

Hybridmaterialien aus Nucleinsäuren und organischen Polymeren: Synthese, Überstrukturen und Anwendungen

Minseok Kwak und Andreas Herrmann*

Stichwörter:

Biomaterialien · Blockcopolymere ·

DNA · Nanostrukturen ·

Wirkstofftransport



Die Entwicklung von Hybridstrukturen aus Biomakromolekülen und organischen Polymeren, die über kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind, ist ein intensiv bearbeitetes Gebiet. Während die Kombination von Proteinen/Peptiden mit synthetischen Makromolekülen bereits umfassend untersucht worden ist, sind bisher weit weniger Beispiele für Nucleinsäure-Polymer-Hybride bekannt. In diesem Aufsatz stellen wir ausgewählte Beispiele dieser interessanten Materialklasse vor, deren Vertreter lineare Blockcopolymere, Seitenkettenpolymere oder vernetzte Strukturen sein können. Der Schwerpunkt liegt auf der Herstellung derartiger Materialien sowie auf möglichen Anwendungen in der Nanowissenschaft, Diagnostik und Biomedizin.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8755
2. Lineare DNA-Blockcopolymere	8756
3. DNA-Seitenkettenpolymere	8762
4. DNA-Polymer-Netzwerke	8764
5. Schlussfolgerungen	8766

1. Einleitung

Die Bildung von Makromolekülen mit definierter Monomersequenz und Dispersität, die sich zur gleichen Zeit durch komplexe Funktionen auszeichnen, ist eines der interessantesten Ziele der chemischen Synthese. Die Polymerchemie ermöglicht die wirtschaftliche Produktion synthetischer Makromoleküle. Über anionische Polymerisation sind hochmolekulare Produkte mit sehr geringen Dispersitäten zugänglich; diese Technik erfordert jedoch den strikten Ausschluss von Verunreinigungen und das Arbeiten unter Inertgasbedingungen. Eine Alternative ist die kontrollierte lebende radikalische Polymerisation,^[1] die Makromoleküle mit vergleichbaren Dispersitäten liefert und einen leichten Zugang zu Blockcopolymeren eröffnet, wodurch die Auswahl an funktionalen Monomeren erweitert wird.^[2] Makromoleküle mit höherer Strukturgenauigkeit und vielfältigeren funktionellen Gruppen sind Dendrimere, die eine verzweigte makromolekulare Architektur aufweisen.^[3,4] Ausgehend von einem multivalenten Kernmolekül wurden durch iterative Synthese, bei der sich Wachstums- und Entschützungs-schritte abwechseln, baumartige Strukturen erzeugt. In den Kern dieser Strukturen wurde eine Vielzahl an funktionellen Gruppen eingeführt,^[5] ebenso in das verzweigte Grundgerüst und auch in die Peripherie.^[6,7] Um Polymere mit einer noch größeren Vielfalt an funktionellen Gruppen zu erhalten, muss man auf eine iterative Synthese zurückgreifen, bei der das Makromolekül auf einem festen Träger aufgebaut wird. Merrifield hat diese Methode für die Synthese von Oligo- und Polypeptiden eingeführt.^[8] Mit dieser bahnbrechenden Synthesemethode ist es möglich, eine Vielzahl an Peptiden mit 50–70 Aminosäuren unter vollständiger Kontrolle über die Monomersequenz aufzubauen.^[9] Mehrere Kupplungsstrategien wurden ausgearbeitet, um noch größere Proteinstrukturen zu erreichen und diese Bausteine kovalent miteinander über native Peptidbindungen zu verknüpfen.^[10–13] Das Prinzip der Festphasensynthese wurde später zum Aufbau anderer Biomakromoleküle wie Nucleinsäuren^[14–16] und Kohlenhydrate weiterentwickelt.^[17–19] Über Festphasensynthese ist es einfach, nichtnatürliche Analoga^[20] wie Peptidnucleinsäuren (PNAs)^[21–23] und fixierte Nucleinsäuren (locked nucleic acids, LNAs)^[24,25] zu synthetisieren und zusätzlich zu den natürli-

chen Monomeren einzuführen, um die funktionelle Diversität zu erhöhen.

