet darauf hin, dass ein teilweiser Verlust der Komplementarität innerhalb der lateralen *Loop*-Sequenz für ein isoliertes *Kissing-Loop*-Ereignis einen negativen Einfluss hat, aber unter veränderten sterischen Bedingungen, wie sie beim *Annealing* von Tetraedern mit erhöhter *Loop*-Anzahl zu finden sind, das *Kissing-Loop-Annealing* verbessert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die sich ergebende Position des zweiten *Loop*-Paares, aufgrund der dirigierenden Wirkung des ersten *Loop*-Paares, keine gewöhnliche *Kissing-Loop*-Struktur entsteht, sondern eine Basenpaarung über andere Bereiche des *Loops* stattfindet. Durch die Bindung des ersten *Loop*-Paares (HP 1 mit HP 2) kann jedoch ein ausreichend stabiler *Kissing-Loop*-Komplex entstehen. Unterstrichen wird dies durch die Tatsache, dass der stärkste Umsatz zu *Kissing-Loop*-Produkt zu beobachten ist, wenn der zweite *Loop* seine Komplementarität im zentralen *Loop*-Bereich verliert. So scheint durch die Anwesenheit von intaktem, lateralem A/T- und lateralem G/C-Bereich ein effektives und stabiles *Kissing-Loop-Annealing* stattzufinden. Wobei die Basenpaarung in den lateralen Bereichen dadurch unterstützt wird, dass instabile Paarungen im Zentralbereich verhindert werden. Weitere mögliche, darüber hinaus stabilisierende Stapelwechselwirkungen zwischen den Stammbereichen der *Hairpin*-Strukturen, wie sie für *Four-Way-Junctions* beschrieben wurden (Lilley, 2000; Romano *et al.*, 2012), können ebenfalls als Einflussfaktoren auf das *Kissing-Loop-Annealing* in Betracht kommen.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass der nanotechnologische Einsatz von *Kissing-Loop*-Komplexen ein sorgfältiges Design der Stamm-*Loop*-Strukturen in Anlehnung an die spätere Funktion und im Hinblick auf das funktionalisierte Nanomaterial voraussetzt. Darüber hinaus zeigen die Resultate eindrucksvoll, dass mit *Hairpin*-Strukturen funktionalisierte Tetraeder ein vielversprechendes nanotechnologisches Werkzeug vor allem für Einsatzbereiche im Menschen darstellen, da sie eine hohe Biokompatibilität, sowie geringe Produktionskosten gewährleisten.



## 5 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit etablierten, durch *Hairpin*-Strukturen funktionalisierten Tetraeder stellen ein vielversprechendes Werkzeug für zukünftige nanotechnologische Anwendungen dar. Dennoch sind weitere Untersuchungen bis zu einem endgültigen Einsatz nötig. Wichtig für einen gezielten Einsatz ist ein umsichtig geplantes Design. Hierfür ist vor allem, im Hinblick auf die für ein effektives *Kissing-Loop-Annealing* wichtige *Loop*-Sequenz, eine weitere Charakterisierung nötig. Dabei ist es sinnvoll auch das Hybridisierungsverhalten weiterer funktionalisierter Tetraeder (beispielsweise *3-Loop*-Tetraeder) zu untersuchen, um den Einfluss der *Loop*-Sequenz besser verstehen zu können. Auch die Analyse weiterer *Loop*-Sequenzen mit Abweichung von der in A/T- und G/C-Bereiche separierten Basenabfolge erscheint sinnvoll, um weitere Einflussfaktoren wie beispielsweise Stapelwechselwirkungen zu identifizieren. Weitere *Loop*-Sequenzen könnten darüber hinaus auch das Repertoire an spezifischen *Kissing-Loop*-Komplexen, durch Einsatz mehrerer *Loop*-Sequenzen innerhalb eines Komplexes, erweitern und so ein gezielteres Design (z.B. Trimere, Tetramere) für spezifische Anwendungen ermöglichen. Auch die Anpassung der Tetraedergröße, unter Berücksichtigung der Tetraederstabilität, durch Veränderung der Kantenlänge oder der Stammlänge, könnte für gezielte Anwendungen (z.B. Cargotransport) sinnvoll sein. Eine sequenzspezifische Auflösung durch *Capping*-Oligonukleotide könnte für unterschiedliche *Loop*-Sequenzen eingesetzt werden, um einzelne *Kissing-Loop*-Bindungen in einem Komplex aufzulösen und damit gezielte Konformationsänderungen herbeizuführen. Die Etablierung eines weiteren Katalysatorstrangs, der das *Capping*-Oligonukleotid bindet, könnte eine Re-Hybridisierung der *Kissing-Loop*-Strukturen ermöglichen. Dadurch könnten *Kissing-Loop*-Komplexe gezielt zyklisch auf- und abgebaut werden. Schließlich ist auch eine genauere Charakterisierung mit erweiterten Methoden (z.B. Rasterkraftelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie) der dreidimensionalen Komplexe, auch unter Berücksichtigung von Milieubedingungen (beispielsweise für Milieu-abhängige Konformationsänderungen), sinnvoll. Darüber hinaus ist es sinnvoll *Kissing-Loop*-Komplexe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf Stabilität und Funktionalität zu testen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Nanotechnologie gewinnt im 21. Jahrhundert eine immer größer werdende Bedeutung für den Menschen. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf biokompatiblen DNA-Nanostrukturen. In dieser Arbeit konnten auf DNA-basierende Nanotetraeder durch bis zu vier DNA-*Hairpin*-Strukturen an den Tetraederecken funktionalisiert werden.

Ein DNA-*Hairpin* besteht aus einem doppelsträngigen Stammbereich und einer einzelsträngigen *Loop*-Region. Durch geschicktes Design der *Loop*-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass die funktionalisierten DNA-Tetraeder mittels dieser *Loop*-Sequenzen, über sogenanntes *Kissing-Loop-Annealing*, miteinander interagieren können. Dieses *Kissing-Loop-Annealing* wurde in dieser Arbeit im Hinblick auf verschiedene Einflussfaktoren detailliert charakterisiert.

So konnte u.a. gezeigt werden, dass sowohl die Position, als auch die Anzahl der *Hairpin*-Strukturen einen Einfluss auf die Komplexbildung über *Kissing-Loop-Annealing* hatten.

Als stabilisierende Kationen für *Kissing-Loop*-Komplexe erwiesen sich Magnesium, Calcium und Zink. Ohne Zugabe von zweiwertigen Kationen, sowie in Anwesenheit von monovalentem Kalium konnten keine *Kissing-Loop*-Komplexe detektiert werden. Eine Analyse der Temperaturstabilität im Bereich zwischen  $< 25$  °C und  $45$  °C zeigte eine deutlich verbesserte Stabilität für Komplexe mit zunehmender *Hairpin*-Anzahl.

In weiteren Experimenten gelang durch Einsatz eines sogenannten *Capping*-Oligonukleotids gezielt die sequenzspezifische Auflösung eines Dimers aus 1-*Loop*-Tetraedern. Schließlich konnte erstmals ein Einfluss der verschiedenen *Loop*-Bereiche auf die Bildung der *Kissing-Loop*-Struktur experimentell nachgewiesen werden. Durch zu Fehlpaarungen (*mismatches*) führende Sequenzvariationen der zentralen, sowie der lateralen *Loop*-Bereiche ließ sich zeigen, dass ein *Kissing-Loop-Annealing* bevorzugt über die lateralen *Loop*-Bereiche stattfindet, wie von Romano *et al.*, 2012 in einem theoretischen Modell postuliert. Darüber hinaus konnte sogar gezeigt werden, dass Sequenzveränderungen, die zu Fehlpaarungen führen, das *Kissing-Loop-Annealing* fördern können.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die in dieser Arbeit etablierten Tetraeder mit Funktionalisierung durch *Hairpin*-Strukturen ein vielversprechendes und modifizierbares Werkzeug für zukünftige nanotechnologische Anwendungen darstellen, in denen die Bildung und Dissoziation von *Kissing-Loop*-Strukturen neben dem Design der *Loop*-Sequenzen (Zahl, Position, Komplementarität) durch Faktoren wie Temperatur, Kationen und *Capping*-Oligonukleotiden sehr präzise gesteuert werden können.

## 7 SUMMARY

Nanotechnology in the 21st century is increasingly gaining in significance for human application. One main objective is the synthesis of biocompatible DNA nanostructures. It was possible to functionalize DNA-based nano tetrahedrons by adding up to four DNA hairpin structures to the tetrahedron, one at each angle.

