

Dendritische DNA-Bausteine für Amplifizierungs-Nachweisassays und Biomaterialien^{**}

Udo Feldkamp, Barbara Saccà und Christof M. Niemeyer*

Dendrimere · DNA-Strukturen · Gele ·
Nanotechnologie · Proteine

Seit den wegweisenden Arbeiten zur Synthese und Charakterisierung dendritischer Moleküle in den späten 1970er Jahren wurde eine Vielzahl von chemischen Dendrimeren für eine Reihe von Anwendungen in der Sensorik und den Materialwissenschaften entwickelt.^[1] Im Zusammenhang mit den Fortschritten bei der Synthese künstlicher Desoxyribonucleinsäure(DNA)-Oligonukleotide mithilfe von Festphasen-Phosphoramidit-Verfahren^[2] erkannten Horn und Urdea, dass dieser Ansatz die Konstruktion gabel- und kammförmiger DNA-Oligomere (**1** und **2**) ermöglicht,^[3] die als Bausteine für die Herstellung von DNA-Dendrimeren mithilfe spezifischer Watson-Crick-Basenpaarung verwendet werden können. Tatsächlich erwies sich ihr Ansatz als realisierbar und resultierte in der Entwicklung kommerzieller diagnostischer Tests für Nucleinsäuren aus Pathogenen wie HIV (Menschliches Immunschwäche-Virus) oder HCV (Hepatitis-C-Virus).^[4] Zur gleichen Zeit wurde durch eine bahnbrechende Arbeit von Seeman die Entwicklung dendritischer DNA-Überstrukturen eingeleitet.^[5] Seeman erbrachte den Nachweis, dass DNA-Kreuzungsmotive, so genannte drei- und vierarmige Kreuzungen (**3** bzw. **4**), durch Selbstorganisation künstlicher Oligonukleotide herstellbar sind. Wenn die Kreuzungsmotive einzelsträngige Überhänge („klebrige Enden“, „sticky ends“) aufweisen, können sie als oligovalente Bausteine für den Aufbau Dendrimer-artiger Überstrukturen fungieren, die definierte Struktureigenschaften im Nanometerbereich aufweisen. Diese Pionierarbeit legte den Grundstein für das hochinnovative Forschungsgebiet der DNA-Nanotechnologie,^[6] in der Motive wie **3** und **4**, aber auch komplexere Motive, vielfach als Bausteine für rational konstruierte, zweidimensionale Nanoarrays oder dreidimensionale Drahtgitterobjekte eingesetzt werden.^[7] Auch die durch ein Effektormolekül ausgelöste, kinetisch kontrollierte Selbstorganisation dendritischer DNA-Strukturen wurde bereits beschrieben.^[8,9] Zusätzlich zu reinen DNA-Bausteinen

