

Einstellen der strukturellen Eigenschaften von DNA-Blockcopolymermicellen durch molekulare Erkennung**

Ke Ding, Fikri E. Alemdaroglu, Michael Börsch, Rüdiger Berger* und Andreas Herrmann*

Professor Klaus Müllen zum 60. Geburtstag gewidmet

Amphiphile Blockcopolymere ordnen sich in Lösung zu einer Vielzahl verschiedener Morphologien. Meistens entstehen Kugeln, Stäbchen oder Vesikel,^[1,2] gelegentlich wurden aber auch Lamellen, große Verbundvesikel, hexagonal gepackte hohle Ringe, große Verbundmicellen und zwiebelförmige Strukturen erhalten.^[3] In den letzten Jahren versuchte man, diese in Lösung vorliegenden Morphologien auf unterschiedliche Art und Weise zu modifizieren. Für bestimmte Blockcopolymertypen gelang die Reorganisation durch Änderung des Salzgehaltes, des pH-Wertes,^[4–6] der Polymerkonzentration^[7,8] und der Lösungsmittelzusammensetzung.^[9–11] Andere Versuche, die Struktur der supramolekularen Aggregate von Blockcopolymeren zu verändern, beruhten auf der chemischen Modifizierung des Polymers *in situ*^[12] und der thermisch induzierten Schmelze und Kristallisation.^[13]

Kürzlich wurde eine neue Art von Hybridmaterialien (oder molekularen Chimären) eingeführt, die ein Nucleinsäuresegment und eine organische Polymereinheit enthält.^[14–16] Amphiphile DNA-Blockcopolymere bilden in wässriger Lösung, genau wie andere Polyelektrolyt-Blockcopolymere, sphärische Micellen. Diese Micellen mit einer Korona aus einzelsträngiger (ss-)DNA wurden für den Transport von Antisense-Oligonukleotiden (ODNs),^[17] für die Hybridisierung mit DNA-beschichteten Goldnanopartikeln^[18] und als programmierbare dreidimensionale Gerüste für DNA-gestützte organische Reaktionen verwendet.^[19]

Hier wird ein neues Konzept zur Steuerung des Aggregationsverhaltens von Blockcopolymeren vorgestellt. Sphä-

rische DNA-Blockcopolymermicellen werden mit langen ss-DNA-Templatmolekülen hybridisiert, die mehrmals die komplementäre Sequenz der Micellenkorona codieren. Durch diesen molekularen Erkennungsmechanismus ändert sich die Form der Micellen von Kugeln zu einheitlichen Stäbchen. Durch das Templat kann sogar die Länge der Stäbchenaggregate vorgegeben werden. Visualisiert wird der supramolekulare Reorganisationsprozess durch Rasterkraftmikroskopie (SFM). Außerdem werden die Form und Abmessungen der verschiedenen Blockcopolymeraggregate mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) verifiziert.

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, wie die Struktureigenschaften von DNA-Blockcopolymermicellen durch Hybridisierung verändert werden können. Dabei wird die ss-Nucleinsäureschale der Micellen durch Watson-Crick-Basenpaarung in doppelsträngige (ds-)DNA überführt. Für diesen Zweck wurden DNA-*b*-Polypropylenoxid(PPO)-Polymere ausgewählt. Die Gründe dafür sind wie folgt: Erstens können sie im Milligramm-Maßstab, vollautomatisch und in einem einzigen Prozess mithilfe eines DNA-Syntheseapparates hergestellt werden.^[19] Zweitens weist der organische Polymerblock PPO eine niedrige Glasübergangstemperatur auf ($T_g = -70^\circ\text{C}$). Dies garantiert, dass die Blockcopolymeraggregate einfach in Lösung erzeugt werden können, ohne dass organische Cosolventien und eine nachfolgende Dialyse erforderlich sind. Zusätzlich wird die Bildung von kinetisch stabilisierten „eingefrorenen“ Micellen verhindert, wie sie für Blockcopolymere mit einem glasigen hydrophoben Block bekannt sind. Somit ist es möglich, die Micellaggregate im thermodynamischen Gleichgewicht zu untersuchen. Das ss-DNA-*b*-PPO-Polymer wird analog einer publizierten Vorschrift synthetisiert.^[19] Das biologische Segment besteht aus einem 22-mer ODN (5'-CCTCGCTCTGCTAACCTTG-TTA-3', $M_w = 6670 \text{ g mol}^{-1}$), und der organische Block hat ein Molekulargewicht von 6800 g mol^{-1} .

