

Ein programmierbares, DNA-basiertes molekulares Ventil für kolloidales, mesoporöses Siliciumoxid^{**}

Axel Schlossbauer, Simon Warncke, Philipp M. E. Gramlich, Johann Kecht, Antonio Manetto, Thomas Carell und Thomas Bein*

In memoriam Victor S.-Y. Lin

In letzter Zeit wurde eine Reihe von extern gesteuerten molekularen Kappen oder Ventilen für die gesteuerte Freisetzung von Gastmolekülen aus mesoporösem Siliciumoxid entwickelt.^[1-4] Diese steuerbaren Freisetzungsmechanismen sind in verschiedenen Bereichen, z.B. beim Wirkstofftransport, für Polymeradditive oder auch beim Waschmitteldesign, von großem Interesse. Unter anderem wurden anorganische Nanopartikel, große Moleküle oder auch Polymere verwendet, um verkappte Gastmoleküle daran zu hindern, das Poresystem zu verlassen.^[5-7] Freisetzungsmechanismen können auf Redoxpotential-, pH- und Temperaturänderungen oder UV-Bestrahlung beruhen.^[8-10] Zum Beispiel wurden Goldnanopartikel mit photolabilen funktionellen Gruppen versehen und anschließend an der Oberfläche von MCM-41 adsorbiert. Andere Systeme beruhen auf Enzymen zur kontrollierten Freisetzung der Gastmoleküle.^[11,12] Ein Ansatz verwendet α -Cyclodextrine, die durch Ester-verknüpfte Adamantylverschlüsse an der Oberfläche gebunden sind. Geöffnet werden diese Kappen durch Zugabe von Schweineleber-esterase, wodurch die Verschlüsse entfernt werden.^[12] Wir haben uns auf Systeme konzentriert, die Biomoleküle als Bausteine für die Konstruktion solcher molekularen Ventile enthalten. Kürzlich haben wir die Eignung des Biotin-Avidin-Komplexes als biomolekulare Kappe an neuartigen Kern-Schale-funktionalisierten, kolloidalen, mesoporösen Siliciumoxidpartikeln nachgewiesen. Die Öffnung der Proteinkappen erfolgt dabei durch proteolytische Verdauung des Avidins oder temperaturinduzierte Denaturierung.^[3]

Die bisher bekannten molekularen Ventile sind im Allgemeinen auf einen bestimmten Öffnungsmechanismus beschränkt, der durch die chemische Natur des Systems vorgegeben ist. Hier zeigen wir nun, dass ein molekulares Ventil programmierbar gestaltet werden kann, indem das gewünschte Verhalten in einen DNA-Doppelstrang kodiert wird. Wir illustrieren dieses Konzept anhand der programmierbaren Öffnungstemperatur eines molekularen Ventils an den Porenöffnungen von Kern-Schale-funktionalisierten, kolloidalen, mesoporösen Siliciumoxidteilchen. Die kürzlich von uns entwickelte molekulare Kern-Schale-Funktionalisierung ist eine wichtige Voraussetzung für die Positionierung unterschiedlicher Funktionalitäten an verschiedenen Orten der porösen Nanopartikel.^[13,14]

Wie in der Folge beschrieben, haben wir selektiv Biotin tragende DNA-Doppelstränge an die Porenöffnungen der mesoporösen Siliciumoxidteilchen gebunden. Dies ermöglicht im nächsten Schritt, die Poren mit Avidin-Molekülen zu verschließen, während das innere Porenvolumen unfunktionalisiert bleibt. Eine Öffnung des Ventils erfolgt durch Aufschmelzen der DNA-Stränge bei der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide (Abbildung 1). Als Verbindungsstücke zwischen Avidin und der Siliciumoxidoberfläche wurden doppelsträngige, Alkin-modifizierte Oligodesoxyribonukleotide (DNA-Oligomere) verschiedener Länge (15-mer und 25-mer) verwendet. Die kovalente Immobilisierung dieser Stränge an der selektiv funktionalisierter, äußerer Siliciumoxidoberfläche erfolgte durch Klick-Chemie. Die verwendeten DNA-Oligomere enthalten ein Desoxyuridin an ihrem 5'-Ende, das eine C₈-Alkin-Kette an der 5-Position der Nucleobase trägt. (Diese Methode wurde

[*] A. Schlossbauer, Dr. P. M. E. Gramlich, Dr. J. Kecht, Prof. Dr. T. Carell, Prof. Dr. T. Bein

Department für Chemie und Center for NanoScience (CeNS)
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Butenandtstraße 5–13, Gerhard-Ertl-Gebäude
81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77622
E-Mail: bein@lmu.de
Homepage: <http://www.bein.cup.uni-muenchen.de>

S. Warncke, Dr. A. Manetto
Baseclick GmbH
Bahnhofstraße 9–15, 82327 Tutzing (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG durch den Cluster „Nanosystems Initiative Munich“ (NIM) sowie die SFBs 486 und 749 finanziert. Wir danken Bastian Rühle für die 3D-Grafiken, Markus Döblinger für die Elektronenmikroskopie und Tina Reuther für Stickstoffsorptionsmessungen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000827> zu finden.