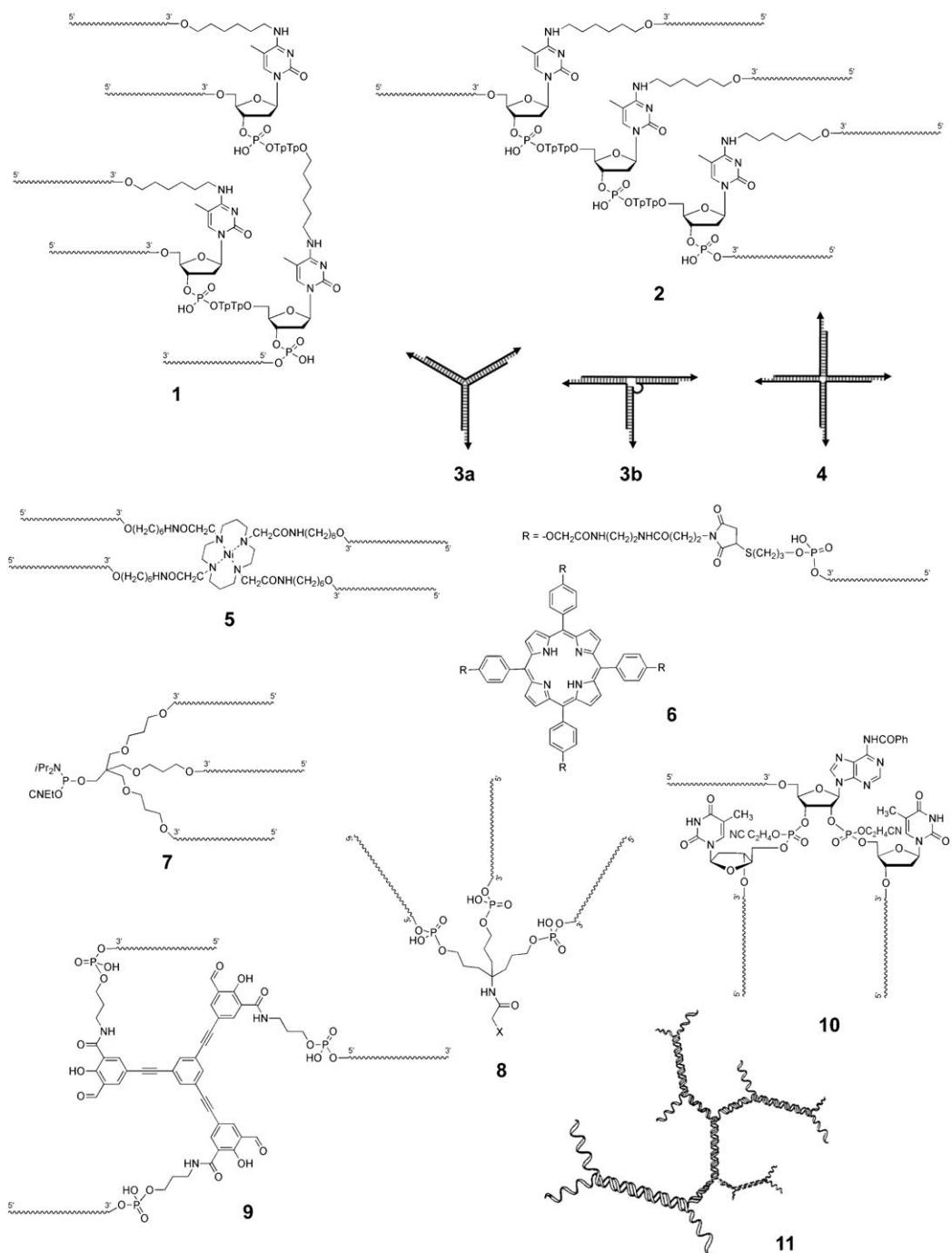
wurde auch eine Vielzahl oligovalenter DNA-Moleküle mit chemischen Verzweigungen als Komponenten für die DNA-Nanokonstruktion hergestellt. Beispiele hierfür sind Nickel-cyclamderivate (**5**),^[10] Porphyrinderivate (**6**),^[11] verzweigte Phosphoramidite (**7**),^[12] Trisoligonukleotide (**8**),^[13,14] dreiarlige Oligonukleotid-funktionalisierte Module (tripoidal oligonukleotide-functionalized modules, TOMs, **9**),^[15] Adenosinbis(phosphat)-Derivate (z. B. **10**)^[16,17] sowie weitere Linker^[18,19] für die Generierung dendritischer DNA-Strukturen.

Vor wenigen Jahren erkannten Luo und seine Mitarbeiter das Potenzial verzweigter Kreuzungsmotive, die sie Y-, T- und X-DNA (**3a**, **3b** bzw. **4**) nannten, für die Herstellung Dendrimer-artiger DNA (dendrimer-like DNA, DL-DNA).^[20] In einer ersten Demonstration verwendeten sie ein isotropes Y-DNA-Motiv mit drei identischen klebrigen Enden, um es mit drei Moläquivalenten eines zweiten, anisotropen Bausteins zu hybridisieren und zu ligieren. Ein solcher zweiter Baustein trug ein klebriges Ende, das zu denen des ersten Bausteins komplementär war, sowie zwei identische nichtkomplementäre klebrige Enden. So wurde DL-DNA der ersten Generation (G_1 -DL-DNA) erhalten, die sechs klebrige Enden enthält und somit die enzymatische Anbindung von sechs Moläquivalenten einer weiteren Y-DNA zur Bildung der zweiten Generation von DL-DNA ermöglicht. Eine nachfolgende Kupplung weiterer anisotroper Y-DNA ermöglichte den Aufbau von DL-DNA höherer Generationen (G_2 -, G_3 -, G_4 -, G_5 -DL-DNA). Mithilfe von Gelektrophorese, TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) und AFM (atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie) wurde nachgewiesen, dass die in hoher Ausbeute und Reinheit anfallende DL-DNA definierte molekulare Spezies bildet.^[20] Das gerichtete, schrittweise Wachstum der DL-DNA aus Y-förmigen Bausteinen verhinderte eine Selbstligation und die Bildung cyclischer Produkte, die teilweise frühere Arbeiten mit Psonalen-vernetzter dendritischer DNA (**11**) behindert haben.^[21,22]