Mittlerweile gibt es immer mehr Bestrebungen, unter Verwendung fester Träger und automatisierter Synthesapparaturen Makromoleküle aufzubauen, die nur eine geringe Strukturverwandtschaft mit ihren natürlichen Gegenstücken aufweisen.^[26,27] Heute konkurrieren diese chemischen Synthesewege zu definierten funktionellen Makromolekülen mit Techniken der Molekularbiologie. Protein-Engineering ist eine leistungsfähige Methode zur Expression natürlicher und de novo entworfener Peptidsequenzen.^[28] Es ist sogar möglich, dem Satz der 20 natürlichen Aminosäuren nichtnatürliche Monomere zuzufügen.^[29–31] Dies gilt auch für Polynucleinsäuren.^[32] Insbesondere zur Sequenzierung wurden viele Farbstoff-funktionalisierte Nucleotide in DNA eingebaut. Infolge der rasanten Entwicklungen auf dem Gebiet der rekombinanten DNA-Technik ist heute eine Vielzahl enzymatischer Methoden verfügbar, um DNA zu modifizieren und zu vervielfältigen. Die wichtigsten Enzyme dazu sind Kinasen, Ligasen, Nucleasen und Polymerasen. Mit diesem Satz an Enzymen kann in Kombination mit der chemischen DNA-Synthese fast jede gewünschte Polynucleinsäure synthetisiert werden. Maßgebliche Methoden sind in diesem Zusammenhang die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und die Produktion von Plasmid-DNA in rekombinanten Bakterien. Ein eindrucksvolles Beispiel ist der Aufbau eines vollständigen infektiösen viralen Genoms (5386 bp) aus chemisch synthetisierten Oligodesoxynucleotiden (ODNs) mithilfe der oben angesprochenen molekularbiologischen Methoden.^[33]

Forscher haben nicht nur die Synthesemethoden verbessert, um die Größe und funktionelle Komplexität eines bestimmten Makromolekültyps zu erhöhen, sondern haben auch Strategien entwickelt, um unterschiedliche Klassen von Biomakromolekülen miteinander zu kombinieren. Dazu gehören die posttranslationalen Proteinmodifizierungen, z. B. die Synthese glycosylierter Peptidstrukturen.^[34,35] Peptide

[*] M. Kwak, Prof. Dr. A. Herrmann
Department of Polymer Chemistry, Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen
Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen (Niederlande)
Fax: (+31) 50-363-4400
E-Mail: a.herrmann@rug.nl
Homepage: <http://tr.im/pcberug>

wurden auch kovalent an ODNs geknüpft.^[36] Diese Verbindungen werden gewöhnlich als Peptid-Oligonucleotid-Konjugate (POCs)^[37,38] oder Oligonucleotid-Peptid-Konjugate (OPCs) bezeichnet.^[39] In der Natur kommen nur wenige dieser kovalenten Nucleopeptide vor.^[40] Die Mehrzahl der POCs wurde synthetisiert, um die pharmakokinetischen Eigenschaften therapeutisch nutzbarer ODNs zu verbessern.

Biomakromoleküle wurden auch mit organischen Polymeren kovalent verknüpft. Die verschiedenen Strukturen unterscheiden sich darin, wie die biologischen Reste an die synthetischen Makromoleküle gebunden sind. Beide Bausteine können alternierend angeordnet werden, was zu linearen Blockcopolymer-Topologien führt (Abbildung 1a). Alternativ können mehrere Peptid- oder Nucleinsäurereste entlang eines Polymerrückgrats angeknüpft werden, wodurch Seitenketten-Polymerstrukturen erhalten werden (Abbildung 1b). Der umgekehrte Fall, die Anheftung mehrerer synthetischer Polymere an ein Biomakromolekül-Rückgrat, kommt selten vor (Abbildung 1c).^[41] Schon Mitte der 1970er Jahre wurden Peptide mit organischen Polymeren kombiniert.^[42,43] Viele ausgezeichnete Übersichtsartikel behandeln

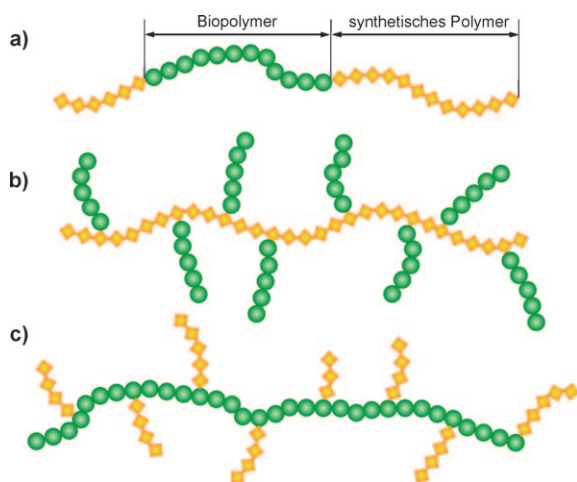


Abbildung 1. Kovalent gebundene Bio- (grüne Kreise) und synthetische Polymere (gelbe Rauten). a) Lineares Blockcopolymer aus Biopolymer- und synthetischen Polymerblocks. b) Auf ein synthetisches Polymerrückgrat aufgepfropfte Biomakromoleküle. c) Synthetische Polymerseitenketten auf einem Biomakromolekülrückgrat.

die Synthese^[44–52] und supramolekulare Organisation^[53–56] dieser Hybridmaterialien.