Micellen aus diesem Material wurden mit der komplementären Sequenz (5'-TAACAGGATTAGCAGAGC-GAGG-3') hybridisiert. Dabei wurden DNA-Blockcopolymermicellen mit einer ds-DNA-Schale gebildet (Abbildung 1a). Um zu untersuchen, ob die Hybridisierung die Struktureigenschaften der Micellen beeinflusst, wurden diese mit SFM visualisiert. Die Messungen wurden im Soft-Tapping-Modus im Hybridisierungspuffer auf einer Glimmeroberfläche durchgeführt. Obwohl die Immobilisierung und der Abbildungsprozess die Morphologien der Micellen ändern können, hat sich die SFM zur Untersuchung amphiphiler DNA-Blockcopolymer-Aggregate bewährt.^[17–19] Vor und nach der Doppelhelixbildung zeigen die SFM-Topogra-

[*] M.Sc. K. Ding, M.Sc. F. E. Alemdaroglu, Dr. R. Berger,

Dr. A. Herrmann

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-379100

E-Mail: berger@mpip-mainz.mpg.de
andherrm@mpip-mainz.mpg.de

Dr. M. Börsch

3. Physikalisches Institut
Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde im Rahmen des EUROCORES-Programms BIONICS gefördert. Die Finanzierung erfolgte dabei von der DFG und der EU durch das 6. Rahmenprogramm. Außerdem wurde dieser Beitrag durch das Programm ERA-CHEMISTRY unterstützt. Dr. Roland Bauer wird für die Erstellung von Bildmaterial gedankt.

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

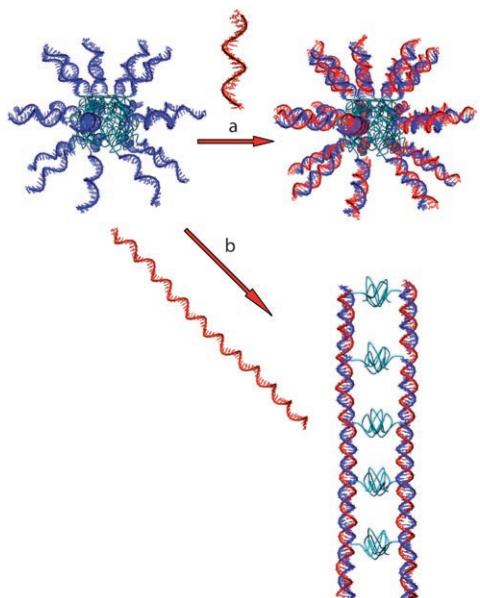


Abbildung 1. Die Hybridisierung von ss-DNA-*b*-PPO-Micellen mit verschiedenenartigen DNA-Molekülen (schematisch). a) Basenpaarung mit einer kurzen komplementären Sequenz führt zu Micellen mit einer ds-Korona, verändert die Gestalt der Aggregate aber nicht. b) Hybridisierung mit einem langen DNA-Templat resultiert in stäbchenförmigen Micellen aus zwei parallelen Doppelhelices.

phiebilder sphärische Micellen (Abbildung 2a,b). Von den Höhenverteilungen der Micellen vor und nach der Basenpaarung wurden Histogramme erstellt (Abbildung 2c); in beiden Fällen variierte die maximale Höhe von 2 bis 11 nm. Für ss-Micellen wurde eine durchschnittliche Höhe von (5.2 ± 1.8) nm erhalten (aus 117 Micellen in 5 SFM-Bildern), für ds-Micellen betrug der Wert (5.8 ± 1.6) nm (aus 116 Micellen in 9 SFM-Bildern). Die SFM-Messungen zeigen, dass eine Hybridisierung von ss-DNA-Blockcopolymermicellen mit der