Während chemische Dendrimere üblicherweise isotrop sind, kann DL-DNA sowohl isotrop als auch anisotrop aufgebaut werden. Um zu demonstrieren, dass die zweite Variante zu neuen Anwendungen führen kann, nutzten Luo und Mitarbeiter die DL-DNA als fluoreszierende Nanostrichcodes für den Parallelnachweis pathogener DNA (Abbildung 1).^[23,24] Aus Y-DNA-Motiven wurde eine kleine Bibliothek verschiedener DL-DNA-Moleküle hergestellt, die

[*] Dr. U. Feldkamp, Dr. B. Saccà, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
TU Dortmund, Fakultät Chemie
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+ 49) 231-755-7082
E-Mail: christof.niemeyer@tu-dortmund.de

[**] Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung der Projekte FE 943/1-1, SA 1952/1-1 und NI 399/10-1. Wir danken Kersten S. Rabe für viele hilfreiche Diskussionen.



jeweils eine unterschiedliche Zahl grüner (Alexa Fluor 488) und roter (Bodipy 630/650) Fluorophore trugen, sowie eine Zielmolekül-spezifische einzelsträngige Sondensequenz (Abbildung 1a,b). Die Detektion von Verhältnissen der Fluoreszenzintensität von grünen (G) und roten (R) Fluorophoren ermöglichte die eindeutige Identifizierung einzelner DL-DNA-Nanostrichcodes (Abbildung 1c) und somit die gleichzeitige Analyse unterschiedlicher Zielmoleküle. Mit DNA-Zielmolekülen, die aus Pathogenen wie *B. anthracis*, Ebola- oder SARS-Viren stammten, wurde die Eignung dieser Methode für die Parallelendetektion anschaulich durch zielspezifische Sandwich-Hybridisierung auf Polystyrol-Mi-

kroperlen demonstriert (rechtes Bild in Abbildung 1c). Es konnte eine rasche Detektion von ≥ 600 attomol des Zielmoleküls unter Verwendung von Durchflusszytometrie erreicht werden.^[23]

In einer aktuellen Arbeit verbesserten und verallgemeinerten Luo und Mitarbeiter die Nanostrichcodemethode durch Einsatz einer Komponente, die sich photochemisch vernetzen lässt.^[25] Aus unterschiedlich vielen Y- und X-DNA-Motiven schufen sie anisotrope, verzweigte und vernetzbare Bausteine (anisotropic, branched, and crosslinkable building blocks, „ABC-Monomere“), aus denen multifunktionale Nanoarchitekturen aufgebaut wurden. Wie in Abbildung 1d

