

# Enzymatische Kontrolle der Größe von DNA-Blockcopolymer-Nanopartikeln\*\*

Fikri E. Alemdaroglu, Jie Wang, Michael Börsch, Rüdiger Berger und Andreas Herrmann\*

Chemiker sind sehr kreativ bei der Entwicklung von Strategien zur Synthese organischer Nanopartikel. Oft spielen dabei Polymere eine wichtige Rolle, wie bei der Herstellung von Polymerdispersionen<sup>[1–3]</sup> und Dendrimeren<sup>[4,5]</sup> sowie bei der Aggregation von Blockpolymeren.<sup>[6,7]</sup> Ein interessantes aktuelles Beispiel für die letztgenannte Materialklasse sind lineare, amphiphile DNA-Blockcopolymer (DBC)s, die, durch Mikrophasenseparation induziert, Nanopartikel mit einer Hülle aus DNA und einem Kern aus einem hydrophoben Polymer bilden.<sup>[8–10]</sup> Solche DBC-Micellen wurden für den Transport von Antisense-Oligonucleotiden oder Wirkstoffen,<sup>[11,12]</sup> für den Aufbau thermoreversibler organisch/anorganischer Netzwerke<sup>[13]</sup> und als programmierbare Nanoreaktoren für eine Reihe chemischer Umsetzungen verwendet.<sup>[14]</sup> Hier zeigen wir, dass die Größe dieser DBC-Nanopartikel mithilfe einer enzymatischen Reaktion durch eine templatunabhängige DNA-Polymerase präzise kontrolliert werden kann. Durch eine unterschiedlich lange Inkubation sphärischer DBC-Micellen mit dem Enzym wurde die Größe der Nanoobjekte auf Durchmesser  $\varnothing$  zwischen 10 und 23 nm eingestellt.

Die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) ist eine templatunabhängige DNA-Polymerase, die für die Erzeugung randomisierter genetischer Information verantwortlich ist. Dies ist essenziell für die Wirksamkeit des adaptiven Immunsystems von Wirbeltieren.<sup>[15]</sup> Die physiologische Rolle der TdT besteht darin, die Addition von Desoxyribonucleotidyl-Triphosphaten (dNTPs) an das 3'-Hydroxyende einzelsträngiger DNA zu katalysieren. Für ihre

Polymeraseaktivität benötigt die TdT eine Primer-Sequenz, die mindestens drei Nucleotide lang ist und eine freie 3'-OH-Gruppe aufweist.<sup>[16]</sup> Bis jetzt wurde die TdT ausschließlich zur Verlängerung von DNA alleine verwendet,<sup>[17,18]</sup> nicht aber bei der Herstellung von DNA-Hybridmaterialien. Auch über das Einstellen der Größe von Nanopartikeln mithilfe einer DNA-Polymerase war bislang nicht berichtet worden.

Wir stellten die Hypothese auf, dass die DBC-Nanopartikel als Substrat für die TdT fungieren könnten; so ließe sich mithilfe dieses Enzyms ihre Größe einstellen. Zunächst wurden die Blockcopolymeren vollautomatisch mithilfe eines DNA-Synthesizers hergestellt. Diese weisen eine freie 3'-OH-Gruppe auf, da die organische Polymereinheit an das 5'-Ende gekuppelt wurde.<sup>[19,20]</sup> Weiterhin besteht das DNA-*b*-Polypropylenoxid (PPO) aus einer Nucleinsäureeinheit mit 22 Nucleotiden (Sequenz: 5'-CCTCGCTCTGCTAACCT-GTTA-3',  $M_w = 6.670 \text{ g mol}^{-1}$ ) und einem synthetischen Polymerblock von  $6.800 \text{ g mol}^{-1}$ .<sup>[14]</sup> Von diesem amphiphilen Blockcopolymer ist bekannt, dass es in wässrigen Lösungen sphärische Micellen bildet.<sup>[9]</sup> Diese Nanopartikel wurden mit der TdT bei  $37^\circ\text{C}$  in Gegenwart von  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen und dTTP inkubiert (siehe Hintergrundinformationen für experimentelle Details). Nach unterschiedlichen Zeiten (15, 30, 60, 180, 300, 960 min) wurde die Reaktion gestoppt und die Größenzunahme der Nanopartikel analysiert. Dazu wurde die räumliche Ausdehnung der Micellen mit drei voneinander unabhängigen Techniken bestimmt: a) Rasterkraftmikroskopie (AFM), b) Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) und c) Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE).