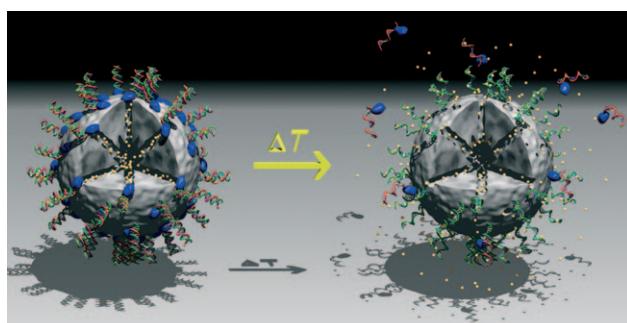


Abbildung 1. Konzept des programmierbaren Ventilsystems. Die Avidinkappen öffnen sich durch Aufschmelzen der DNA-Stränge bei speziell kodierten Temperaturen.

kürzlich von einigen von uns vorgestellt.^[15,16]) Anschließend wurden die funktionalisierten DNA-Stränge mit komplementären, 3'-Biotin-modifizierten Strängen durch kurzes Erhitzen einer 1:1-Mischung der Stränge auf 95 °C und langsames Kühlen auf Raumtemperatur in einer 500 mM NaCl-Lösung vorhybridisiert. Für unsere Experimente wurden ein 15-mer und ein 25-mer synthetisiert. Das 15-mer wurde zusätzlich mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 modifiziert, und zwar mit je einem Farbstoffmolekül an einem Ende eines Einzelstranges. Dadurch ist es möglich, mithilfe eines FRET-Signals (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer) den Hybridisierungszustand der DNA bei verschiedenen Temperaturen zu charakterisieren.^[17] Zusätzlich wurden die synthetisierten DNA-Stränge mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die

Tabelle 1: Sequenzen und Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analysen der verwendeten DNA-Stränge.^[a]

Verwendete DNA-Doppelstränge	
	5'-XCA CGT CGC ATCTT GCCTAC GCCC-3'
25-mer	$M_{\text{ber.}} = 7616.4, M_{\text{gef.}} = 7617.1$
	3'-Bio-AGT GCA GCG TAG AAC CGG ATG CGG G-5'
	$M_{\text{ber.}} = 8230.9, M_{\text{gef.}} = 8231.4$
	5'-XCA CGT CGC ATCTT Cy3-3'
15-mer	$M_{\text{ber.}} = 5404.8, M_{\text{gef.}} = 5405.6$
	3'-Bio-AGT GCA GCG TAG AAA Cy5-5'
	$M_{\text{ber.}} = 5902.3, M_{\text{gef.}} = 5902.8$

[a] X = dU-Alkin, Bio = Biotin-Modifikation.

verwendeten DNA-Oligomere. Kolloidales, mesoporöses Siliciumoxid (CMS) mit Chlorpropylfunktionen an der äußeren Oberfläche der Nanopartikel wurde nach unserem kürzlich entwickelten Konzept der sequenziellen Cokondensation synthetisiert.^[13] Dieser Ansatz verhindert unkontrollierbares Verstopfen der Poren während der Anbindung der großen organischen Moleküle an die Oberfläche.

In unserem Fall bleiben die inneren Porenwände unfunktionalisiert. Somit ist das gesamte innere Porenvolumen für die Beladung mit Gastmolekülen wie Wirkstoffen oder Modellverbindungen verfügbar. Eine reaktive Mischung aus Tetraethylorthosilicat (TEOS), Cetyltrimethylammoniumbromid und Triethanolamin führt zur Abscheidung mesostrukturierter Keime, die radial weiter wachsen. Nach 30 min wurde eine 1:1-Mischung aus 3-Chlorpropyltrimethoxysilan und TEOS zur Reaktionslösung gegeben, um eine organische Funktionalisierung ausschließlich an der äußeren Oberfläche der Nanopartikel zu erhalten. CMS mit Partikelgrößen um die 50 nm wurde erhalten und durch Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert. Eine repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme findet sich in den Hintergrundinformationen.