Viel weniger Aufmerksamkeit erhielten bioorganische Hybride aus Nucleinsäuren und synthetischen Polymeren.^[57] Anders als bei den Peptid-Polymer-Hybriden datieren die ersten Berichte über DNA-Polymer-Konjugate erst aus den späten 1980er Jahren: Auf ein Rückgrat aus Poly(L-lysin) (PLL) wurden Antisense-ODNs aufgepfropft. Diese Nucleinsäure-Polymer-Konjugate wurden als antivirale Agentien eingesetzt, um die Synthese vesikulärer Stomatitis-Virus-Proteine zu inhibieren.^[58–60] Seither wurden – zusätzlich zum Gen- oder ODN-Transport – zahlreiche Anwendungen dieser Materialien entwickelt, von der Isolierung von Biomaterialien bis hin zur DNA-Erkennung. In den letzten Jahren wurden anstelle hydrophiler Polymere wie PLL und Poly(ethylen-glycol) (PEG) hydrophobe Polymere an ODNs gebunden, um makromolekulare Amphiphile herzustellen. Wegen Mikrophasentrennung tendieren diese zur Selbstorganisation zu nanoskaligen Micellsystemen und sind daher vielversprechende Materialien für Anwendungen in der Bionanotechnologie und Nanomedizin. Dieser Aufsatz behandelt die Synthese und mögliche Anwendungen von DNA-Blockcopolymeren (DBCs). Verschiedene Synthesestrategien zur Herstellung linearer DBCs oder DNA-Seitenketten-Architekturen und DNA-Polymer-Hybridnetzwerke werden im Detail besprochen; gleichzeitig werden die unterschiedlichen Verwendungen dieser DBC-Strukturen aufgezeigt. Dies umschließt hauptsächlich ihre Verwendung in biologischem und biomedizinischem Zusammenhang, aber auch ihren Einsatz in den Nanowissenschaften. Die DBCs werden in diesem Aufsatz in der Reihenfolge steigender struktureller Komplexität besprochen: Zunächst werden lineare DBCs beschrieben und nachfolgend solche mit Seitenketten- und vernetzten Strukturen.

2. Lineare DNA-Blockcopolymere

2.1. Synthese

Vorhandene Methoden zur Synthese linearer DBCs ermöglichen eine systematische Variation der Länge und Sequenzabfolge des Nucleinsäureteils sowie der Beschaffenheit des organischen Polymerblocks. Pfropfreaktionen haben sich



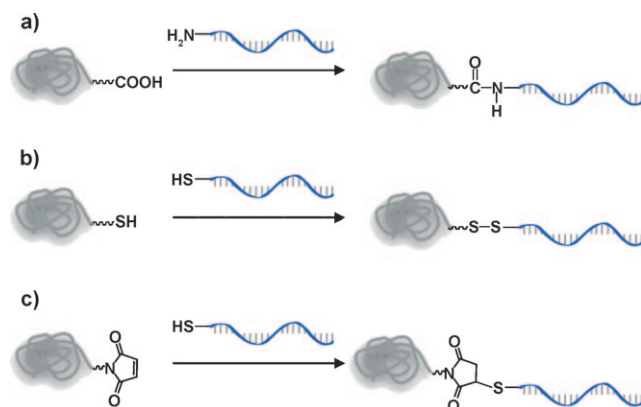
Minseok Kwak wurde 1976 in Seoul (Südkorea) geboren. Er studierte Chemie an der Ajou University in Suwon und erhielt 2006 sein Diplom in Molecular Science and Technology. Im gleichen Jahr wurde er Doktorand am MPI für Polymerforschung in Mainz (Deutschland) bei A. Herrmann und K. Müllen. 2007 wechselte er mit der Arbeitsgruppe von A. Herrmann an das Zernike Institute for Advanced Materials an der University of Groningen (Niederlande), wo er gegenwärtig seine Doktorarbeit fortführt. Er beschäftigt sich mit Synthese und Anwendungen von DNA-Nanomaterialien.