Um zu untersuchen, wie die enzymatische Verlängerung des Nucleinsäuresegments die Struktureigenschaften der Micellen beeinflusst, wurden die Partikel im Reaktionspuffer auf einer Glimmeroberfläche durch AFM im Soft-Tapping-Modus sichtbar gemacht. Die AFM-Analyse vor Inkubation mit TdT ergab sphärische Nanopartikel (Abbildung 1 A). Von den Höhenverteilungen der Micellen wurden Histogramme erstellt, wobei sich im betrachteten Fall eine Maximalhöhe  $h_{\max}$  von  $(4.9 \pm 1.2) \text{ nm}$  ergab (Abbildung 1B). Die Teilabbildungen 1C und 1E zeigen die AFM-Topographieaufnahmen der Micellen nach 60 min bzw. 16 h Reaktionszeit. Histogramme der Höhenverteilungen wurden für mindestens 100 Nanoobjekte erstellt, wobei sich jeweils ein  $h_{\max}$ -Wert von  $(6.6 \pm 1.4)$  bzw.  $(11.2 \pm 1.9) \text{ nm}$  ergab (Teilabbildungen 1D bzw. 1F). Wie Tabelle 1 zeigt, nimmt die Höhe der Nanopartikel mit der Reaktionszeit zu. Die AFM-Messungen belegen, dass sich die sphärische Form der Nanopartikel durch das Anknüpfen der Nucleotide mithilfe der TdT nicht verändert. AFM hat sich zwar als Methode zur Visualisierung amphiphiler DBC-Aggregate bewährt,<sup>[9,11,13,14]</sup> ermöglicht aber nicht die Bestimmung der exakten Maße der Nanoob-

[\*] F. E. Alemdaroglu, J. Wang, Dr. R. Berger, Prof. Dr. A. Herrmann<sup>[†]</sup>

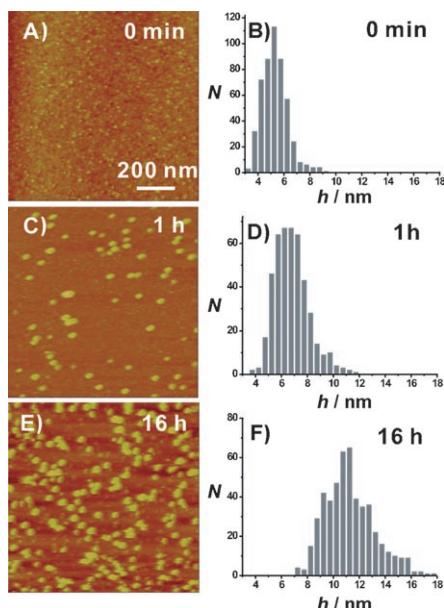
Max-Planck-Institut für Polymerforschung  
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)  
E-Mail: a.herrmann@rug.nl

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

[†] Aktuelle Adresse: Department of Polymer Chemistry, Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen  
Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen (Niederlande)  
Fax: (+31) 50-363-4400

[\*\*] 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 und den DFG-Sonderforschungsbereich 625 „Von Einzelmolekülen zu nanostrukturierten Materialien“ unterstützt. Wir danken Daphne Diemer und Andrew Musser für ihre Hilfe.