A DNA hairpin consists of a double-stranded stem sequence with a single-stranded loop region. It was demonstrated that, by properly designing the sequence of the loop, functionalized DNA tetrahedrons are able to interact with each other, forming the so-called kissing-loop annealing. In this work the nature of this annealing was further characterized with respect to factors influencing kissing-loop formation.

It could be shown that, amongst others, both hairpin position, as well as number of hairpins, influence complex formation by kissing-loop annealing. Furthermore, kissing-loop annealing was shown to be stabilized in the presence of bivalent cations, such as magnesium, calcium and zinc, whereas absence of such, or presence of monovalent cations like potassium, was not able to stimulate kissing-loop formation. Analysis for thermal stability yielded the result that kissing-loop formation is more stable between  $< 25^{\circ}\text{C}$  and  $45^{\circ}\text{C}$  for tetrahedrons with increasingly higher numbers of hairpins. Another experiment could show that the sequence-specific degradation of a dimer, formed by two 1-loop tetrahedrons, can be induced using a so-called capping oligonucleotide. For the first time, the experiments conducted in this work, could demonstrate, how different parts of the loop affect kissing-loop formation. By using sequence variations causing mismatches within the central and lateral parts of the loop sequence, it could be shown that kissing loop formation is preferentially achieved by binding of the lateral part. In doing so, it was possible to experimentally confirm what was already hypothesized by Romano *et al.*, 2012 in their theoretical model. Additionally, the analysis suggest that sequence variation-induced mismatches can significantly improve kissing-loop annealing formation.

This study present compelling evidence that these newly established, hairpin-functionalized DNA tetrahedrons could constitute a very promising tool for future nanotechnological applications. Furthermore, these DNA tetrahedrons can be controlled by complex formation and dissociation of kissing-loop structures. The properties of this kissing-loop annealing can be precisely controlled via loop design (number, position and complementarity), as well as by temperature, cations and by the use of capping oligonucleotides.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abi, A., Lin, M., Pei, H., Fan, C., Ferapontova, E. E. und Zuo, X. (2014). "Electrochemical switching with 3D DNA tetrahedral nanostructures self-assembled at gold electrodes." ACS Appl Mater Interfaces **6**(11): 8928–31.
- Aldaye, F. A. und Sleiman, H. F. (2007). "Modular access to structurally switchable 3D discrete DNA assemblies." J Am Chem Soc **129**(44): 13376–7.
- Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, Cristiano L P, Pedersen, J. S., Birkedal, V., Besenbacher, F., Gothelf, K. V. und Kjems, J. (2009). "Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid." Nature **459**(7243): 73–6.
- Andersen, F. F., Knudsen, B., Oliveira, Cristiano Luis Pinto, Frøhlich, R. F., Krüger, D., Bungert, J., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R., Juul, S., Veigaard, C., Koch, J., Rubinstein, J. L., Guldbandsen, B., Hede, M. S., Karlsson, G., Andersen, A. H., Pedersen, J. S. und Knudsen, B. R. (2008). "Assembly and structural analysis of a covalently closed nano-scale DNA cage." Nucleic Acids Res **36**(4): 1113–9.
- Baba, S., Takahashi, K.-i., Noguchi, S., Takaku, H., Koyanagi, Y., Yamamoto, N. und Kawai, G. (2005). "Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers." J Biochem **138**(5): 583–92.
- Baker, E. S., Dupuis, N. F. und Bowers, M. T. (2009). "DNA hairpin, pseudoknot, and cruciform stability in a solvent-free environment." J Phys Chem B **113**(6): 1722–7.
- Barbault, F., Huynh-Dinh, T., Paoletti, J. und Lancelotti, G. (2002). "A new peculiar DNA structure: NMR solution structure of a DNA kissing complex." J Biomol Struct Dyn **19**(4): 649–58.
- Barth, A. (2010). "Aufbau von DNA-Nanostrukturen", Diplomarbeit am Karlsruher Institut für Technologie, Botanik 2.
- Barth, A., Kobbe, D. und Focke, M. (2016). "DNA-DNA kissing complexes as a new tool for the assembly of DNA nanostructures." Nucleic Acids Res **44**(4): 1502–13.
- Bhatia, D., Mehtab, S., Krishnan, R., Indi, S. S., Basu, A. und Krishnan, Y. (2009). "Icosahedral DNA nanocapsules by modular assembly." Angew Chem Int Ed Engl **48**(23): 4134–7.
- Bois, J. S., Venkataraman, S., Choi, Harry M T, Spakowitz, A. J., Wang, Z.-G. und Pierce, N. A. (2005). "Topological constraints in nucleic acid hybridization kinetics." Nucleic Acids Res **33**(13): 4090–5.
- Brady, J. und Kashanchi, F. (2005). "Tat gets the "green" light on transcription initiation." Retrovirology **2**: 69.
- Brunel, C., Marquet, R., Romby, P. und Ehresmann, C. (2002). "RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs." Biochimie **84**(9): 925–44.
- Bu, N.-N., Gao, A., He, X.-W. und Yin, X.-B. (2013). "Electrochemiluminescent biosensor of ATP using tetrahedron structured DNA and a functional oligonucleotide for Ru(phen)<sub>3</sub>(2+) intercalation and target identification." Biosens Bioelectron **43**: 200–4.
- Chatterjee, D. K., Diagaradjane, P. und Krishnan, S. (2011). "Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy." Ther Deliv **2**(8): 1001–14.
- Chen, J. H. und Seeman, N. C. (1991). "Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube." Nature **350**(6319): 631–3.

- Church, G. M., Gao, Y. und Kosuri, S. (2012). "Next-generation digital information storage in DNA." Science **337**(6102): 1628.
- Collin, D., van Heijenoort, C., Boiziau, C., Toulmé, J. J. und Guittet, E. (2000). "NMR characterization of a kissing complex formed between the TAR RNA element of HIV-1 and a DNA aptamer." Nucleic Acids Res **28**(17): 3386–91.
- Crawford, R., Erben, C. M., Periz, J., Hall, L. M., Brown, T., Turberfield, A. J. und Kapanidis, A. N. (2013). "Non-covalent single transcription factor encapsulation inside a DNA cage." Angew Chem Int Ed Engl **52**(8): 2284–8.
- Dai, Q., Yan, Y., Ang, C.-S., Kempe, K., Kamphuis, Marloes M J, Dodds, S. J. und Caruso, F. (2015). "Monoclonal antibody-functionalized multilayered particles: targeting cancer cells in the presence of protein coronas." ACS Nano **9**(3): 2876–85.
- Davis, M. E., Chen, Z. G. und Shin, D. M. (2008). "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer." Nat Rev Drug Discov **7**(9): 771–82.
- Dietz, H., Douglas, S. M. und Shih, W. M. (2009). "Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes." Science **325**(5941): 725–30.
- Dörner, K. (2009). "Klinische Chemie und Hämatologie." Thieme **7**.
- Duckworth, B. P., Chen, Y., Wollack, J. W., Sham, Y., Mueller, J. D., Taton, T. A. und Distefano, M. D. (2007). "A universal method for the preparation of covalent protein-DNA conjugates for use in creating protein nanostructures." Angew Chem Int Ed Engl **46**(46): 8819–22.
- Egli, M. und Saenger, W. (2013). "Principles of nucleic acid structure." Springer Verlag New York.
- Eichman, B. F., Vargason, J. M., Mooers, B. H. und Ho, P. S. (2000). "The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: sequence effects on the structure of four-way junctions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 3971–6.
- El Tannir, Z., Afonin, K. A. und Shapiro, B. A. (2015). "RNA and DNA nanoparticles for triggering RNA interference." RNA & DISEASE **2**(3).
- Elsaesser, A. und Howard, C. V. (2012). "Toxicology of nanoparticles." Adv Drug Deliv Rev **64**(2): 129–37.
- Ennifar, E., Walter, P., Ehresmann, B., Ehresmann, C. und Dumas, P. (2001). "Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site." Nat Struct Biol **8**(12): 1064–8.
- Erben, C. M., Goodman, R. P. und Turberfield, A. J. (2006). "Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage." Angew Chem Int Ed Engl **45**(44): 7414–7.
- Fabry, S. (1995). "Frühe Introns–späte Introns?" Biologie in unserer Zeit **25**(5): 300–6.
- Fan, C., Plaxco, K. W. und Heeger, A. J. (2003). "Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9134–7.
- Feng, S., Shang, Y., Wu, F., Ding, F., Li, B., Xu, J., Xu, L. und Zhou, X. (2014). "DNA nanomachines as evolved molecular beacons for in vitro and in vivo detection." Talanta **120**: 141–7.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. und Nüsslein-Volhard, C. (1997). "RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles." EMBO J **16**(7): 1751–8.