Die funktionalisierten mesoporösen Partikel haben Partikelgrößen um 3.8 nm und ein Porenvolumen von 0.99 cm³ g⁻¹. Die Werte wurden durch Auswertung der Stickstoffsorptionsisotherme mit nichtlokaler Dichtefunktionaltheorie erhalten. Die entsprechende Isotherme findet sich in den Hintergrundinformationen. Die erhaltenen Kolloide wurden an-

schließend in wasserfreies *N,N*-Dimethylformamid überführt. Das verbleibende Wasser im Poresystem wurde unter milden Bedingungen nach dem von uns beschriebenen Dampfextraktionsverfahren^[18] binnen drei Stunden bei 90 °C mit Molekularsieb entfernt. Dieser Ansatz schützt die Partikel vor temperaturinduzierter Agglomeration. Die resultierende wasserfreie Suspension wurde anschließend mit Natriumazid gesättigt und fünf Stunden auf 85 °C erhitzt, um eine Azid-funktionalisierte Oberfläche zu erhalten (Probe CMS-N₃). Die erfolgreiche Reaktion der Oberfläche wurde durch IR-Spektroskopie bestätigt, z.B. durch das Erscheinen des charakteristischen Signals der Azidstreckschwingung bei 2105 cm⁻¹ (Abbildung 2).

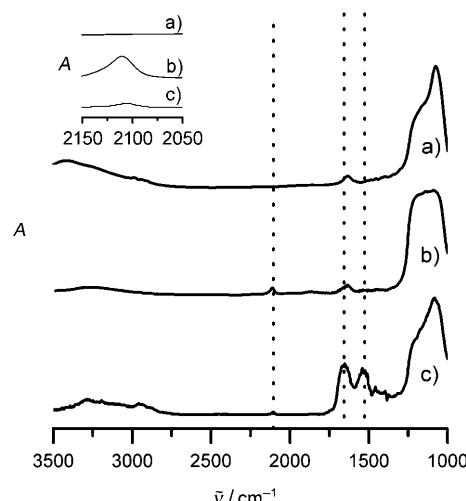


Abbildung 2: IR-Spektren der Proben: a) CMS-Cl, b) CMS-N₃, c) CMS-DNA₁₅-AVI. Einschub: Vergrößerung des Azidstreckschwingungsbe- reichs; = Hilfslinien bei $\nu = 1551, 1650$ und 2105 cm^{-1} .

Die DNA-Oligomere wurden durch Klick-Reaktionen an die Partikel gebunden. Die Anwendbarkeit der Klick-Chemie auf Siliciumoxidoberflächen wurde kürzlich von uns demonstriert.^[19] Zwei Proben mit jeweils einem der Stränge aus Tabelle 1 wurden hergestellt (Proben CMS-DNA₁₅ und CMS-DNA₂₅). Die Synthesesequenz des DNA-basierten molekularen Ventils kann mit IR-Spektroskopie verfolgt werden (Abbildung 2). Während die Probe CMS-Cl (Abbildung 2a) nur Siliciumoxid-Gerüstschwingungen zeigt, erscheint die Azidbande der Probe CMS-N₃ bei 2105 cm⁻¹ (Abbildung 2b). Die Intensität dieser Bande wird stark verringert, wenn die DNA durch die Klick-Reaktion gebunden wird; dies ist ein Hinweis auf die kovalente Anbindung der DNA an die Siliciumoxidoberfläche. Wie man in Abbildung 2 sehen kann, zeigt die Probe CMS-DNA₁₅-AVI zusätzlich zu den Siliciumoxidschwingungen die typischen Amidsignale bei 1551 und 1650 cm⁻¹ des angebundenen Proteins. Die schwachen Signale zwischen 1500 und 1300 cm⁻¹ in der Probe CMS-DNA₁₅-AVI werden den Carbonylschwingungen des Desoxyribosegerüstes und den Aminogruppen der angebundenen DNA zugeordnet. Wie oben beschrieben, tragen die Stränge eine Biotinmodifikation, die nun in der Nähe der Poreneingänge positioniert ist. Die immer noch intakte Hybridisierung

der Stränge nach der Klick-Reaktion wird durch die Messung eines FRET-Signals in der Probe CMS-DNA₁₅-AVI nachgewiesen (Abbildung 3). Wir erwarten, dass sich das längere