Andreas Herrmann studierte Chemie an der Universität Mainz. 1997–2000 war er Doktorand am MPI für Polymerforschung bei K. Müllen und arbeitete danach als Berater bei Roland Berger Management Consultants in München (2001). 2002 kehrte er zur wissenschaftlichen Arbeit zurück und forschte über Protein-Engineering am Swiss Federal Institute of Technology (Zürich) bei D. Hilvert. 2004 wurde er Leiter einer Nachwuchsforschungsgruppe am MPI für Polymerforschung. 2007 wechselte er an das Zernike Institute for Advanced Materials an der University of Groningen (Niederlande), wo er den Lehrstuhl für Polymerchemie und Bioengineering innehat.

hier als besonders erfolgreich erwiesen. Dabei werden vorgefertigte biologische und organische Polymerbausteine über komplementäre terminale Gruppen miteinander verknüpft. Es gibt zwei Synthesestrategien: Die Nucleinsäurebausteine können entweder in Lösung oder auf einer festen Phase an die organischen Polymersegmente gekuppelt werden.

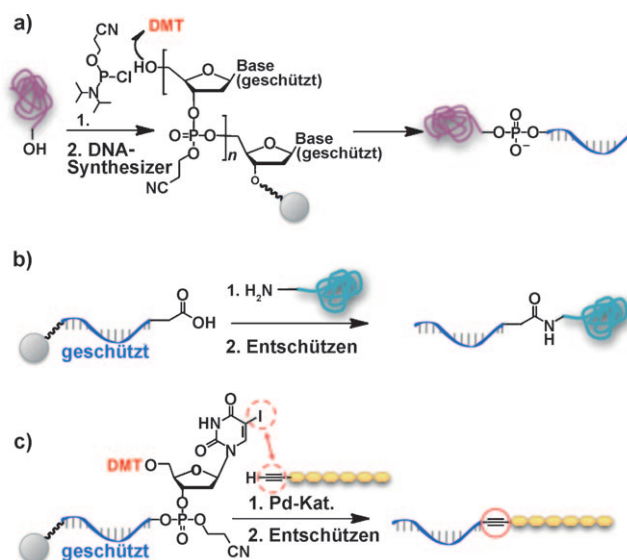
Zur Anheftung in wässriger Phase sind drei unterschiedliche Kupplungsreaktionen verwendet worden (Schema 1). Beim ersten Verfahren werden Amino-funktionalisierte



Schema 1. Kupplungsmethoden für DNA-Blockcopolymere in Lösung. a) Polymer mit endständiger Carboxygruppe, gekuppelt mit Amino-funktionalisiertem ODN. b) Disulfidbildung zwischen Polymer und ODN-Thiolen. c) Michael-Addition von Polymer-gebundenem Maleimid und Thiol-modifiziertem ODN.

ODNs mit Carbonsäure-terminierten Polymeren wie PEG,^[61,62] Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM),^[63,64] Poly(D,L-milchsäure-co-glycolsäure)^[65] und Poly(*p*-phenylenethinyl)^[66] umgesetzt, um eine Amidbindung zu erhalten (Schema 1a). Die zweite Variante ist die Disulfidbildung (Schema 1b).^[67] Dafür muss das ODN mit einer endständigen Sulfhydrylgruppe ausgestattet werden, während das PEG-Molekül an einem Ende mit einer 2-Pyridyldisulfidgruppe funktionalisiert wird. Die dritte Ligationsmethode schließlich beruht auf der Michael-Addition (Schema 1c). Auch in diesem Fall werden Thiol-modifizierte ODNs verwendet, die PEG-Moleküle werden jedoch mit einem terminalen Maleimid- oder Acrylsäurerest funktionalisiert.^[68] Alle beschriebenen Kupplungsstrategien eignen sich sehr gut zur Herstellung von DBCs mit wasserlöslichen organischen Polymer-einheiten. Zudem sind Thiol- und Amino-modifizierte ODNs käuflich erhältlich, sodass die Blockpolymerstrukturen in einem herkömmlichen Chemielabor ohne teure DNA-Synthesizer-Apparatur hergestellt werden können.