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



**Abbildung 1.** Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von DNA-Blockcopolymer-Nanoobjekten, deren Enden durch TdT mit Thymidinresten verlängert wurden. A, C und E zeigen Topographieaufnahmen mit gleicher Skala nach unterschiedlichen Reaktionszeiten. B, D und F sind die dazugehörigen Histogramme der Höhen  $h$  der Nanostrukturen.

**Tabelle 1:** Charakterisierung von DNA-Blockcopolymer-Micellen, die durch die TdT-Reaktion vergrößert wurden.

| $t$ [min] | $\varnothing^{[a]}$ [nm] | $h_{\max}^{[b]}$ [nm] | angefügte T-Segmente <sup>[c]</sup> |
|-----------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 0         | $9.6 \pm 0.9$            | $4.9 \pm 1.1$         | –                                   |
| 15        | $9.9 \pm 1.1$            | $5.1 \pm 1.4$         | $6 \pm 4$                           |
| 30        | $10.8 \pm 1.6$           | $5.2 \pm 1.3$         | $11 \pm 3$                          |
| 60        | $12.4 \pm 0.8$           | $6.6 \pm 1.4$         | $22 \pm 5$                          |
| 180       | $13.7 \pm 1.3$           | $7.2 \pm 1.5$         | $35 \pm 8$                          |
| 300       | $17.5 \pm 1.4$           | $8.3 \pm 1.6$         | $43 \pm 7$                          |
| 960       | $23.0 \pm 0.8$           | $11.2 \pm 1.9$        | $62 \pm 11$                         |

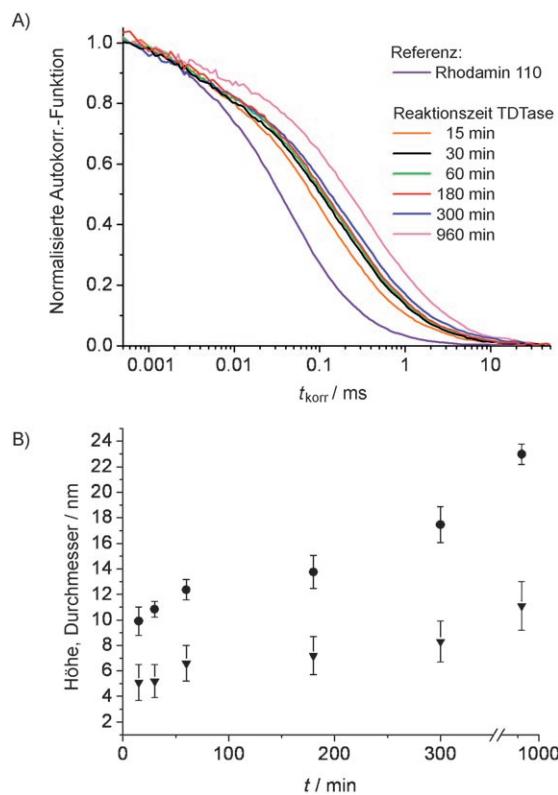
[a] Auf Grundlage der FCS-Analyse ermittelt, [b] aus AFM-Messungen abgeleitet und [c] über PAGE bestimmt.

ekte. Die Größe der Micellen in Lösung muss daher mit FCS untersucht werden.