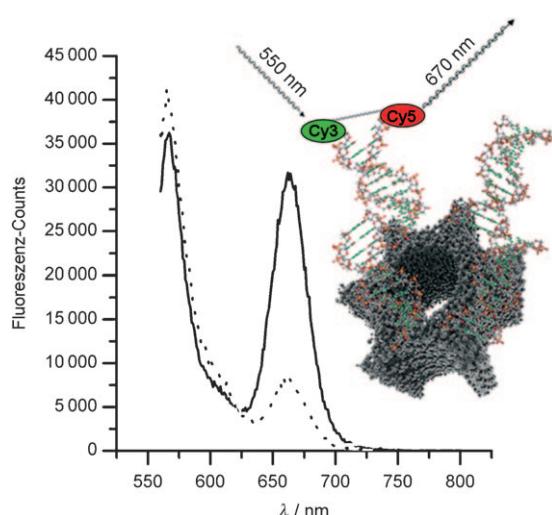


Abbildung 3. FRET-Messung der Probe CMS-DNA₁₅-AVI im geschlossenen (—) und offenen Zustand (·····).

und damit stabilere 25-mer nach der Klick-Reaktion ebenfalls in einem hybridisierten Zustand befindet. Ein entsprechendes Referenz-FRET-Experiment mit der reinen DNA findet man in den Hintergrundinformationen. Die Proben CMS-DNA₁₅ und CMS-DNA₂₅ wurden im Anschluss mit Fluorescein als Modellsubstanz für Gastmoleküle beladen. Um die Beladung zu erreichen, wurde ein Milligramm jeder Probe in einem Milliliter einer wässrigen Lösung von Fluorescein (2 mg mL⁻¹) zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 1 mg Avidin aus Eiweiß zugegeben und die Mischung weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dies führt zu einer Koordination der Biotin-modifizierten DNA mit den Avidinmolekülen und sollte somit einen Verschluss der Poren der kolloidalen Partikel zur Folge haben. Die anschließende Freisetzung von Fluorescein kann leicht mit Fluoreszenzspektroskopie detektiert und quantifiziert werden, wie wir bereits früher belegt haben.^[3] Nach dem Einschluss des Farbstoffes wurden die Partikel in einem 1.5-mL-Röhrchen zentrifugiert und in Wasser redispersiert (pH 7). Danach wurde die Probe dreimal durch Zentrifugation gewaschen, um freien Farbstoff aus der Suspension zu entfernen (Proben CMS-DNA₁₅-AVI und CMS-DNA₂₅-AVI). Die Proben wurden dann in eine zweigeteilte Fluoreszenzküvette mit 200 μL Probenvolumen, das durch eine Dialysemembran von 3 mL Wasser abgetrennt ist, überführt.^[3] Ein Bild der Küvette findet sich in den Hintergrundinformationen. Mit dieser temperaturkontrollierten Fluoreszenzküvette lässt sich die Freisetzung von kleinen fluoreszierenden Molekülen erfassen. Die Siliciumoxidnanopartikel sind zu groß, um durch die Dialysemembran zu diffundieren (Molekulargewichtsgrenze 16000 g mol⁻¹). Der Öffnungsmechanismus des molekularen Ventils wurde mit FRET-Experimenten untersucht. Wie oben beschrieben, ist die Probe CMS-DNA₁₅-AVI mit dem FRET-Paar Cy3/Cy5 an den DNA-Strängen

ausgestattet (siehe Tabelle 1). Cy3 zeigt ein Absorptionsmaximum um 550 nm und eine Emission bei 570 nm, die bis ins Rote reicht. Cy5 wird bei 650 nm maximal angeregt und emittiert bei 670 nm.

Mit dem gebundenen Doppelstrang im hybridisierten Zustand kann bei einer Anregung von 550 nm eine Emission um 670 nm wegen des Energietransfers zwischen den beiden benachbarten Farbstoffen beobachtet werden (Abbildung 3).^[17,20] Nach der thermoresponsiven Freisetzung (siehe unten) wurde die Probe abzentrifugiert und in 2 mL Wasser redispersiert. Wie man in Abbildung 3 erkennen kann, ist die FRET-Emission bei 670 nm in ihrer Intensität stark verringert, was ein Indikator für die Öffnung des molekularen Ventils durch das Aufschmelzen des DNA-Strangs ist.

Abschließend wurde die programmierte, thermoresponsive Öffnung des DNA-Ventils durch eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der freigesetzten Fluoresceinmoleküle in der oben beschriebenen, zweigeteilten Fluoreszenzküvette nachgewiesen und quantifiziert (Abbildung 4).