Amphiphile DBC-Strukturen mit hydrophoben Polymeren lassen sich nur recht schwer durch Kupplung in Lösung aufbauen, was auf die unterschiedliche Löslichkeit der einzelnen Komponenten zurückzuführen ist. Daher wurden Pfropfstrategien auf einer Festphase entwickelt (Schema 2). Wenn das ODN auf dem Harz vorgelegt wird, sind die Nucleotide noch – vor allem an den Phosphatgruppen – geschützt, sodass es in organischen Lösungsmitteln löslich ist, in denen auch das organische Polymer gelöst werden kann. Wie



Schema 2. Kupplungsreaktionen, die DNA-Blockcopolymere ergeben. a) Ein hydroxyliertes Polymer wird in ein Phosphoramidit überführt und im letzten Schritt der DNA-Synthese mit der 5'-OH-Gruppe einer DNA verknüpft. DMT = Dimethoxytrityl. b) Zu einer Carbonsäure-modifizierten DNA auf einem festen Träger wird ein Amin-modifiziertes Polymer gegeben. c) Pd-katalysierte Sonogashira-Hagihara-Kupplung eines π -konjugierten Polymers mit endständiger Dreifachbindung und einer 5-Ioduracil-Nucleobase in der Festphase (Wiedergabe aus Lit. [73]).

im Fall der Flüssigphasenkupplung sind wieder unterschiedliche Reaktionen für die Anheftung des organischen Polymers an das ODN eingeführt worden. Der einfachste Ansatz ist die Überführung des hydrophoben Polymers in ein Phosphoramiditpolymer durch Reaktion einer endständigen Hydroxygruppe mit einem Phosphoramiditchlorid (Schema 2a). Die aktivierten Makromoleküle werden anschließend an die detritylierte 5'-OH-Gruppe des ODN-Moleküls geheftet. Nach Inkubation mit konzentriertem Ammoniak zum Entschützen und Ablösen vom festen Träger werden einzelsträngige (single stranded, ss-)DNA-Diblockcopolymere, z. B. DNA-*b*-Polystyrol (PS)^[69] und DNA-*b*-Poly(propylenoxid) (PPO),^[70] erhalten. Werden beide Enden des organischen Polymers als Phosphoramidit aktiviert, sind auch Triblockarchitekturen vom Typ DNA-*b*-PEG-*b*-DNA zugänglich.^[71] Alternativ wird die Bildung von Amidbindungen genutzt, um Poly(butadien) (PB) mit einer terminalen Aminogruppe auf immobilisierte Carboxy-modifizierte DNA aufzupfropfen (Schema 2b).^[72] Zur Anheftung von Poly(*p*-phenylenethinyl) (PPE) wird eine endständige Ethinylgruppe mit einem Iodsubstituenten an der Base des letzten Nucleotids am 5'-Ende in einer Palladium-katalysierten Sonogashira-Hagihara-Kupplung umgesetzt (Schema 2c).^[73]

Üblicherweise liefern alle Syntheserouten zu DBCs Nucleinsäuresegmente von nicht mehr als 50 Nucleotiden Länge. Wie kann diese Synthesegrenze überwunden werden? Die Antwort liegt in der Kombination von chemischer DBC-Synthese mit molekularbiologischen Methoden. Dazu werden ssDBC, wie oben gezeigt, als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet (Abbildung 2).^[74] Die Ver-

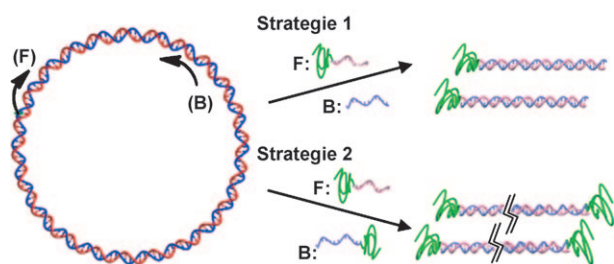


Abbildung 2. Molekularbiologische PCR-Strategien zur Herstellung eines Di- und Triblockcopolymers mit längerer DNA. Strategie 1: DNA-Blockcopolymer (Vorwärts-Primer) und DNA (Rückwärts-Primer) liefern PEG-*b*-dsDNA. Strategie 2: Zwei PEG-*b*-DNA-Primer ergeben das Triblockcopolymer PEG-*b*-dsDNA-*b*-PEG (Wiedergabe aus Lit. [74]).