- Forsdyke, D. R. (1995). "A stem-loop "kissing" model for the initiation of recombination and the origin of introns." Mol Biol Evol **12**(5): 949–58.
- Gerhart, E., Wagner, H. und Nordström, K. (1986). "Structural analysis of an RNA molecule involved in replication control of plasmid R1." Nucleic Acids Res **14**(6): 2523–38.
- Goldman, N., Bertone, P., Chen, S., Dessimoz, C., LeProust, E. M., Sipos, B. und Birney, E. (2013). "Towards practical, high-capacity, low-maintenance information storage in synthesized DNA." Nature **494**(7435): 77–80.
- Goodman, R. P., Berry, R. M. und Turberfield, A. J. (2004). "The single-step synthesis of a DNA tetrahedron." Chem Commun (Camb)(12): 1372–3.
- Goodman, R. P., Heilemann, M., Doose, S., Erben, C. M., Kapanidis, A. N. und Turberfield, A. J. (2008). "Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures." Nat Nanotechnol **3**(2): 93–6.
- Goodman, R. P., Schaap, I A T, Tardin, C. F., Erben, C. M., Berry, R. M., Schmidt, C. F. und Turberfield, A. J. (2005). "Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication." Science **310**(5754): 1661–5.
- Gradišar, H., Božič, S., Doles, T., Vengust, D., Hafner-Bratkovič, I., Mertelj, A., Webb, B., Šali, A., Klavžar, S. und Jerala, R. (2013). "Design of a single-chain polypeptide tetrahedron assembled from coiled-coil segments." Nat Chem Biol **9**(6): 362–6.
- Grass, R. N., Heckel, R., Puddu, M., Paunescu, D. und Stark, W. J. (2015). "Robust chemical preservation of digital information on DNA in silica with error-correcting codes." Angew Chem Int Ed Engl **54**(8): 2552–5.
- Green, S. J., Lubrich, D. und Turberfield, A. J. (2006). "DNA hairpins: fuel for autonomous DNA devices." Biophys J **91**(8): 2966–75.
- Günzler, H., Bahadir, A. M., Borsdorf, R., Danker, K., Fresenius, F., Galens, A., Huber, W., Lüderwald, I., Schwedt, G., Tölg, G. und Wisser, H. (1996). "Analytiker-Taschenbuch." Springer-Verlag Berlin-Heidelberg **14**.
- Guo, P., Haque, F., Hallahan, B., Reif, R. und Li, H. (2012). "Uniqueness, advantages, challenges, solutions, and perspectives in therapeutics applying RNA nanotechnology." Nucleic acid therapeutics **22**(4): 226–45.
- Hadrup, N. und Lam, H. R. (2014). "Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver--a review." Regul Toxicol Pharmacol **68**(1): 1–7.
- Han, D., Huang, J., Zhu, Z., Yuan, Q., You, M., Chen, Y. und Tan, W. (2011). "Molecular engineering of photoresponsive three-dimensional DNA nanostructures." Chem Commun (Camb) **47**(16): 4670–2.
- Han, D., Pal, S., Yang, Y., Jiang, S., Nangreave, J., Liu, Y. und Yan, H. (2013). "DNA gridiron nanostructures based on four-arm junctions." Science **339**(6126): 1412–5.
- Hannig, M. und Hannig, C. (2010). "Nanomaterials in preventive dentistry." Nat Nanotechnol **5**(8): 565–9.
- Harrison, G. P., Miele, G., Hunter, E. und Lever, A. M. (1998). "Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line." J Virol **72**(7): 5886–96.
- Holliday, R. (1964). "A mechanism for gene conversion in fungi." Genetics Research **5**(02): 282–304.

- Horiya, S., Li, X., Kawai, G., Saito, R., Katoh, A., Kobayashi, K. und Harada, K. (2003). "RNA LEGO: magnesium-dependent formation of specific RNA assemblies through kissing interactions." *Chem Biol* **10**(7): 645–54.
- Hu, C.-M. J., Fang, R. H., Luk, B. T. und Zhang, L. (2013). "Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination." *Nat Nanotechnol* **8**(12): 933–8.
- Hu, C.-M. J., Fang, R. H., Wang, K.-C., Luk, B. T., Thamphiwatana, S., Dehaini, D., Nguyen, P., Angsantikul, P., Wen, C. H., Kroll, A. V., Carpenter, C., Ramesh, M., Qu, V., Patel, S. H., Zhu, J., Shi, W., Hofman, F. M., Chen, T. C., Gao, W., Zhang, K., Chien, S. und Zhang, L. (2015). "Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking." *Nature* **526**(7571): 118–21.
- Jossinet, F., Paillart, J. C., Westhof, E., Hermann, T., Skripkin, E., Lodmell, J. S., Ehresmann, C., Ehresmann, B. und Marquet, R. (1999). "Dimerization of HIV-1 genomic RNA of subtypes A and B: RNA loop structure and magnesium binding." *RNA* **5**(9): 1222–34.
- Juul, S., Iacovelli, F., Falconi, M., Kragh, S. L., Christensen, B., Frøhlich, R., Franch, O., Kristoffersen, E. L., Stougaard, M., Leong, K. W., Ho, Y.-P., Sørensen, E. S., Birkedal, V., Desideri, A. und Knudsen, B. R. (2013). "Temperature-controlled encapsulation and release of an active enzyme in the cavity of a self-assembled DNA nanocage." *ACS Nano* **7**(11): 9724–34.
- Ke, Y., Sharma, J., Liu, M., Jahn, K., Liu, Y. und Yan, H. (2009). "Scaffolded DNA origami of a DNA tetrahedron molecular container." *Nano Lett* **9**(6): 2445–7.
- Kim, K.-R., Kim, D.-R., Lee, T., Yhee, J. Y., Kim, B.-S., Kwon, I. C. und Ahn, D.-R. (2013a). "Drug delivery by a self-assembled DNA tetrahedron for overcoming drug resistance in breast cancer cells." *Chem Commun (Camb)* **49**(20): 2010–2.
- Kim, K.-R., Lee, Y.-D., Lee, T., Kim, B.-S., Kim, S. und Ahn, D.-R. (2013b). "Sentinel lymph node imaging by a fluorescently labeled DNA tetrahedron." *Biomaterials* **34**(21): 5226–35.
- Kobayashi, T. (2011). "Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles." *Biotechnol J* **6**(11): 1342–7.
- Koraimann, G., Teferle, K., Markolin, G., Woger, W. und Högenauer, G. (1996). "The FinOP repressor system of plasmid R1: analysis of the antisense RNA control of traJ expression and conjugative DNA transfer." *Mol Microbiol* **21**(4): 811–21.
- Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z. und Ho, Rodney J Y (2014). "Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems." *J Pharm Sci* **103**(1): 29–52.
- Kumari, A., Yadav, S. K. und Yadav, S. C. (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." *Colloids Surf B Biointerfaces* **75**(1): 1–18.
- Laughrea, M. und Jetté, L. (1996a). "HIV-1 genome dimerization: formation kinetics and thermal stability of dimeric HIV-1Lai RNAs are not improved by the 1-232 and 296-790 regions flanking the kissing-loop domain." *Biochemistry* **35**(29): 9366–74.
- Laughrea, M. und Jetté, L. (1996b). "Kissing-loop model of HIV-1 genome dimerization: HIV-1 RNAs can assume alternative dimeric forms, and all sequences upstream or downstream of hairpin 248-271 are dispensable for dimer formation." *Biochemistry* **35**(5): 1589–98.
- Laughrea, M. und Jetté, L. (1997). "HIV-1 genome dimerization: kissing-loop hairpin dictates whether nucleotides downstream of the 5' splice junction contribute to loose and tight dimerization of human immunodeficiency virus RNA." *Biochemistry* **36**(31): 9501–8.