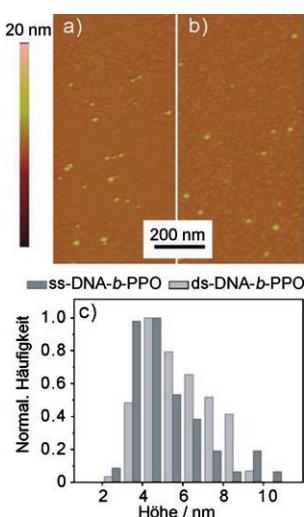


Abbildung 2. a,b) SFM-Bilder von sphärischen DNA-*b*-PPO-Micellen vor (a) und nach (b) der Hybridisierung mit einer kurzen komplementären Sequenz. (Die Höhe wird durch die Farbskala an der linken Seite angezeigt.) c) Höhenprofile von sphärischen ss- und ds-DNA-*b*-PPO-Micellen.

komplementären Sequenz die sphärische Form der Micellen nicht verändert. Die Abweichungen der Durchschnittshöhen bei ss- und ds-Micellen können aus unterschiedlichen Ladungsdichten in der Korona und Micellendeformationen resultieren, die durch Änderungen in den Soft-Tapping-Modus-Parametern herbeigeführt werden. Um Oberflächeneffekte auszuschließen, ist es wichtig, die Struktureigenschaften der Micellen in Lösung zu untersuchen. Hierzu wurden ss- und ds-Micellen mit einer Farbstoffmarkierung (Alexa-488) in FCS-Experimenten studiert.

FCS ist eine hochempfindliche Analysemethode,^[20] die zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von fluoreszenzmarkierten Biomakromolekülen verwendet wird. Auf diese Weise konnte zum Beispiel die DNA-Hybridisierung einzelner Moleküle verfolgt werden.^[21] Ferner wurde FCS angewendet, um Konformationsänderungen bei Enzymen^[22] oder Polymeren^[23] durch Änderung der Diffusionseigenschaften zu detektieren. Hier wurde die Durchgangszeit von frei diffundierenden fluoreszierenden Micellen durch ein Anregungsvolumen von 4.5 fL in Puffer mit einem konfokalen Mikroskop gemessen.^[24] Der Diffusionskoeffizient D wurde aus den durchschnittlichen Diffusionszeiten berechnet. Da der Diffusionskoeffizient mit dem Reibungskoeffizient f der hydratisierten Micellen zusammenhängt, konnte mithilfe der Information über die dreidimensionale Form der immobilisierten DNA-Blockcopolymer-Aggregate der Radius r_0 für die sphärischen Micellen aus den FCS-Diffusionsdaten (siehe Hintergrundinformationen) berechnet werden. Für die ss-DNA-Micellen wurde ein durchschnittlicher Radius von (5.6 ± 0.5) nm ermittelt, bei den ds-DNA-Micellen betrug der Radius (5.3 ± 0.5) nm. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der SFM-Messungen gut überein. Außerdem deuten die FCS-Daten darauf hin, dass die Micellen durch die Immobilisierung abgeflacht sind. Dies röhrt möglicherweise von Wechselwirkungen mit der Substratoberfläche her oder wird durch das SFM-Abbildungsverfahren verursacht.