wendung eines ssDBC und eines herkömmlichen ODN-Primers ergibt Doppelstrang(ds)-DNA-Diblockcopolymere mit ausgedehnten Nucleinsäureblöcken vom Typ A-*b*-dsDNA (Abbildung 2, Strategie 1), wobei A ein organisches Polymer kennzeichnet. Die Verwendung zweier ssDBC's mit dem gleichen organischen Block als Vorwärts- und Rückwärts-Primer liefert Doppelstrang-Triblock-Architekturen vom Typ A-*b*-dsDNA-*b*-A (Abbildung 2, Strategie 2). Erwähnenswert ist, dass der PCR-Prozess nicht nur mit hydrophilen Polymeren wie PEG kompatibel ist, sondern auch mit hydrophoben Polymeren wie PPO und PS und thermoresponsiven Polymeren wie PNIPAM. Als Erweiterung dieser Methode führen zwei Primer-DBC's mit unterschiedlichen organischen Blöcken zu Triblockstrukturen mit einer A-*b*-dsDNA-*b*-B-Topologie, wobei A und B unterschiedliche Polymere bezeichnen. Komplexere Strukturen werden durch Verwendung einer Kombination von ssDNA-*b*-A-*b*-ssDNA und ssDNA-*b*-X-Primer (X: A- oder B-Polymer) innerhalb der PCR erhalten; dies führt zu Pentablockstrukturen X-*b*-dsDNA-*b*-A-*b*-dsDNA-*b*-X.^[75] Die Nucleinsäuresegmente erreichen leicht Molekulargewichte über 1 000 000 g mol⁻¹ und sind wegen des Templat-gesteuerten Polymerisationsmechanismus monodispers. Die Verwendung von ssDBC's in der PCR ermöglicht es also, die Grenzen bei der Blockcopolymer-Synthese hinsichtlich Molekulargewicht und Strukturgenauigkeit nach oben zu verschieben.

2.2. Supramolekulare Strukturen

Im Zeitalter der Nanowissenschaften sind die Anordnung von Strukturen im Nanobereich und das Auftreten mehrerer Organisationsebenen wichtige Kriterien für die Synthese von Funktionsmaterialien. Im letzten Jahrzehnt beschrieben Seeman und Rothmund bis dahin beispiellose, gezielte Selbstorganisationsvorgänge von DNA.^[76,77] Ausgehend von diesen bahnbrechenden Arbeiten entwickelte sich ein ganzes Arbeitsgebiet, das sich mit Nucleinsäure-Nanostrukturen befasst.^[78,79] Nanostrukturen aus DBC's bieten in dieser Hinsicht einige einzigartige Möglichkeiten. Das Aggregationsverhalten dieser bioorganischen Hybridstrukturen kann durch Erkennung des Nucleinsäureteils, durch die Wechselwirkungen der organischen Polymereinheiten oder durch Kombinationen davon gesteuert werden.

Supramolekulare Polymere haben in den letzten Jahren wegen ihrer dynamischen Eigenschaften, die aus der Reversibilität der Bindungen der Polymerkette resultieren, immer mehr Beachtung gefunden.^[80] DBC's sind ein ausgezeichnetes Beispiel für diesen Materialtyp. Aus ssDBC-Baueinheiten konnten gut definierte Blockstrukturen gebildet werden (Abbildung 3). Ein Beispiel war der Aufbau von Triblock-

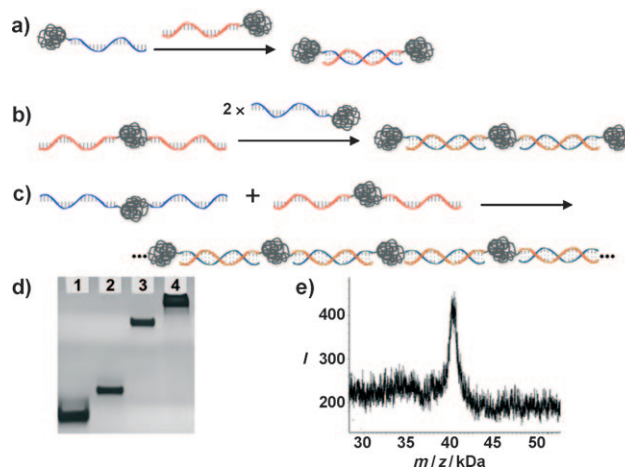


Abbildung 3. Synthese von Multiblockstrukturen durch DNA-Hybridisierung und ein charakteristisches Analyseprofil. a) Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Blockcopolymere liefert eine Triblockarchitektur. b) Eine Pentablockarchitektur bestehend aus Triblock- und Diblock-DBC's. c) Eindimensionale Polymeranordnungen aus zwei komplementären Triblockcopolymeren. d) Polyacrylamidgel von Tri- und Pentablockcopolymeren (gezeigt in (b)). Bahn 1: ssDNA-*b*-PEG-*b*-ssDNA, Bahn 2: dsDNA-*b*-PEG-*b*-dsDNA, Bahn 3: PEG (5 kDa)-*b*-dsDNA-*b*-PEG-*b*-dsDNA-*b*-PEG (5 kDa), Bahn 4: PEG (20 kDa)-*b*-dsDNA-*b*-PEG-*b*-dsDNA-*b*-PEG (20 kDa). e) MALDI-TOF-MS eines Pentablockcopolymeren mit 5-kDa-PEGs, wie es in Bahn 3 des Gels gezeigt ist (Wiedergabe aus Lit. [71]).