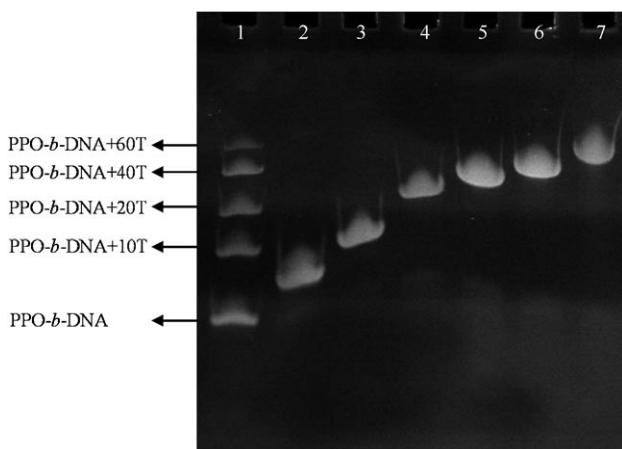
FCS ist eine hochempfindliche Analysemethode, die in den frühen 1970er Jahren eingeführt wurde, um chemische Kinetiken in sehr hoher Verdünnung in biologischen Systemen zu untersuchen,<sup>[21]</sup> und findet seitdem Anwendung in der analytischen Chemie und der Biologie: So ermöglichte sie z.B. den Nachweis von DNA-Hybridisierungsereignissen auf Einzelmolekülniveau.<sup>[22]</sup> Weiterhin wurde FCS eingesetzt, um die Mobilität von Proteinen und DNA- oder RNA-Fragmenten im Cytosol und in Zellorganellen zu untersuchen. Mit FCS lässt sich auch die Umwandlung sphärischer DBC-Micellen in stäbchenförmige Aggregate beobachten.<sup>[9]</sup> Die Durchgangszeit der in Puffer frei diffundierenden fluoreszenten Micellen durch das Anregungsvolumen von 4.5 fL wurde mithilfe eines konfokalen Mikroskopaufbaus gemessen.<sup>[23]</sup> Der translatorische Diffusionskoeffizient  $D$  wurde aus den gemittelten Diffusionszeiten berechnet. Da der Diffusionskoeffizient mit dem Reibungskoeffizienten  $f$  der hydrati-

sierten Micellen zusammenhängt, konnte mithilfe der Information über die dreidimensionale Gestalt der immobilisierten DBC-Aggregate der Radius  $r_0$  der sphärischen Micellen aus den FCS-Diffusionsdaten ermittelt werden (siehe Hintergrundinformationen). Vor der Reaktion mit TdT wurden die DBC-Micellen durch Hybridisierung mit der komplementären DNA-Sequenz, die mit Alexa488 (Invitrogen, USA) am 5'-Ende functionalisiert wurde, markiert. Ein Prozent der DNA-*b*-PPOs wurde mit dem Chromophor versehen, sodass die vorherrschende Form der DNA der Corona einzelsträngig blieb. In Gegenwart von TdT und dTTPs führte die enzymatische Verlängerung der Einzelstrang-DNA, wie aus den Diffusionszeiten berechnet, zu einer Zunahme des hydrodynamischen Radius der Micellen. Nach 16-stündiger Reaktion mit TdT zeigten die FCS-Daten eine 2.6-fache Zunahme der mittleren Diffusionszeit  $\tau_D$  verglichen mit den Micellen, die nicht reagiert hatten. Für eine detaillierte Analyse der Autokorrelationsfunktionen musste jedoch eine Anpassung für zwei diffundierende Komponenten verwendet werden.<sup>[24,25]</sup> Die längeren Diffusionszeiten der markierten Micellen variierten von  $\tau_{D2} \approx 280 \mu\text{s}$  bei einer TdT-Reaktionszeit von 15 min bis zu  $\tau_{D2} \approx 650 \mu\text{s}$  bei einer Reaktionszeit von 16 Stunden. Die kurze Diffusionszeit mit  $\tau_{D1} \approx (60 \pm 12) \mu\text{s}$  war ähnlich derjenigen des Referenzfarbstoffs Rhodamin 110 ( $\tau_D = (43 \pm 1) \mu\text{s}$ ) und rührte höchstwahrscheinlich von Fluoreszenzverunreinigungen her. Für die DBC-Micellen wurden mittlere Durchmesser von  $(9.9 \pm 1.1)$ ,  $(10.8 \pm 0.6)$  und  $(12.4 \pm 0.8) \text{ nm}$  nach entsprechend 15, 30 und 60 min gefunden. Mit zunehmender Reaktionszeit vergrößerte sich der Durchmesser der Micellen auf  $(13.7 \pm 1.3) \text{ nm}$  (3 h) und  $(17.5 \pm 1.4) \text{ nm}$  (5 h). Eine Verlängerung mit TdT über 16 h resultierte in einem Micellendurchmesser von  $(23.0 \pm 0.8) \text{ nm}$  (Abbildung 2A und Tabelle 1). Diese Werte bestätigen die mit den AFM-Messungen erhaltenen Trends der Größenzunahme der Micellen (Abbildung 2B). Aus den FCS-Daten kann geschlossen werden, dass die Micellen durch die Immobilisierung aufgrund von Wechselwirkungen mit der Oberfläche und/oder dem AFM-Abbildungsverfahren abgeflacht werden.