- Lee, H., Lytton-Jean, Abigail K R, Chen, Y., Love, K. T., Park, A. I., Karagiannis, E. D., Sehgal, A., Querbes, W., Zurenko, C. S., Jayaraman, M., Peng, C. G., Charisse, K., Borodovsky, A., Manoharan, M., Donahoe, J. S., Truelove, J., Nahrendorf, M., Langer, R. und Anderson, D. G. (2012). "Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery." *Nat Nanotechnol* **7**(6): 389–93.
- Leitner, M., Mitchell, N., Kastner, M., Schlapak, R., Gruber, H. J., Hinterdorfer, P., Howorka, S. und Ebner, A. (2011). "Single-molecule AFM characterization of individual chemically tagged DNA tetrahedra." *ACS Nano* **5**(9): 7048–54.
- Lescoute, A. und Westhof, E. (2006). "Topology of three-way junctions in folded RNAs." *RNA* **12**(1): 83–93.
- Lewinski, N., Colvin, V. und Drezek, R. (2008). "Cytotoxicity of nanoparticles." *Small* **4**(1): 26–49.
- Li, F.-Y., Chaigne-Delalande, B., Kanellopoulou, C., Davis, J. C., Matthews, H. F., Douek, D. C., Cohen, J. I., Uzel, G., Su, H. C. und Lenardo, M. J. (2012). "Signaling role for Mg<sup>2+</sup> revealed by immunodeficiency due to loss of MagT1." *Nature* **475**(7357): 471.
- Li, Z., Wei, B., Nangreave, J., Lin, C., Liu, Y., Mi, Y. und Yan, H. (2009). "A replicable tetrahedral nanostructure self-assembled from a single DNA strand." *J Am Chem Soc* **131**(36): 13093–8.
- Lilley, D. M. (2000). "Structures of helical junctions in nucleic acids." *Q Rev Biophys* **33**(2): 109–59.
- Lima-Tenório, M. K., Pineda, Edgardo A Gómez, Ahmad, N. M., Fessi, H. und Elaissari, A. (2015). "Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy." *Int J Pharm* **493**(1-2): 313–27.
- Livshits, M. A., Kaluzhny, D. N. und Minyat, E. E. (2011). "Melting of model HIV-1 stem-loop 1 RNA dimers monitored by 2-aminopurine fluorescence." *J Biomol Struct Dyn* **28**(6): 939–47.
- Lussier, A., Bastet, L., Chauvier, A. und Lafontaine, D. A. (2015). "A kissing loop is important for btuB riboswitch ligand sensing and regulatory control." *J Biol Chem* **290**(44): 26739–51.
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V. und Jordan, A. (2011). "Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme." *J Neurooncol* **103**(2): 317–24.
- Mao, C., Sun, W., Shen, Z. und Seeman, N. C. (1999). "A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA." *Nature* **397**(6715): 144–6.
- Martín-Fernández, B., de-Los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J. und López-Ruiz, B. (2015). "Hairpin-based DNA electrochemical sensor for selective detection of a repetitive and structured target codifying a gliadin fragment." *Anal Bioanal Chem* **407**(12): 3481–8.
- Mashaghi, S., Jadidi, T., Koenderink, G. und Mashaghi, A. (2013). "Lipid nanotechnology." *Int J Mol Sci* **14**(2): 4242–82.
- Mastroianni, A. J., Claridge, S. A. und Alivisatos, A. P. (2009). "Pyramidal and chiral groupings of gold nanocrystals assembled using DNA scaffolds." *J Am Chem Soc* **131**(24): 8455–9.
- McNamara, P. A. (2006). "Trends in RNA research." *Nova Science Publisher, Inc. New York*.

- Mihalusova, M., Wu, J. Y. und Zhuang, X. (2011). "Functional importance of telomerase pseudoknot revealed by single-molecule analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(51): 20339–44.
- Moerz, S. T., Kraegeloh, A., Chanana, M. und Kraus, T. (2015). "Formation Mechanism for Stable Hybrid Clusters of Proteins and Nanoparticles." ACS Nano **9**(7): 6696–705.
- Möller, M., Hermann, A., Groß, R., Diesner, M.-O., Küppers, P., Luther, W., Malanowski, N., Haus, D. und Zweck, A. (2013). "Nanomaterialien: Auswirkungen auf Umwelt und Gesundheit." vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich.
- Monteiro-Riviere, N. A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A. O. und Riviere, J. E. (2011). "Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study." Toxicol Sci **123**(1): 264–80.
- Morille, M., Montier, T., Legras, P., Carmoy, N., Brodin, P., Pitard, B., Benoît, J.-P. und Passirani, C. (2010). "Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting." Biomaterials **31**(2): 321–9.
- Mundigala, H., Michaux, J. B., Feig, A. L., Ennifar, E. und Rueda, D. (2014). "HIV-1 DIS stem loop forms an obligatory bent kissing intermediate in the dimerization pathway." Nucleic Acids Res **42**(11): 7281–9.
- Ng, C. P., Goodman, T. T., Park, I.-K. und Pun, S. H. (2009). "Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility." Biomaterials **30**(5): 951–8.
- Nick, P. und Opatrny, Z. (2014). "Applied Plant Cell Biology: Cellular Tools and Approaches for Plant Biotechnology." Springer-Verlag Berlin Heidelberg **22**.
- Ouellet, D. L., Vigneault-Edwards, J., Létourneau, K., Gobeil, L.-A., Plante, I., Burnett, J. C., Rossi, J. J. und Provost, P. (2013). "Regulation of host gene expression by HIV-1 TAR microRNAs." Retrovirology **10**: 86.
- Ouldrige, T. E., Hoare, R. L., Louis, A. A., Doye, Jonathan P K, Bath, J. und Turberfield, A. J. (2013). "Optimizing DNA nanotechnology through coarse-grained modeling: a two-footed DNA walker." ACS Nano **7**(3): 2479–90.
- Parkinson, G. N., Lee, Michael P H und Neidle, S. (2002). "Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA." Nature **417**(6891): 876–80.
- Pei, H., Le Liang, Yao, G., Li, J., Huang, Q. und Fan, C. (2012). "Reconfigurable three-dimensional DNA nanostructures for the construction of intracellular logic sensors." Angew Chem Int Ed Engl **51**(36): 9020–4.
- Qian, W.-Y., Sun, D.-M., Zhu, R.-R., Du, X.-L., Liu, H. und Wang, S.-L. (2012). "pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release." Int J Nanomedicine **7**: 5781–92.
- Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L. und Mahmoudi, M. (2013). "Protein-nanoparticle interactions." Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Romano, F., Hudson, A., Doye, Jonathan P K, Ouldrige, T. E. und Louis, A. A. (2012). "The effect of topology on the structure and free energy landscape of DNA kissing complexes." J Chem Phys **136**(21): 215102.
- Rothmund, Paul W K (2006). "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns." Nature **440**(7082): 297–302.