Nach der Hybridisierung von ss-Micellen mit der komplementären Sequenz wurde die Änderung der Morphologie der DNA-Blockcopolymer-Aggregate untersucht, wenn lange DNA-Moleküle verwendet werden. Die Sequenz dieser Template wurde so gewählt, dass sie die komplementäre Sequenz von DNA-*b*-PPO mehrmals codieren. An die Template T110 ($5'$ -TAACAGGATTAGCAGAGCGAGG)₅- $3'$) und T88 ($5'$ -TAACAGGATTAGCAGAGCGAGG)₄- $3'$) können 5 bzw. 4 DNA-*b*-PPO-Polymeren angelagert werden. Für die Hybridisierungsexperimente wurde das Verhältnis von Blockcopolymer zu langen DNA-Molekülen so eingestellt, dass die Template vollständig hybridisiert wurden. Die entstandenen Strukturen wurden mit SFM auf einer Glimmeroberfläche untersucht. Für das Hybridisierungsprodukt aus DNA-*b*-PPO und T110 konnten keine sphärischen Objekte mehr detektiert werden, statt dessen wurden stäbchenartige Strukturen mit einer durchschnittlichen Höhe von (1.95 ± 0.1) nm und einer Länge von (29.1 ± 6.5) nm beobachtet (Abbildung 3a-f). Die Form und Größe dieser Strukturen entsprechen dem Modell in Abbildung 1b. Nach der Hybridisierung lösen sich die sphärischen DNA-Blockcopolymermicellen auf, und die DNA-*b*-POPs werden linear entlang des Templatmoleküls ausgerichtet. Dabei ist das Nuclein-

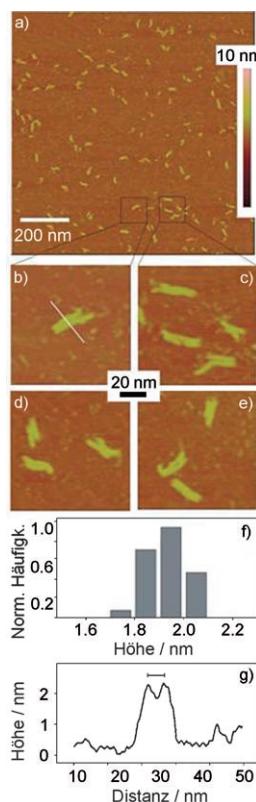


Abbildung 3. a) SFM-Topographiebild der Hybridisierungsprodukte von DNA-*b*-PPO und T110. b–e) Nahaufnahmen von stäbchenförmigen Micellen aus zwei DNA-Helices, die parallel zueinander ausgerichtet sind und ein Dimer bilden. b) und c) sind Nahaufnahmen und wurden mit einer höheren Auflösung aufgenommen als (a). d) und e) sind topographische Abbildungen, die bei anderen Experimenten unter ähnlichen Bedingungen aufgenommen wurden. f) Histogramm der Höhe der stäbchenförmigen Aggregate. g) Höhenprofil entlang der eingezeichneten Linie in (b).

säuresegment des DNA-Blockcopolymers an der Bildung der Doppelhelix mit dem Templat beteiligt, während der hydrophobe Block aus der ds-DNA herausragt. Induziert durch hydrophobe Wechselwirkungen der PPO-Reste, dimerisieren die DNA-PPO-Hybride bei diesem Prozess, sodass stäbchenförmige Micellen gebildet werden (Abbildung 3b–e). Die parallele Anordnung zweier Doppelhelices in einem Abstand von 3–4 nm kann durch eine Querschnittsanalyse senkrecht zur Längsachse der supramolekularen Anordnung nachgewiesen werden (Abbildung 3g). Die Höhe der stäbchenförmigen Aggregate entspricht Werten, die vorher für ds-DNA erhalten wurden.^[25] Die stäbchenförmigen Micellen sind ein wenig kürzer als erwartet für ds-DNA, welche dieselbe Anzahl an Nucleotiden enthält wie das Templat T110 (37.4 nm), wenn man von einem Beitrag von 0.34 nm pro Basenpaar ausgeht.

Zwei unterschiedliche Kontrollexperimente wurden durchgeführt: Zum einen wurden DNA-*b*-PPO-Micellen mit einem 110-mer ODN inkubiert, das nicht zur Sequenz der Micellen komplementär ist. Dabei blieben die Struktureigenschaften der sphärischen Micellen unverändert (nicht gezeigt). Zum anderen wurde das Templat T110 mit einem nicht polymermodifizierten ODN hybridisiert, das die komple-

mentäre Sequenz der Micelle codiert. Durch SFM wurden erwartungsgemäß ds-DNA-Moleküle detektiert, aber keine Dimerbildung.