strukturen aus zwei ssDBC's mit komplementären Sequenzen durch Hybridisierung und somit Duplexbildung (Abbildung 3a).^[71] Die Ausweitung dieses Konzepts führte zu Pentablockstrukturen durch Zusammenfügen einer ss-Triblockstruktur vom Typ DNA-*b*-PEG-*b*-DNA mit zwei Äquivalenten einer ss-Diblockstruktur vom Typ DNA-*b*-PEG (Abbildung 3b). Die Charakterisierung solcher Strukturen erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE; Abbildung 3d) und MALDI-TOF-MS (Abbildung 3e). Noch längere eindimensionale Polymeranordnungen wurden durch Verwendung zweier einzelsträngiger selbstkomplementärer Triblockstrukturen mit DNA-Spacer-DNA-Topologie erhalten (Abbildung 3c).^[81] Die Polymerbildung wurde durch erhöhte Viskosität im Vergleich mit Lösungen nichtpolymerisierender Analoga nachgewiesen. Durch Variation der Verhältnisse der DNA-Hybridmonomere konnten die Molekulargewichte einfach gesteuert werden, da überschüssige Monomere als effiziente „Kettenabbrecher“ fungierten.

Nicht nur die Nucleinsäureeinheiten, sondern auch die organischen Polymersegmente sind gut geeignet, um die Überstrukturbildung einzuleiten. Dies gilt besonders für hy-

drophobe Polymersegmente, weil sie in wässrigem Medium zur Mikrophasentrennung neigen. Amphiphile DBCs bilden micellare Aggregate aus einem hydrophoben Polymerkern und einer Korona aus ssDNA. Im Fall von ssDNA-*b*-PS wurden diese Micellen mithilfe eines Cosolvens gebildet, und die mittleren Durchmesser der Aggregate wurden eingestellt, indem man die Länge der Nucleinsäureeinheiten variierte.^[69] Die Herstellung von Micellen aus DNA-*b*-PPO war noch unkomplizierter, weil das Polymer eine niedrige Glasübergangstemperatur ($T_G = -70^\circ\text{C}$) aufweist, die eine Micellbildung durch einfaches Erhitzen und Abkühlen ermöglicht. Die Bildung solcher DNA-Polymer-Hybridnanopartikel ist experimentell weit weniger anspruchsvoll als die Erzeugung komplexer, ausschließlich aus Nucleinsäuren bestehender Nanostrukturen.^[82,83]

Die Struktureigenschaften der sphärischen DBC-Aggregate konnten durch Hybridisierung verändert werden. Während die Hybridisierung von DBC-Micellen mit kurzen, zur Korona komplementären ODNs ihre kugelförmige Gestalt nicht veränderte (Abbildung 4a), induzierte Watson-Crick-

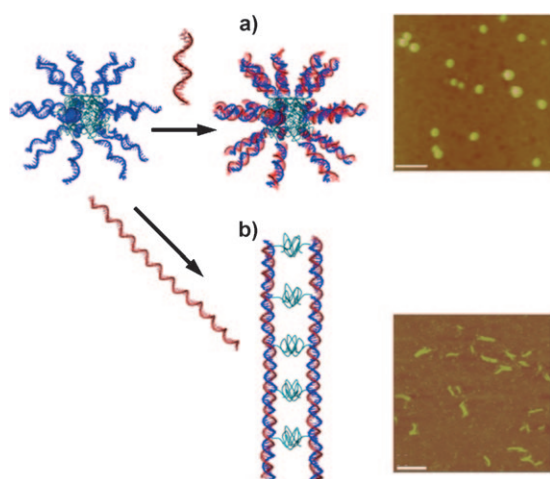


Abbildung 4. Darstellung und Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Bilder von PPO-*b*-DNA-Aggregaten. a) Hybridisierung der sphärischen ssDNA-Micelle (blau) mit komplementärer DNA (rot) erzeugt eine dsDNA-*b*-PPO-Nanostruktur. b) Hybridisierung der sphärischen ssDNA-Micelle mit einem langen Templat ergibt stäbchenförmige Aggregate. Maßstabsbalken: 200 nm (Wiedergabe aus Lit. [84]).