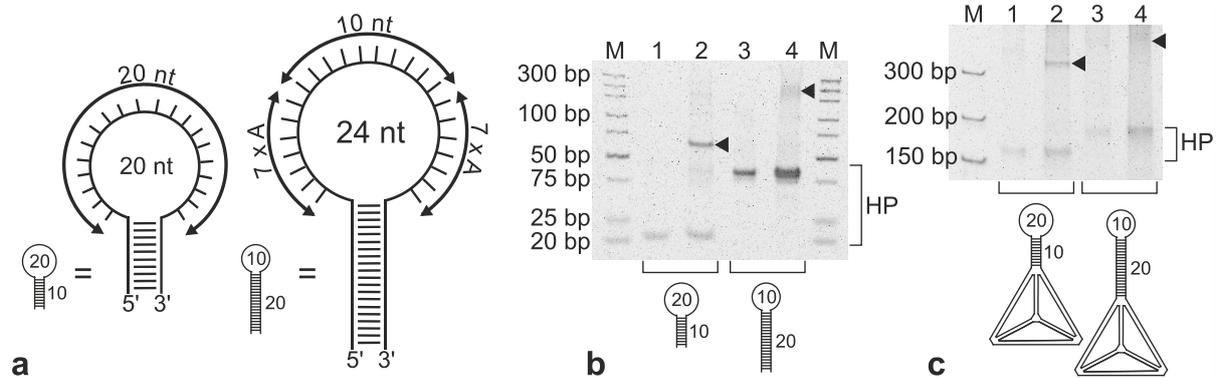
- Saccà, B., Meyer, R., Erkelenz, M., Kiko, K., Arndt, A., Schroeder, H., Rabe, K. S. und Niemeyer, C. M. (2010). "Orthogonal protein decoration of DNA origami." Angew Chem Int Ed Engl **49**(49): 9378–83.
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. und Simpson, A. J. (1994). "Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels." BioTechniques **17**(5): 914–21.
- Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. und Lewenstam, A. (2000). "Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects." Clin Chim Acta **294**(1-2): 1–26.
- Schlapak, R., Danzberger, J., Armitage, D., Morgan, D., Ebner, A., Hinterdorfer, P., Pollheimer, P., Gruber, H. J., Schäffler, F. und Howorka, S. (2012). "Nanoscale DNA tetrahedra improve biomolecular recognition on patterned surfaces." Small **8**(1): 89–97.
- Seelig, G., Yurke, B. und Winfree, E. (2006). "Catalyzed relaxation of a metastable DNA fuel." J Am Chem Soc **128**(37): 12211–20.
- Serganov, A., Keiper, S., Malinina, L., Tereshko, V., Skripkin, E., Höbartner, C., Polonskaia, A., Phan, A. T., Wombacher, R., Micura, R., Dauter, Z., Jäschke, A. und Patel, D. J. (2005). "Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation." Nat Struct Mol Biol **12**(3): 218–24.
- Sherman, W. B. und Seeman, N. C. (2004). "A Precisely Controlled DNA Biped Walking Device." Nano Lett **4**(7): 1203–7.
- Shetty, S., Kim, S., Shimakami, T., Lemon, S. M. und Mihailescu, M.-R. (2010). "Hepatitis C virus genomic RNA dimerization is mediated via a kissing complex intermediate." RNA **16**(5): 913–25.
- Shi, S., Gao, S., Cao, T., Liu, J., Gao, X., Hao, J., Lv, C., Huang, H., Xu, J. und Yao, T. (2013). "Targeting human telomeric G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity with [(dmb)2Ru(obip)Ru(dmb)2](4+)." PLoS ONE **8**(12): e84419.
- Shih, W. M., Quispe, J. D. und Joyce, G. F. (2004). "A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron." Nature **427**(6975): 618–21.
- Simmons, C. R., Schmitt, D., Wei, X., Han, D., Volosin, A. M., Ladd, D. M., Seo, D.-K., Liu, Y. und Yan, H. (2011). "Size-selective incorporation of DNA nanocages into nanoporous antimony-doped tin oxide materials." ACS Nano **5**(7): 6060–8.
- Sinden, R. R. (1994). "DNA structure and function" Academic Press, Inc.
- Soreni, M., Yogev, S., Kossoy, E., Shoham, Y. und Keinan, E. (2005). "Parallel biomolecular computation on surfaces with advanced finite automata." J Am Chem Soc **127**(11): 3935–43.
- Sponer, J., Berger, I., Spačková, N., Leszczynski, J. und Hobza, P. (2000). "Aromatic Base Stacking in DNA: From ab initio Calculations to Molecular Dynamics Simulations." J Biomol Struct Dyn **17 Suppl 1**: 1–24.
- Staple, D. W. und Butcher, S. E. (2005). "Pseudoknots: RNA structures with diverse functions." PLoS Biol **3**(6): e213.
- Stephanopoulos, N., Freeman, R., North, H. A., Sur, S., Jeong, S. J., Tantakitti, F., Kessler, J. A. und Stupp, S. I. (2015). "Bioactive DNA-peptide nanotubes enhance the differentiation of neural stem cells into neurons." Nano Lett **15**(1): 603–9.
- Sterling, J. P. (2014). "Silver-resistance, allergy, and blue skin: truth or urban legend?" Burns **40 Suppl 1**: S19-23.

- Šulc, P., Romano, F., Ouldrige, T. E., Rovigatti, L., Doye, Jonathan P K und Louis, A. A. (2012). "Sequence-dependent thermodynamics of a coarse-grained DNA model." *J Chem Phys* **137**(13): 135101.
- Sun, H., Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W. und Zu, Y. (2014). "Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy." *Mol Ther Nucleic Acids* **3**: e182.
- Takahashi, K. I., Baba, S., Chattopadhyay, P., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H. und Kawai, G. (2000). "Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome." *RNA* **6**(1): 96–102.
- Tans, S. J., Verschueren, A. R. M. und Dekker, C. (1998). "Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube." *Nature* **393**(6680): 49–52.
- Tomizawa, J. (1984). "Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript." *Cell* **38**(3): 861–70.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. und Som, T. (1981). "Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(3): 1421–5.
- van Rijt, S. H., Bölükbas, D. A., Argyo, C., Datz, S., Lindner, M., Eickelberg, O., Königshoff, M., Bein, T. und Meiners, S. (2015). "Protease-mediated release of chemotherapeutics from mesoporous silica nanoparticles to ex vivo human and mouse lung tumors." *ACS Nano* **9**(3): 2377–89.
- Wagner, C., Ehresmann, C., Ehresmann, B. und Brunel, C. (2004). "Mechanism of dimerization of bicoid mRNA: initiation and stabilization." *J Biol Chem* **279**(6): 4560–9.
- Wagner, E. G. und Brantl, S. (1998). "Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication." *Trends Biochem Sci* **23**(12): 451–4.
- Walsh, A. S., Yin, H., Erben, C. M., Wood, Matthew J A und Turberfield, A. J. (2011). "DNA cage delivery to mammalian cells." *ACS Nano* **5**(7): 5427–32.
- Wang, Z., Xue, Q., Tian, W., Wang, L. und Jiang, W. (2012). "Quantitative detection of single DNA molecules on DNA tetrahedron decorated substrates." *Chem Commun (Camb)* **48**(77): 9661–3.
- Weixlbaumer, A., Werner, A., Flamm, C., Westhof, E. und Schroeder, R. (2004). "Determination of thermodynamic parameters for HIV DIS type loop-loop kissing complexes." *Nucleic Acids Res* **32**(17): 5126–33.
- Wilks, T. R., Bath, J., de Vries, Jan Willem, Raymond, J. E., Herrmann, A., Turberfield, A. J. und O'Reilly, R. K. (2013). ""Giant surfactants" created by the fast and efficient functionalization of a DNA tetrahedron with a temperature-responsive polymer." *ACS Nano* **7**(10): 8561–72.
- Xing, S., Jiang, D., Li, F., Li, J., Li, Q., Huang, Q., Guo, L., Xia, J., Shi, J., Fan, C., Zhang, L. und Wang, L. (2015). "Constructing Higher-Order DNA Nanoarchitectures with Highly Purified DNA Nanocages." *ACS Appl Mater Interfaces* **7**(24): 13174–9.
- Yakovchuk, P., Protozanova, E. und Frank-Kamenetskii, M. D. (2006). "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix." *Nucleic Acids Res* **34**(2): 564–74.
- Yildirimer, L., Thanh, Nguyen T K, Loizidou, M. und Seifalian, A. M. (2011). "Toxicology and clinical potential of nanoparticles." *Nano Today* **6**(6): 585–607.
- Yokokawa, R., Murakami, T., Sugie, T. und Kon, T. (2008). "Polarity orientation of microtubules utilizing a dynein-based gliding assay." *Nanotechnology* **19**(12): 125505.

- Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills, A. P., Simmel, F. C. und Neumann, J. L. (2000). "A DNA-fuelled molecular machine made of DNA." Nature **406**(6796): 605–8.
- Zhang, C., He, Y., Chen, Y., Ribbe, A. E. und Mao, C. (2007). "Aligning one-dimensional DNA duplexes into two-dimensional crystals." J Am Chem Soc **129**(46): 14134–5.
- Zhang, C., Su, M., He, Y., Leng, Y., Ribbe, A. E., Wang, G., Jiang, W. und Mao, C. (2010). "Exterior modification of a DNA tetrahedron." Chem Commun (Camb) **46**(36): 6792–4.
- Zhang, C., Tian, C., Guo, F., Liu, Z., Jiang, W. und Mao, C. (2012). "DNA-directed three-dimensional protein organization." Angew Chem Int Ed Engl **51**(14): 3382–5.
- Zhang, D. Y. und Seelig, G. (2011). "Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions." Nat Chem **3**(2): 103–13.
- Zhang, Y. und Seeman, N. C. (1994). "Construction of a DNA-Truncated Octahedron." J. Am. Chem. Soc. **116**(5): 1661–9.
- Zhou, T., Wang, Y., Dong, Y., Chen, C., Liu, D. und Yang, Z. (2014). "Tetrahedron DNA dendrimers and their encapsulation of gold nanoparticles." Bioorg Med Chem **22**(16): 4391–4.
- Zimmermann, J., Cebulla, Martin P J, Mönninghoff, S. und Kiedrowski, G. von (2008). "Self-assembly of a DNA dodecahedron from 20 trisoligonucleotides with C(3h) linkers." Angew Chem Int Ed Engl **47**(19): 3626–30.
- Zwicke, G. L., Mansoori, G. A. und Jeffery, C. J. (2012). "Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics." Nano Rev **3**.