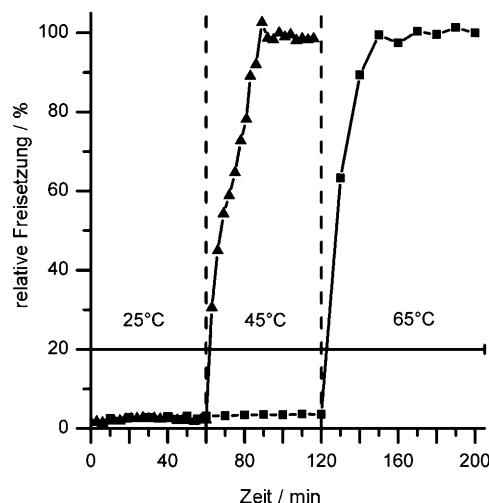


Abbildung 4. Freisetzungskurven (normalisierte Fluoreszenzintensität) der Proben CMS-DNA₁₅-AVI (▲) und CMS-DNA₂₅-AVI (■).

Alle Intensitätswerte sind auf eine relative Freisetzungsmenge von 100 % normiert. Die temperaturabhängigen Freisetzungskurven zeigen die starke Wirkung der DNA-Oligomere auf das Freisetzungsverhalten der Proben: Während sich das 15-mer bereits bei 45 °C öffnet, verbleibt das 25-mer bei dieser Temperatur noch in einem dicht geschlossenen Zustand und hält die Avidinmoleküle an den Porenöffnungen fest. CMS-DNA₂₅-AVI geht erst bei einer weiteren Erhitzung auf 65 °C in einen geöffneten Zustand über. Eine UV/Vis-spektroskopische Quantifizierung der freigesetzten Farbstoffmenge ergibt ähnliche Mengen an freigesetztem Fluorescein in beiden Proben: 0.033 mg Farbstoff pro mg CMS bei CMS-DNA₁₅-AVI und 0.040 mg Farbstoff pro mg CMS bei CMS-DNA₂₅-AVI (Details in den Hintergrundinformationen).

Wir haben hier gezeigt, dass der Einbau von doppelsträngiger DNA in ein neuartiges molekulares Ventil eine programmierbare thermoresponsive Freisetzung bei mode-

raten Temperaturen erlaubt. Dieses multifunktionelle Nanosystem ermöglicht es, die Temperatur für die Freisetzung eingeschlossener Gastmoleküle präzise auf die gewünschte Anwendung abzustimmen. Das Konzept der programmierten Freisetzung ist beispielsweise von Bedeutung bei Waschmitteln oder der Verkapselung von Polymeradditiven.^[21] Weitere potenzielle Anwendungen findet man bei der zielgerichteten Freisetzung von Wirkstoffen, wobei hier jedoch auch toxikologische Aspekte zu berücksichtigen sind.

Ein eingegangen am 10. Februar 2010
Online veröffentlicht am 10. Juni 2010

Stichwörter: DNA · Klick-Chemie · Kolloide · Nanotechnologie · Wirt-Gast-Systeme

- [1] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S. Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225.
- [2] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1278.
- [3] A. Schlossbauer, J. Kecht, T. Bein, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3138; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3092.
- [4] K. K. Coti, M. E. Belowich, M. Liong, M. W. Ambrogio, Y. A. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, *Nanoscale* **2009**, *1*, 16.
- [5] C.-Y. Lai, B. G. Trewyn, D. M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4451.
- [6] D. P. Ferris, Y.-L. Zhao, N. M. Khashab, H. A. Khatib, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1686.
- [7] R. Liu, X. Zhao, T. Wu, P. Feng, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14418.
- [8] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C.-W. Wu, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3462.
- [9] E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, P. Amoros, C. Guillem, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6833.
- [10] J.-H. Park, Y.-H. Lee, S.-G. Oh, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 2419.
- [11] A. Bernardos, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, J. M. Barat, P. Amoros, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5998; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5884.
- [12] K. Patel, S. Angelos, W. R. Dichtel, A. Coskun, Y.-W. Yang, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2382.
- [13] J. Kecht, A. Schlossbauer, T. Bein, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 7207.
- [14] V. Cauda, A. Schlossbauer, J. Kecht, A. Zurner, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11361.
- [15] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3491; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442.
- [16] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- [17] A. Fegan, P. S. Shirude, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2008**, 2004.
- [18] J. Kecht, T. Bein, *Langmuir* **2008**, *24*, 14209.
- [19] A. Schlossbauer, D. Schaffert, J. Kecht, E. Wagner, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12558.
- [20] A. Iqbal, S. Arslan, B. Okumus, T. J. Wilson, G. Giraud, D. G. Norman, T. Ha, D. M. J. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11176.
- [21] D. A. McIlroy, B. J. Blaiszik, P. V. Braun, S. R. White, N. R. Sottos, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **2008**, *49*, 963.