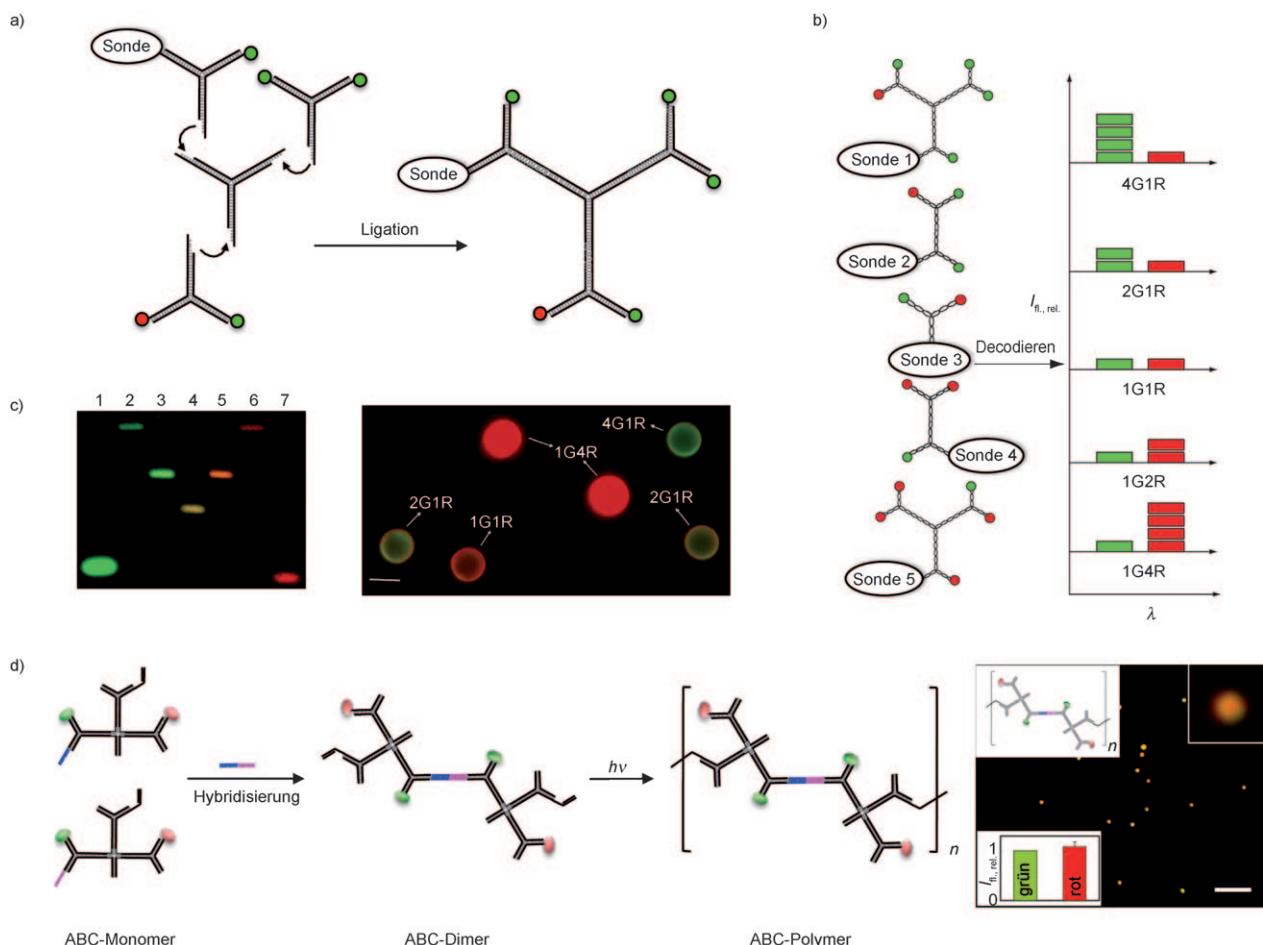


Abbildung 1. Anisotrope DL-DNA für die Biosensorik. a) DL-DNA-Aufbau zur Erstellung einer Bibliothek von Nanostrichcodemolekülen mit unterschiedlich vielen grünen (G = Alexa fluor 488) und roten (R = Bodipy 630/650) Fluorophoren. b) Die Verhältnisse der relativen Fluoreszenzintensitäten $I_{fl, rel.}$ von G zu R unterscheiden sich stark zwischen den fünf DL-DNA-Molekülen, was eine eindeutige Identifizierung der Zielsequenz ermöglicht. Im linken Bild in (c) wurden die fünf Strichcodemoleküle 4G1R, 2G1R, 1G1R, 1G2R und 1G4R (Bahnen 2–6) mithilfe eines Agarosegels analysiert, zusammen mit G- und R-markierten Startoligonukleotiden (Bahn 1 bzw. 7). Im rechten Bild in (c) sind Nanostrichcodemoleküle mit Zielsequenzen hybridisiert, die selbst durch sequenzspezifische Hybridisierung an Polystyrol-Mikroperlen gebunden waren (Maßstabsbalken = 5 μ m). Da jede Perle viele Zielmoleküle trug, konnte die Anbindung der Nanostrichcodes einfach durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. d) Zielmolekül-gesteuerte Photopolymerisation von ABC-Monomeren, die zwei Arten von Quantenpunkten (rote und grüne Kugeln), eine photochemisch vernetzbare PEGA-Einheit (schwarzes Symbol, =) und eine Zielerkennungssequenz (blaue und magentafarbene, leiterartige Symbole) enthalten. Zwei ABC-Monomere werden in Gegenwart der Ziel-DNA durch Hybridisierung verbunden, und die resultierenden Dimere können zu Polymerpartikeln photopolymerisiert werden. Diese können spezifisch durch Zwei-Farben-Fluoreszenzmikroskopie (rechts im Bild) anhand des Farverhältnisses der beiden Quantenpunkttypen identifiziert werden (Maßstabsbalken = 5 μ m). Wiedergabe aus Lit. [24, 25] mit Genehmigung. Copyright Nature Publishing Group.

gezeigt, enthielt ein exemplarisches ABC-Monomer vier funktionale Teile, einen grünen und einen roten Quantenpunkt, eine photovernetzbare Poly(ethylenglycol)monoacrylat(PEGA)-Einheit sowie eine zielspezifische Erkennungssequenz. Zwei solcher ABC-Monomere, die beide Erkennungssequenzen für ein bestimmtes Zielmolekül tragen, werden in Gegenwart des Zielmoleküls durch Hybridisierung verbunden und bilden so einen Diacrylatblock – ein ABC-Dimer –, der photopolymerisiert werden kann, um ein makroskopisches Polymermaterial zu bilden. Interessanterweise war die Polymerisationseffizienz sehr hoch und führte zur Bildung von nahezu kugelförmigen Partikeln mit Durchmessern um 400 nm. Da die Photovernetzung nur in Gegenwart der komplementären Verbindungsmoleküle effizient