## 9 ANHANG

### 9.1 Einfluss der *Hairpin*-Struktur auf das *Kissing-Loop*-Annealing



**Abbildung 25: Die Länge des Stamm- und Loop-Bereichs einer *Hairpin*-Struktur hat Einfluss auf die Bildung des *Kissing-Loop*.**

a) Um den Einfluss der verwendeten *Hairpin*-Sequenz auf das *Annealing* der *Loops* zu einem *Kissing-Loop*-Produkt zu überprüfen, wurden zwei *Hairpin*-Spezies in ihrem Hybridisierungsverhalten verglichen. Diese unterschieden sich in der Länge der Hybridisierungssequenz im *Loop*-Bereich, sowie der Stammsequenz, so dass ein *Hairpin* eine, durch einen zehn Basenpaare langen Stammbereich begrenzten, 20 nt-*Loop*-Bereich aufwies (HP 1 und HP 2). Der zweite *Hairpin* dagegen hatte eine, durch einen 20 Basenpaar langen Stammbereich abgegrenzten, 24 Nucleotide lange *Loop*-Sequenz (HP 10A und HP 10B). Diese verfügte jedoch nur über einen zehn Nucleotide langen, zentralen Hybridisierungsbereich, wohingegen der erste *Hairpin* über alle 20 Nucleotide des *Loops* hybridisieren konnte.

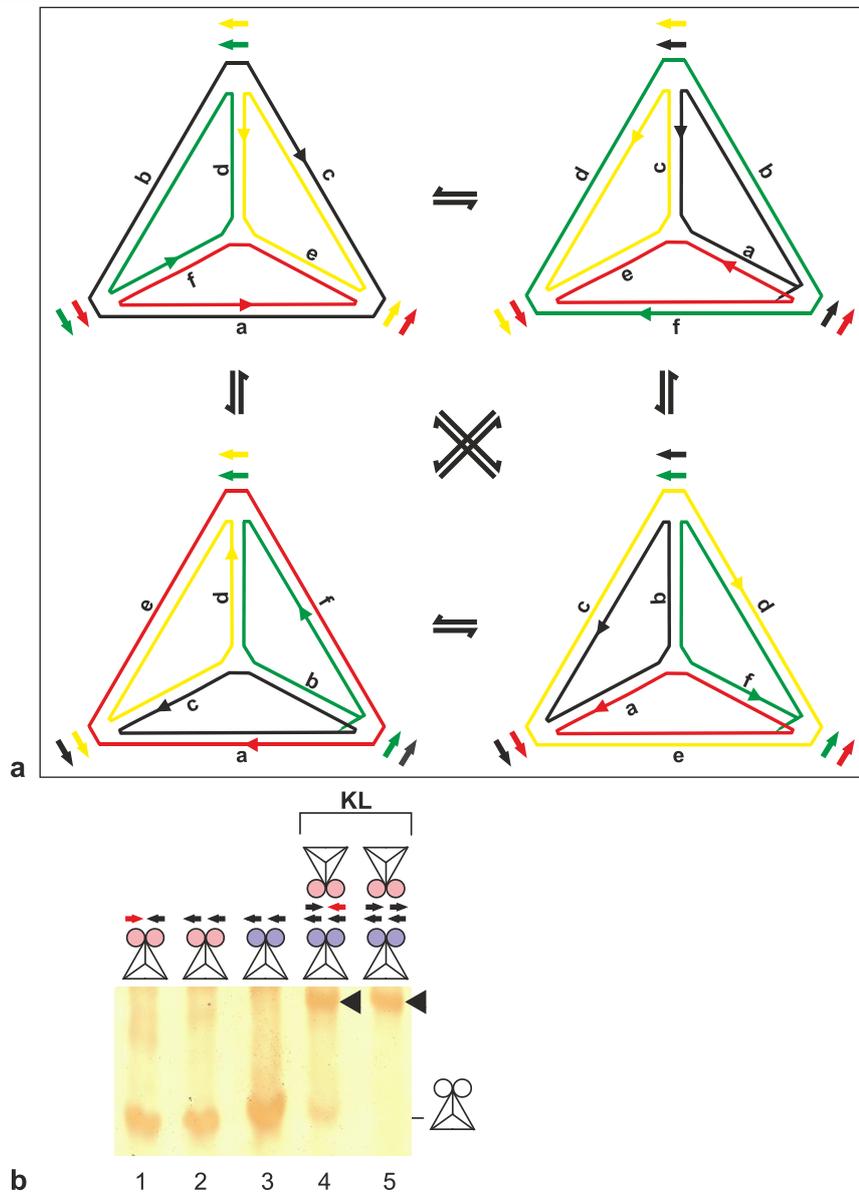
b–c) Die Fähigkeit beider *Hairpin*-Strukturen ein *Kissing-Loop* auszubilden wurde sowohl bei den reinen *Hairpin*-Strukturen (b), sowie als Funktionalisierung von Tetraedern (c) getestet. Es wurde ersichtlich, dass bereits für das *Hairpin*-Paar mit kurzer, zentraler zehn Nucleotide langer Hybridisierungssequenz (b3) eine reduzierte Fähigkeit zur *Kissing-Loop*-Bildung vorlag (b4). Dies zeigte sich auch bei Bindung an einen Tetraeder (c3), wobei in beiden Fällen eine leichte, aber unscharfe Produktbande erkennbar war (c4). Ein deutliches *Kissing-Loop*-Produkt (2), sowohl beim *Annealing* der *Hairpins* (b), als auch der funktionalisierten Tetraeder (c) ist dagegen für die *Hairpin*-Struktur mit einer vollständig komplementären 20 nt-*Loop*-Sequenz (1) zu erkennen. Darüber hinaus entspricht die Bandenlaufhöhe der jeweiligen Produktbande, im Vergleich zum DNA-Basenpaarmarker, einer apparenten Verdopplung des Molekulargewichtes (Dimerisierung). Das *Annealing* der *Hairpin*-Strukturen und Tetraeder erfolgte im Vorfeld zum *Kissing-Loop*-*Annealing*s in TAE/Mg<sup>2+</sup>-Puffer, wie für DNA-Tetraeder in Kapitel 2.2.1 beschrieben, in diesem Puffer fand auch das *Kissing-Loop*-*Annealing* bei einer Endkonzentration von 2 µM und auf Eis statt. Die Analyse erfolgte auf 8 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgelen bei < 25 °C.

**Tabelle 8: Übersicht aller für Kapitel 9.2. verwendeten Oligonukleotide.**

Für die in Kapitel 9.2. (Abbildung 26) durchgeführten Versuche wurden zwei *Hairpin*-Strukturen aus Bois *et al.*, 2005 (HP 1 und HP 2), sowie zwei weitere *Hairpin*-Strukturen (HP 10A und HP 10B) in ihrem *Kissing-Loop*-Verhalten untersucht. Hierfür wurden sowohl die *Hairpin*-Strukturen alleine, als auch gebunden an 1-*Loop*-Tetraeder getestet. Die für die Assemblierung der Tetraeder und *Hairpin*-Strukturen zusätzlich notwendigen DNA-Sequenzen sind in dieser Tabelle aufgeführt.

Name	5'-3' Sequenz	Länge [nt]	HP-Position
<b>Oligonukleotide für die Assemblierung der DNA-Tetraeder mit <i>Hairpin</i>-Sequenz HP 10A und HP 10B</b>			
S4-10A	CCTCGCATGACTGGAGCGCAGTCCTCCGAGATCGAGAAA AAAAGTCTGCAGGTAAAAAACTCGATCTCGGAGGACTG CGCTCCAGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGGATGGGCA TGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	140	zentral
S4-10B	CCTCGCATGAGACCTCGCGTCAGGAGGCTCGACCTCAA AAAAACCTGCAGACAAAAAAGAGGTTCGAGCCTCCTGA CGCGAGGTCACTCAACTGCCTGGTGATACGAGGATGGGC ATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC	140	zentral
<b><i>Hairpin</i>-Strukturen</b>			
HP 10A	CTGGACCGCAGTCCTCCGAGCTCGAGAAAAAAGTCTGC AGGTAAAAAACTCGAGCTCGGAGGACTGCGGTCCAG	76	-
HP 10B	GACCTGGCCTCAGGAGGCTCGAGCTCAAAAAAACCTGC AGACAAAAAAGAGCTCGAGCCTCCTGAGGCCAGGTC	76	-