Um zu beweisen, dass sphärische DNA-Blockcopolymicellen generell in amphiphile Stäbchen umgewandelt werden können, indem man lange DNA-Template verwendet, wurde DNA-*b*-PPO mit T88 hybridisiert. Die SFM-Analyse bestätigte das Verschwinden der sphärischen Micellen und die Bildung der stäbchenförmigen Strukturen, die aus zwei parallelen Doppelhelices von (22.7 ± 5.1) nm Länge und (1.72 ± 0.2) nm Höhe bestehen (siehe Hintergrundinformationen). Die Längenausdehnung ist wiederum etwas geringer als für ds-DNA mit 88 Nucleotiden (29.9 nm).

Die SFM-Resultate wurden durch FCS-Experimente ergänzt, um die Bildung von stäbchenförmigen Micellen auch in Lösung nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden sphärische ss-DNA-Blockcopolymicellen mit T110-Templaten hybridisiert, die den Fluorophor Cy3 tragen. Als Kontrolle wurde das markierte Templat T110 mit der DNA-Sequenz aus DNA-*b*-PPO, allerdings ohne Polymereinheit, hybridisiert, was zur Bildung eines ds-DNA-Moleküls führte.

Die dreidimensionale Form der Micellen und der ds-DNA-Kontrolle wurden in Pufferlösung mithilfe von Diffusionsmessungen untersucht. Ähnlich wie bei den sphärischen Micellen hängt der Reibungskoeffizient f_{Stab} der stäbchenförmigen Micellen mit dem effektiven Radius dieser Objekte zusammen. Werden nun die gemessenen Längenverhältnisse $P_{\text{Dimer}} = 6.3$ des Dimers und $P_{\text{DNA}} = 19$ des ds-DNA-Moleküls verwendet, so sollten die Diffusionszeiten von der Kontrolle zu den amphiphilen Stäbchen um den Faktor 1.16 ansteigen (siehe Hintergrundinformationen). In Abbildung 4 sind die Autokorrelationsfunktionen der stäbchenförmigen Micellen und der ds-DNA-Kontrollen abgebildet. Diese zeigen eine durchschnittliche Diffusionszeit von $\tau_D = (1.9 \pm 0.1)$ ms für die Hybridisierungsprodukte aus DNA-*b*-PPO und T110 sowie $\tau_D = (1.47 \pm 0.1)$ ms für die Kontrolle. Das Verhältnis der Diffusionszeiten (1.29) bestätigt die Erwartungen, dass die Stäbchenform der hydratisierten Micellen und der ds-DNA-Moleküle auch in Lösung erhalten bleibt.

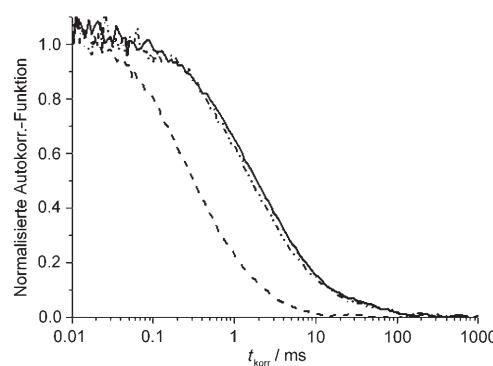


Abbildung 4. Normalisierte Autokorrelationsfunktionen der Hybridisierungsprodukte von DNA-*b*-PPO und T110 in Lösung (durchgezogene Linie), der ds-DNA von T110 und Oligonucleotiden ohne PPO-Funktionalisierung als Kontrolle (gestrichelt-gepunktete Linie) und Rhodamin 6G in Wasser (gestrichelte Linie) als Standard. t_{korr} = Korrelationszeit.