war, konnte die Zielmolekül-gesteuerte Polymerisation für den Nachweis pathogener DNA verwendet werden. Des Weiteren kann das Verhältnis der beiden Fluorophore in den ABC-Monomeren beliebig geändert werden, wodurch die Parallel detektion verschiedener Zielmoleküle möglich wird. Bemerkenswert ist auch das Bestücken von ABC-Nanokugeln mit Modellwirkstoffen und ihre Inkorporation in HeLa-Zellen, in denen die Kugeln geringe Zytotoxizität aufwiesen.^[25]

Außer diesen eher bioanalytisch orientierten Arbeiten sind auch noch weitere Entwicklungen auf dem Gebiet der DNA-Dendrimere zu verzeichnen, die ausgehend vom schrittweisen Aufbau endlicher dendritischer Strukturen hin zur einstufigen Synthese potenziell unendlicher dreidimen-

sionaler Materialien aus reiner DNA führen. Dazu verwendeten Luo et al. **3** und **4** als Bausteine zur Herstellung ausgedehnter Polymermaterialien.^[26] **3** und **4** wurden mit selbstkomplementären (palindromen) klebrigen Enden zur Selbstorganisation und enzymatischen Ligation ausgestattet, um stark hydrierte, geladene, gallertartige Materialien (DNA-Hydrogele) zu bilden. Wegen der mechanischen Flexibilität der Bausteine an ihren Verzweigungspunkten sind diese Polymere hochgradig irregulär, was normalerweise bei der Herstellung von DNA-Nanokonstrukten mit definierter Form und definierten Oberflächenmustern vermieden wird.^[7] In ihrem ersten Bericht^[26] wiesen die Autoren nach, dass physikalische Eigenschaften des Polymers wie Zugmodul, Zugfestigkeit und Porosität durch die Wahl des DNA-Motivs, das als Monomer fungieren soll, beeinflusst werden. Dies ermöglicht ein gewisses Maß an Kontrolle über die Materialeigenschaften. Da die Gelbildung unter physiologischen Bedingungen stattfindet, sind DNA-Hydrogele besonders interessant für biologische Anwendungen. Es wurde gezeigt, dass sie für das Zuführen und Freisetzen von Wirkstoffen oder auch zur Stabilisierung lebender Zellen durch Einkapselung genutzt werden können.^[26]