## 9.2 Einfluss der *Loop*-Direktionalität auf das *Kissing-Loop-Annealing* von *2-Loop-Tetraedern*

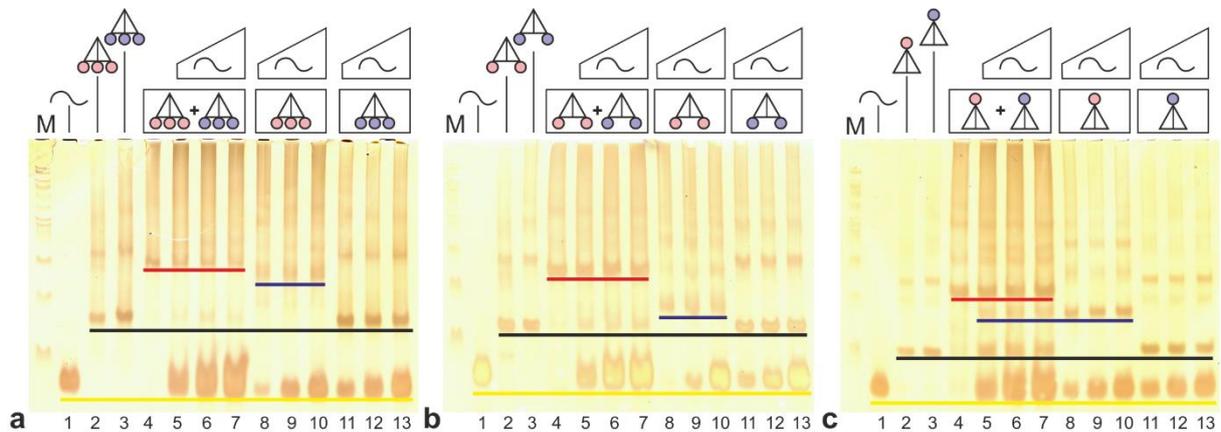


**Abbildung 26: Einfluss der *Loop*-Direktionalität auf die Bildung des *Kissing-Loop*-Produkts bei erhöhter *Loop*-Anzahl.**

a) Die Direktionalität der Stamm-*Loop*-Strukturen an DNA-Tetraedern ist abhängig vom jeweils modifizierten DNA-Strang S1 (rot), S2 (gelb), S3 (grün) und S4 (schwarz). Die freien Enden der Stränge wurden jeweils durch eine Pfeilspitze in 5'-3'-Richtung markiert. Zur Veranschaulichung wurden darüber hinaus die, an einer Fläche liegenden, möglichen Positionen für Stamm-*Loop*-Strukturen durch Pfeile markiert, die die Direktionalität der Stamm-*Loop*-Strukturen wiedergeben. Pro Ecke könnten daher bis zu zwei *Loops* mit gleicher Direktionalität an einer Ecke angebracht werden.

b) In einem ergänzenden Experiment sollte der Einfluss der *Loop*-Direktionalität im Hinblick auf ein mehrfaches *Kissing-Loop-Annealing* zwischen zwei miteinander hybridisierten Tetraedern mit Stamm-*Loop*-Strukturen an verschiedenen Ecken gezeigt werden. Hierfür wurden zwei *2-Loop*-Tetraeder mit *Loop*-Sequenz HP 1 (rot, 1-2) hergestellt. Dabei wies einer der Tetraeder einen zweiten *Loop*-Bereich in entgegengesetzter Direktionalität (1) auf. Beide Tetraeder wurden in einem *Kissing-Loop*-Ansatz mit einem *2-Loop*-Tetraeder HP 2 (blau, 3) hybridisiert. Es ist deutlich, dass im Fall zweier zueinander komplementärer und in entgegengesetzter Richtung orientierten *Loop*-Bereiche (5) eine größere Menge Monomer umgesetzt wurde und im Gegensatz dazu bei einer invertierten *Loop*-Sequenz (4) eine größere Menge nicht umgesetzten Monomers verblieb.

### 9.3 Stabilität des *Kissing-Loop*-Komplex durch erhöhte *Loop*-Anzahl in Anwesenheit eines *Capping*-Oligonukleotids



**Abbildung 27: Verbesserte *Kissing-Loop*-Stabilität durch erhöhte *Loop*-Anzahl in Anwesenheit eines *Capping*-Oligonukleotids.**

Die 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgele wurden mittels sensitiver Silberfärbung angefärbt. Niedrigkonzentrierte, hochmolekulare Sekundärprodukte wurden hierdurch ebenfalls sichtbar gemacht. Für eine verbesserte Übersichtlichkeit wurden alle Hauptprodukte durch farbige Unterlegung markiert. Es wurden sowohl *Kissing-Loop*-Produkte (rot) und deren Monomere (schwarz) mit drei (a) und mit zwei (b), als auch nur mit einer einzelnen nach außen gerichteten Stamm-*Loop*-Struktur (c) in Anwesenheit eines *Capping*-Oligonukleotids (1) untersucht. Das *Capping*-Oligonukleotid wurde hierbei in steigender Konzentration in drei parallelen Ansätzen (von links nach rechts aufgetragen) verwendet, um einen konzentrationsabhängigen Effekt erkennen zu können. Hierfür wurde *Capping*-Oligonukleotid, in einem Verhältnis von 2:1, 1:1 und 1:2 zur Menge des Tetraeders HP 1, zum *Kissing-Loop*-Produkt (5–7), zum Tetraedermonomer HP 1 (8–10) und zum Tetraedermonomer HP 2 (11–13) hinzugefügt. Als Kontrolle wurden jeweils beide Monomere (HP 1 = roter *Loop* (2), HP 2 = blauer *Loop* (3)) einzeln mit *Capping*-Oligonukleotid inkubiert. Wie zu erwarten konnten Tetraedermomere mit HP 1-*Loops* zusammen mit *Capping*-Oligonukleotid (8–10) ein Hybridisierungsprodukt (blaue Markierung) bilden, wohingegen keine Hybridisierung mit Monomer HP 2 möglich war (11–13). Das *Kissing-Loop*-Produkt (4) jedes getesteten Tetraeders zeigten eine hohe Stabilität in Anwesenheit des *Capping*-Oligonukleotids (5–7). Ein leichter Zerfall in Monomere war in allen Fällen zu beobachten, wobei kein Hybridisierungsprodukt aus Tetraeder HP 1 und *Capping*-Oligonukleotid für 2-*Loop*- und 3-*Loop*-Tetraeder sichtbar wurde. Ausschließlich das *Kissing-Loop*-Produkt des 1-*Loop*-Tetraeders (c) zeigte Zerfall durch eine deutlichen Monomer- (schwarze) und *Capping*-Oligonukleotid-Hybridbande (blau). Im Fall der *Kissing-Loop*-Ansätze wurde der gesamte Ansatz (10 pmol) auf das Gel geladen, je Kontrolle wurden 2 pmol des Ansatzes geladen.

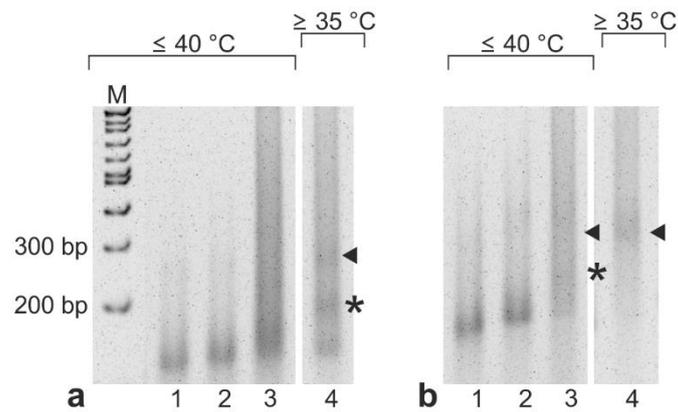
## 9.4 Hintergrunddaten zur Testung des Temperatureinflusses auf die Stabilität der *Kissing-Loop-Komplexes*

Tabelle 9: Statistische Daten zur Temperatursensitivität der *Kissing-Loop-Komplexes* (°C)