Hier wurde ein konzeptionell neuer Ansatz auf der Grundlage der molekularen Erkennung präsentiert, um selektiv die Struktureigenschaften von Polyelektrolyt-Blockcopolymermicellen zu verändern. Die Hybridisierung von DNA-Blockcopolymer-Aggregaten mit kurzer DNA-Einheit hat keinen signifikanten Einfluss auf die Struktureigenschaften, die Basenpaarung mit langen DNA-Templaten resultiert hingegen in einer Umwandlung von sphärischen zu stäbchenförmigen Micellen. Das Watson-Crick-Motiv richtet die hydrophoben Polymersegmente entlang der DNA-Doppelhelix aus, was zu einer selektiven Dimerbildung auf der Oberfläche führt. Auch die Länge der entstehenden stäbchenförmigen Micellen konnte durch die Anzahl der Nucleotide in den Templatnen eingestellt werden. Charakteristisch für diese neuartige Strategie sind die Sequenzspezifität und die einheitliche Struktur der entstehenden Micellen. Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass DNA-Nanostrukturen, die normalerweise durch Basenpaarung von komplementären ss-ODN-Sequenzen^[26–28] erzeugt werden, auch mithilfe von hydrophoben Wechselwirkungen aufgebaut werden können. Damit steht der DNA-Nanotechnologie ein neues Verfahren zur Strukturbildung zur Verfügung.

Eingegangen am 28. Juli 2006,
veränderte Fassung am 10. Oktober 2006
Online veröffentlicht am 9. Januar 2007

Stichwörter: Bionanotechnologie · Blockcopolymer · Micellen · Nanostrukturen · Selbstorganisation

- [1] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, *297*, 967–973.
- [2] S. Förster, V. Abetz, A. H. E. Müller, *Adv. Polym. Sci.* **2004**, *166*, 173–210.
- [3] H. W. Shen, A. Eisenberg, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3448–3450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3310–3312, zit. Lit.
- [4] L. F. Zhang, K. Yu, A. Eisenberg, *Science* **1996**, *272*, 1777–1779.
- [5] T. J. Martin, K. Prochazka, P. Munk, S. E. Webber, *Macromolecules* **1996**, *29*, 6071–6073.

- [6] H. W. Shen, L. F. Zhang, A. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2728–2740.
- [7] Y. Z. Liang, Z. C. Li, F. M. Li, *Chem. Lett.* **2000**, 320–321.
- [8] L. F. Zhang, A. Eisenberg, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2239–2249.
- [9] Y. S. Yu, L. F. Zhang, A. Eisenberg, *Macromolecules* **1998**, *31*, 1144–1154.
- [10] Y. S. Yu, A. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8383–8384.
- [11] A. Stamouli, E. Pelletier, V. Koutsos, E. van der Vegt, G. Hadzioannou, *Langmuir* **1996**, *12*, 3221–3224.
- [12] Q. G. Ma, E. E. Remsen, C. G. Clark, T. Kowalewski, K. L. Wooley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5058–5063.
- [13] Q. Zhang, C. G. Clark, M. Wang, E. E. Remsen, K. L. Wooley, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1051–1054.
- [14] J. Sanchez-Quesada, A. Saghatelian, S. Cheley, H. Bayley, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3125–3129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3063–3067.
- [15] J. H. Jeong, S. W. Kim, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 473–479.
- [16] R. B. Fong, Z. L. Ding, C. J. Long, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 720–725.
- [17] J. H. Jeong, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 917–923.
- [18] Z. Li, P. Fullhart, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1055–1058.
- [19] F. E. Alemdaroglu, K. Ding, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4313–4317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4206–4210.
- [20] E. Haustein, P. Schwille, *Methods* **2003**, *29*, 153–166.
- [21] M. Kinjo, R. Rigler, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1795–1799.
- [22] M. Börsch, P. Turina, C. Eggeling, J. R. Fries, C. A. M. Seidel, A. Labahn, P. Gräber, *FEBS Lett.* **1998**, *437*, 251–254.
- [23] A. Laguecir, S. Ulrich, J. Labille, N. Fatin-Rouge, S. Stoll, J. Buffle, *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 1135–1144.
- [24] M. G. Düser, N. Zarrabi, Y. Bi, B. Zimmermann, S. D. Dunn, M. Börsch, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2006**, 6092, 60920H.
- [25] D. V. Nicolau, P. D. Sawant, *Scanning Probe Microscopy Studies of Surface-Immobilized DNA/Oligonucleotide Molecules*, Berlin, **2005**, S. 113–160.
- [26] N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220–3238.
- [27] N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1151–1159.
- [28] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.