Zur Bestimmung der Zahl der Nucleotide, die bei zunehmenden Inkubationszeiten mit dem Enzym angefügt werden, wurden die mit Thymidin(T)-Resten verlängerten DBCs durch PAGE analysiert (Abbildung 3). Für eine möglichst genaue Abschätzung war die Synthese von DBCs mit definierten Molekulargewichten erforderlich. Dazu wurden DNA-*b*-PPO-Blockcopolymerne aus der 22mer-Sequenz und zusätzlichen, an das 3'-Ende gebundenen Thymidin-Abschnitten unterschiedlicher Länge (0, 10, 20, 40 und 60 T-Reste) hergestellt. Die Synthese der Molekulargewichtsstandards erfolgte gemäß einer publizierten Vorschrift.<sup>[14]</sup> Aus der gelelektrophoretischen Analyse geht hervor, dass die Inkubation mit TdT für 15, 30, 60, 180, 300 und 960 min zu einer Anknüpfung von  $6 \pm 4$ ,  $11 \pm 3$ ,  $22 \pm 5$ ,  $35 \pm 8$ ,  $43 \pm 7$  bzw.  $62 \pm 11$  T-Resten führte. Außerdem ermöglichte dies die Korrelation der Micellengröße mit der durch das TdT-Enzym erreichten Längenzunahme der Nucleinsäure-Abschnitte der DBCs (Tabelle 1). So nahm z.B. der Durchmesser der Aggregate bei einer durchschnittlichen Anheftung von 62 T-Resten an die DNA-Micellencorona um 13.4 nm zu.



**Abbildung 2.** A) Autokorrelationsfunktionen der DBC-Nanopartikel nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit TdT. B) Die Graphen repräsentieren die mit FCS erhaltenen Durchmesser der Nanopartikel (●) und die aus den AFM-Daten gewonnenen mittleren Maximalhöhen (▼) der Micellen.



**Abbildung 3.** Gelelektrophoretische Analyse der DBCs nach unterschiedlichen Reaktionszeiten mit TdT. Aufgetragen wurden: DNA-*b*-PPO-Molekulargewichtsstandards (1) und die Produkte nach Inkubation mit TdT für 15 min (2), 30 min (3), 60 min (4), 3 h (5), 5 h (6) und 16 h (7).

Die Synthese von linearen Blockcopolymeren durch eine Kombination „konventioneller“ Polymerisierungstechniken mit enzymatischen Polymerisationen ist bereits demonstriert worden.<sup>[26–28]</sup> Dabei wurde der eine Block durch radikalische Atomtransferpolymerisation generiert, während der andere, ein Polyesterblock, durch Lipasen erzeugt wurde. Diese

Blockcopolymeren wurden zwar hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung charakterisiert, aber eine weiterführende Analyse des Aggregationsverhaltens dieser Materialien wurde nicht vorgenommen. Gewöhnlich wird die Größe der resultierenden Micellen über die Längen der einzelnen Polymerblöcke bestimmt. Im hier vorgestellten Beitrag wurde eine Verlängerung der Blockcopolymeren nach deren Aggregation erreicht. Unsere Methode ermöglicht eine einfache Kontrolle der Größenzunahme von Nanopartikeln, indem eine templatunabhängige DNA-Polymerase unter milden isothermen Bedingungen in wässriger Lösung eingesetzt wird. So war es möglich, die Micellengröße auf das bis zu 2.4-Fache zu erhöhen. Weitere Studien werden sich auf die Verwendung der TdT für andere Nanopartikel konzentrieren, z.B. DNA-Nanopartikel mit einem anorganischen Kern.