	0 Loops		1 Loop		2 Loops		3 Loops					
	Messwert	Monomer [%]	Messwert	Monomer [%]	Messwert	Monomer [%]	Messwert	Monomer [%]				
<b>&lt;25 °C</b>												
Gel 1	3,86E+07	100	0	2,01E+07	51,99	48,01	20,93	79,07	5,11E+06	13,25	86,75	
Gel 2	4,17E+07	100	0	2,73E+07	65,30	34,70	1,26E+07	30,20	69,80	6,25E+06	14,98	85,02
Gel 3	4,54E+07	100	0	2,78E+07	61,33	38,67	1,35E+07	29,85	70,15	7,37E+06	16,24	83,76
Mittelwert	4,19E+07	100	0	2,50E+07	59,54	<b>40,46</b>	1,14E+07	26,99	<b>73,01</b>	6,24E+06	14,82	<b>85,18</b>
STABW	3,41E+06	0	0	4,33E+06	6,83	6,83	2,92E+06	5,25	5,25	1,13E+06	1,50	1,50
<b>30-35 °C</b>												
Gel 1	3,71E+07	100	0	3,21E+07	86,45	13,55	1,90E+07	51,27	48,73	7,75E+06	20,89	79,11
Gel 2	4,01E+07	100	0	3,52E+07	87,86	12,14	2,22E+07	55,43	44,57	7,98E+06	19,90	80,10
Gel 3	4,28E+07	100	0	3,73E+07	87,12	12,88	2,48E+07	57,88	42,12	8,53E+06	19,93	80,07
Mittelwert	4,00E+07	100	0	3,49E+07	87,15	<b>12,85</b>	2,20E+07	54,86	<b>45,14</b>	8,09E+06	20,24	<b>79,76</b>
STABW	2,86E+06	0	0	2,63E+06	0,71	0,71	2,88E+06	3,34	3,34	4,02E+05	0,56	0,56
<b>35-40 °C</b>												
Gel 1	3,34E+07	100	0	2,99E+07	89,32	10,68	2,79E+07	83,49	16,51	1,16E+07	34,64	65,36
Gel 2	3,64E+07	100	0	3,55E+07	97,59	2,41	3,12E+07	85,64	14,36	1,49E+07	41,04	58,96
Gel 3	4,41E+07	100	0	3,56E+07	80,58	19,42	3,16E+07	71,53	28,47	1,54E+07	34,99	65,01
Mittelwert	3,80E+07	100	0	3,36E+07	89,16	<b>10,84</b>	3,02E+07	80,22	<b>19,78</b>	1,40E+07	36,89	<b>63,11</b>
STABW	5,53E+06	0	0	3,28E+06	8,51	8,51	2,01E+06	7,60	7,60	2,10E+06	3,60	3,60
<b>35-40 °C</b>												
Gel 1	3,57E+07	100	0	3,41E+07	95,35	4,65	3,12E+07	87,21	12,79	1,92E+07	53,68	46,32
Gel 2	3,57E+07	100	0	3,43E+07	96,11	3,89	3,29E+07	92,13	7,87	2,25E+07	62,99	37,01
Gel 3	3,85E+07	100	0	3,52E+07	91,46	8,54	3,65E+07	94,81	5,19	2,30E+07	59,57	40,43
Mittelwert	3,67E+07	100	0	3,46E+07	94,31	<b>5,69</b>	3,35E+07	91,38	<b>8,62</b>	2,15E+07	58,75	<b>41,25</b>
STABW	1,62E+06	0	0	6,13E+05	2,50	2,50	2,74E+06	3,85	3,85	2,06E+06	4,71	4,71

### Statistische Signifianz (t-Test)

Temperatur:	< 25 °C	30-35 °C	35-40 °C	40-45 °C
2 Loops	0,0478	0,0025	0,0036	0,0009
1 Loop	0,0058	0,0000	0,0035	0,0013
3 Loops				
2 Loops				
1 Loop				
3 Loops				
2 Loops				
1 Loop				



**Abbildung 28: Gelelektrophoretische Bandentrennung von *Kissing-Loop*-Komplexen unter hohen Temperaturbedingungen**

Nach einer Gelelektrophorese bei 30–35 °C (4) und bei 40–45 °C (1-3) zeigten sich unterschiedliche Banden in den *Kissing-Loop-Annealing*-Ansätzen von 2-*Loop*- (a) und 3-*Loop*-Tetraeder (b). In Spur 1 und 2 waren jeweils die Ausgangsmomere mit HP 1 und HP 2 aufgetragen. Während des *Kissing-Loop*-Produkt (◄) aus 2-*Loop*-Tetraeder bereits bei 30–35 °C, unter Bildung eines Intermediats (\*), zerfiel, lag des *Kissing-Loop*-Produkt (◄) aus 3-*Loop*-Tetraedern noch vollständig vor. Ab einer Temperatur über 40 °C war keine *Kissing-Loop*-Produkt des 2-*Loop*-Tetraeders mehr nachweisbar, wohingegen der Zerfall des *Kissing-Loop*-Produkts aus 3-*Loop*-Tetraedern, unter Bildung eines Intermediats (\*), erstmals einsetzte. Die Proben wurden auf 4 % TAE/Mg<sup>2+</sup>-Polyacrylamidgelen nach Fluoreszenzfärbung analysiert. Als DNA-Marker diente der der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder von Thermo Scientific.

## 9.5 Hintergrunddaten zur Testung des Einflusses der Ionenstärke auf die Stabilität des *Kissing-Loop*-Komplexes

Tabelle 10: Statistische Daten zur Testung der Ionenstärkesensitivität des *Kissing-Loop*-Komplexes in Anwesenheit von Kalium (K<sup>+</sup>)

	0 mM			11,5 mM		
	Messwert	Monomer [%]	KL [%]	Messwert	Monomer [%]	KL [%]
<b>1 Loop</b>						
Gel 1	3,84E+07	100	0	4,62E+07	120,32	-20,32
Gel 2	4,43E+07	100	0	4,41E+07	99,66	0,34
Gel 3	4,65E+07	100	0	4,21E+07	90,61	9,39
Mittelwert	4,30E+07	100	0	4,41E+07	103,53	-3,53
STABW	4,17E+06	0	0	2,05E+06	15,23	15,23
<b>2 Loops</b>						
Gel 1	3,91E+07	100	0	4,49E+07	114,87	-14,87
Gel 2	4,18E+07	100	0	4,22E+07	100,98	-0,98
Gel 3	4,22E+07	100	0	3,61E+07	85,49	14,51
Mittelwert	4,10E+07	100	0	4,11E+07	100,45	-0,45
STABW	1,72E+06	0	0	4,51E+06	14,70	14,70
<b>3 Loops</b>						
Gel 1	3,85E+07	100	0	4,12E+07	106,96	-6,96
Gel 2	3,93E+07	100	0	3,56E+07	90,55	9,45
Gel 3	4,51E+07	100	0	4,22E+07	93,56	6,44
Mittelwert	4,09E+07	100	0	3,96E+07	97,02	2,98
STABW	3,61E+06	0	0	3,57E+06	8,73	8,73

### Statistische Signifianz (t-Test)

Kalium (K <sup>+</sup> )		11,5 mM
3 Loops		
2 Loops		0,7501
1 Loop		0,5641

Kalium (K <sup>+</sup> )		11,5 mM
2 Loops		
1 Loop		0,8132



**Tabelle 12: Statistische Daten zur Testung der Ionenstärkesensitivität des *Kissing-Loop*-Komplexes in Anwesenheit von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

	0 mM		0,625 mM		1,25 mM		11,5 mM	
	Messwert	Monomer [%]						
<b>1 Loop</b>								
Gel 1	3,84E+07	100	3,79E+07	98,71	4,29E+07	111,70	3,53E+07	92,06
Gel 2	4,43E+07	100	4,22E+07	95,32	4,32E+07	97,57	3,76E+07	84,86
Gel 3	4,65E+07	100	4,22E+07	90,91	4,44E+07	95,64	4,34E+07	93,35
Mittelwert	4,30E+07	100	4,08E+07	94,98	4,35E+07	101,64	3,88E+07	90,09
STABW	4,17E+06	0	2,49E+06	3,91	8,17E+05	8,77	4,14E+06	4,57
<b>2 Loops</b>								
Gel 1	3,91E+07	100	3,26E+07	83,52	2,22E+07	56,77	8,86E+06	22,67
Gel 2	4,18E+07	100	4,01E+07	95,93	2,30E+07	55,09	1,33E+07	31,88
Gel 3	4,22E+07	100	4,16E+07	98,62	2,53E+07	59,89	1,37E+07	32,47
Mittelwert	4,10E+07	100	3,81E+07	92,69	2,35E+07	57,25	1,20E+07	29,01
STABW	1,72E+06	0	4,83E+06	8,06	1,61E+06	2,44	2,70E+06	5,50
<b>3 Loops</b>								
Gel 1	3,85E+07	100	1,89E+07	49,14	9,91E+06	25,75	3,34E+06	8,69
Gel 2	3,93E+07	100	2,34E+07	59,66	1,10E+07	27,89	4,15E+06	10,57
Gel 3	4,51E+07	100	2,49E+07	55,29	1,23E+07	27,20	5,55E+06	12,30
Mittelwert	4,09E+07	100	2,24E+07	54,70	1,10E+07	26,95	4,35E+06	10,52
STABW	3,61E+06	0	3,13E+06	5,29	1,18E+06	1,09	1,12E+06	1,81

**Statistische Signifianz (t-Test)**

	0,625 mM		1,25 mM		11,5 mM	
	3 Loops	3 Loops	3 Loops	3 Loops	2 Loops	2 Loops
<b>Calcium (<math>\text{Ca}^{2+}</math>)</b>						
2 Loops	0,0040	0,0005				
1 Loop	0,0007	0,0041				
<b>Calcium (<math>\text{Ca}^{2+}</math>)</b>						
2 Loops	0,6896	0,0088				
1 Loop						