Kürzlich wurden solche DNA-Hydrogele als Template für die zellfreie Proteinproduktion verwendet (Abbildung 2).^[27] Hierzu wurden X-DNA-Motive mit palindromen klebrigen Enden und Plasmidvektoren, die ein Protein codierendes

Gen enthalten und die gleichen klebrigen Enden tragen, enzymatisch ligiert, um ein DNA-Hydrogel herzustellen (Abbildung 2). Die Gelierung wurde in mikrostrukturierten Formen durchgeführt, wodurch Gelplättchen mit Abmessungen von $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ produziert werden konnten. Die Plättchen wurden anschließend in einen zellfreien Reagentencocktail mit den für die Proteinsynthese notwendigen Komponenten (wie RNA-Polymerase und Ribosomen) getaucht, um als Templat für die In-vitro-Proteinproduktion zu fungieren. Die Expression zeigte, dass das Gelplättchensystem bis zu 300-mal effizienter war als die lösungsbasierte Synthese, das Standardverfahren der In-vitro-Proteinsynthese. Bemerkenswerterweise konnte die Porosität des Gels durch Änderung des stöchiometrischen Verhältnisses von Genen zu X-DNA-Monomeren variiert werden, was auch die Produktivität des Gels beeinflusste. Allerdings sind die Ursachen für die Effizienz noch nicht vollständig klar. Zusätzlich zu hohen Konzentrationen und räumlicher Nähe der Gene im Hydrogel, die den Umsatz des Biosyntheseapparats erhöhen, scheinen die Gene auch durch die kovalente Vernetzung mit den X-DNA-Motiven gegen Abbau geschützt zu sein.^[27] Es ist zu vermuten, dass hohe Ionenstärken in der Hydrogelmatrix eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der Polymeraseaktivität spielen.^[28] Die Klärung der grundlegenden Mechanismen bedarf noch weiterer Studien, es ist aber bereits jetzt eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten abzusehen. Diese könnten sich z. B. bei kommerziellen Baukasten-artigen Produkten für die zellfreie Proteinsynthese sowie im aufstrebenden Feld der synthetischen Biologie finden, das sich mit der Herstellung „minimaler Zellen“ befasst.^[29] Da die zellfreie Proteinexpression einer Vielzahl von Proteinen bereits zur Konstruktion metabolischer Pfade in vitro verwendet wurde,^[30] könnten Hydrogel enthaltende Vesikel ein möglicher Ersatz für genomische DNA in synthetischen Systemen werden, sodass bei diesen eine höhere funktionale Komplexität erreicht werden kann.^[28] Insgesamt versprechen diese Fortschritte auf dem Gebiet der DNA-Dendrimere die Entwicklung neuartiger Materialien in der Nanobiotechnologie, die bioanalytische und biomedizinische Anwendungen finden könnten.