Eingegangen am 31. Juli 2007  
Online veröffentlicht am 21. Dezember 2007

**Stichwörter:** Blockcopolymeren · DNA · Enzyme · Nanostrukturen · Nanotechnologie

- [1] D. Distler, *Wässrige Polymerdispersionen: Synthese, Eigenschaften, Anwendungen*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [2] J. M. Asua, *Polymeric Dispersions: Principles and Applications*, Kluwer Academic, Dordrecht, **1997**.
- [3] T. Kietzke, D. Neher, K. Landfester, R. Montenegro, R. Guntner, U. Scherf, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 408–412.
- [4] R. E. Bauer, A. C. Grimsdale, K. Müllen, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *245*, 253–286.
- [5] A. C. Grimsdale, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5732–5772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5592–5629.
- [6] S. Förster, V. Abetz, A. H. E. Müller, *Adv. Polym. Sci.* **2004**, *166*, 173–210.
- [7] I. W. Hamley, *Nanotechnology* **2003**, *14*, R39–R54.
- [8] F. E. Alemdaroglu, A. Herrmann, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1311–1320.
- [9] K. Ding, F. E. Alemdaroglu, M. Börsch, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1191–1194; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1172–1175.
- [10] F. Teixeira, Jr., P. Rigler, C. Veber-Nardin, *Chem. Commun.* **2007**, 1130–1132.
- [11] J. H. Jeong, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 917–923.
- [12] F. E. Alemdaroglu, N. C. Alemdaroglu, P. Langguth, A. Herrmann, *Adv. Mater.* **2007**, DOI: 10.1002/adma.200700866.
- [13] Z. Li, Y. Zhang, P. Fullhart, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1055–1058.
- [14] F. E. Alemdaroglu, K. Ding, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4313–4317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4206–4210.
- [15] J. D. Fowler, Z. Suo, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2092–2110.
- [16] K. I. Kato, J. M. Goncalves, G. E. Houts, F. J. Bollum, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 2780–2789.
- [17] H.-M. Eun, *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [18] D. C. Chow, W. K. Lee, S. Zauscher, A. Chilkoti, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14122–14123.
- [19] M. Safak, F. E. Alemdaroglu, Y. Li, E. Ergen, A. Herrmann, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1499–1505.
- [20] F. E. Alemdaroglu, M. Safak, J. Wang, R. Berger, A. Herrmann, *Chem. Commun.* **2007**, 1358–1359.
- [21] D. Magde, W. W. Webb, E. Elson, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705–708.

- [22] M. Kinjo, R. Rigler, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 1795–1799.
- [23] M. G. Dürer, N. Zarabi, Y. Bi, B. Zimmermann, S. D. Dunn, M. Börsch, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2006**, 6092, 60920H.
- [24] A. Armbruster, C. Hohn, A. Hermesdorf, K. Schumacher, M. Börsch, G. Gruber, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 1961–1967.
- [25] M. Diez, M. Börsch, B. Zimmermann, P. Turina, S. D. Dunn, P. Gruber, *Biochemistry* **2004**, 43, 1054–1064.
- [26] U. Meyer, A. R. A. Palmans, T. Loontjens, A. Heise, *Macromolecules* **2002**, 35, 2873–2875.
- [27] M. de Geus, J. Peeters, M. Wolffs, T. Hermans, A. R. A. Palmans, C. E. Koning, A. Heise, *Macromolecules* **2005**, 38, 4220–4225.
- [28] K. Sha, D. S. Li, Y. Li, P. Ai, W. Wang, Y. X. Xu, X. T. Liu, M. Z. Wu, S. W. Wang, B. Zhang, J. Wang, *Polymer* **2006**, 47, 4292–4299.