Eingegangen am 29. April 2009
Online veröffentlicht am 27. Juni 2009

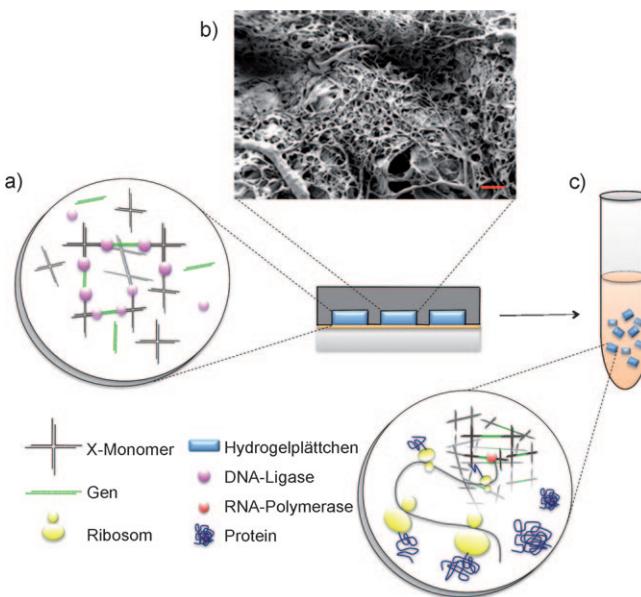


Abbildung 2. Herstellung und Aktivität eines zellfreien, Protein produzierenden Gels. a) Vierarmige DNA-Kreuzungen (X-DNA 4; schwarz) und linearisierte genomische DNA-Fragmente (grün) werden mithilfe von DNA-Ligase (magenta) enzymatisch polymerisiert, um ein Genhaltiges Hydrogelpolymer zu bilden. Der Gelierungsprozess findet in Mulden statt, sodass sich Gelplättchen bilden können (hellblau). b) Repräsentatives Elektronenmikroskopiebild von einem Proteinproduktionsgel, das aus X-DNA und Genfragmenten in einem Molverhältnis von 3000:1 hergestellt wurde (Maßstabsbalken = 100 μm). c) Die Gelplättchen werden in einen Reagentencocktail aus Zellextrakt gegeben, der RNA-Polymerase (rot), Ribosomen (gelb) und andere Komponenten für die In-vitro-Proteinbiosynthese enthält, wo sie als Matrize für die Proteinproduktion fungieren. Wiedergabe aus Lit. [28].

- [1] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, *Dendrimer Chemistry*, Wiley-VCH **2009**.
- [2] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281–285.
- [3] T. Horn, M. S. Urdea, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 6959–6967.
- [4] G. J. Tsongalis, *Am. J. Clin. Pathol.* **2006**, 126, 448–453.
- [5] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237–247.
- [6] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427–431.
- [7] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1856–1876.
- [8] P. Yin, H. M. T. Choi, C. Calvert, N. A. Pierce, *Nature* **2008**, 451, 318–322.
- [9] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3933–3935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3871–3873.
- [10] K. M. Stewart, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2050–2057.

- [11] M. Endo, N. C. Seeman, T. Majima, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6228–6231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6074–6077.
- [12] M. S. Shchepinov, I. A. Udalova, A. J. Bridgman, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4447–4454.
- [13] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3513–3518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311–3315.
- [14] J. Zimmermann, M. P. Cebulla, S. Monninghoff, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3682–3686; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3626–3630.
- [15] K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Cló, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044–1046.
- [16] R. H. E. Hudson, M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2119–2124.
- [17] R. H. E. Hudson, S. Robidoux, M. J. Damha, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1299–1302.
- [18] M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1970–1977.
- [19] Y. Suzuki, T. Otomo, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2000**, *44*, 125–126.
- [20] Y. Li, Y. D. Tseng, S. Y. Kwon, L. D'Espaux, J. S. Bunch, P. L. McEuen, D. Luo, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 38–42.
- [21] T. W. Nilsen, J. Grayzel, W. Prensky, *J. Theor. Biol.* **1997**, *187*, 273–284.
- [22] J. Wang, M. Jiang, T. W. Nilsen, R. C. Getts, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8281–8282.
- [23] Y. G. Li, Y. T. H. Cu, D. Luo, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 885–889.
- [24] S. H. Um, J. B. Lee, S. Y. Kwon, Y. Li, D. Luo, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 995–1000.
- [25] J. B. Lee, Y. H. Roh, S. H. Um, H. Funabashi, W. Cheng, J. J. Cha, P. Kiatwuthinon, D. A. Muller, D. Luo, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, DOI: 10.1038/nnano.2009.93.
- [26] S. H. Um, J. B. Lee, N. Park, S. Y. Kwon, C. C. Umbach, D. Luo, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 797–801.
- [27] N. Park, S. H. Um, H. Funabashi, J. Xu, D. Luo, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 432–437.
- [28] K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 370–372.
- [29] A. C. Forster, G. M. Church, *Genome Res.* **2007**, *17*, 1–6.
- [30] A. Meyer, R. Pellaux, S. Panke, *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 246–253.

SciTec Career

...the ultimate global JobMachine for scientists and engineers.

www.scitec-career.com

Online vacancies worldwide in physics, chemistry, materials science and life sciences.

WILEY-VCH