Basenpaarung mit langen Templaten die Bildung stäbchenförmiger Aggregate (Abbildung 4b).^[84] Die Sequenzzusammensetzung der Template war dabei so gewählt, dass der zur DNA-Micellkorona komplementäre Bereich vielfach codiert war. Während der Hybridisierung wurde eine Doppelhelix gebildet, von der alle 22 Nucleotide ein PPO-Teil herausragte. Dies führte zu einer parallelen Anordnung zweier Doppelhelices, die durch die hydrophoben Wechselwirkungen der organischen Polymereinheiten „zusammengeklebt“ wurden. Die Länge der stäbchenförmigen Aggregate konnte durch die Länge der Templatmoleküle gesteuert werden.

Außer für kleine micellare Strukturen mit Durchmessern bis 45 nm^[85] wurden DBCs auch zur Bildung größerer Objekte eingesetzt. Wenn 12-mere ODNs an PB geheftet

wurden, fand man Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 80 nm sowie höher geordnete Vesikel mit einer geschlossenen DBC-Doppelschichtmembran.^[72] Diese Strukturen wurden zur Herstellung ODN-modifizierter Oberflächen verwendet, auf denen bakterielle Biofilmbildung untersucht wurde.^[86]

2.3. Anwendungen und Funktionen

2.3.1. Nanowissenschaften

Lineare DBCs eignen sich nicht nur zur Konstruktion supramolekularer und nanoskaliger Strukturen; dank der Selbsterkennungseigenschaften und der biologischen Funktion von DNA können die entstandenen Aggregate auch leicht mit zusätzlichen Funktionen ausgestattet werden. Ein Beispiel, das die Tatsache nutzt, dass DBCs informationstragende Makromoleküle sind, sind DNA-gestützte Reaktionen^[87] in DBC-Micellen (Abbildung 5). Zu diesem Zweck

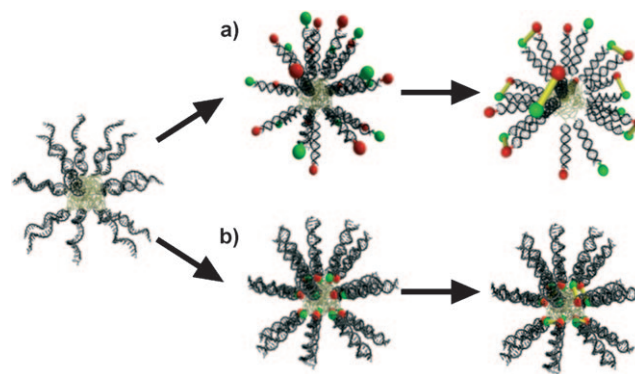


Abbildung 5. DNA-gestützte Reaktionen a) auf der Oberfläche der PPO-*b*-DNA-Micelle und b) im Innern der Micelle. Rote und grüne Kugeln kennzeichnen Reaktanten, und gelbe Stäbchen stehen für resultierende kovalente Bindungen zwischen den beiden funktionellen Gruppen (Wiedergabe aus Lit. [70]).

wurden ssDBC-Aggregate mit Reaktant-DNA, die funktionelle Gruppen enthielt, hybridisiert. Wegen der engen Nachbarschaft dieser Gruppen in der micellaren Umgebung konnten einige organische Reaktionen wie die Michael-Addition oder Amidbindungsbildung sequenzspezifisch innerhalb des programmierbaren Nanoreaktors durchgeführt werden. Es war sogar möglich, den Ort der Umsetzungen festzulegen, sodass sie entweder an der Oberfläche der Micellen (Abbildung 5a) oder – abgeschirmt von der Umgebung – im Innern der bioorganischen Partikel abliefen (Abbildung 5b). Der Reaktionsort wurde durch Anheften der Reaktanten an das 5'- oder 3'-Ende festgelegt.

DBC-Micellen können auch als Gerüste für enzymatische Umwandlungen dienen. Im Unterschied zu den thermostabilen Polymerasen, die in Abschnitt 2.1 zur Herstellung von dsDBC beschrieben wurden, benötigt die Polymerase mit dem Namen terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdTase) kein Templat, um eines der vier Nucleosidtriphosphate (dNTPs) anzufügen. DBC-Micellen wurden bei 37 °C

mit diesem Enzym und dTTP inkubiert. Mit zunehmender Reaktionszeit nahm die Größe der DNA-Nanopartikel durch Anknüpfung von polyT-Segmenten an das DBC zu. Der Durchmesser der Nanoobjekte konnte innerhalb einer Reaktionszeit von 16 h schrittweise von 10 auf 23 nm eingestellt werden. Dabei wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Größe von Nanopartikeln mithilfe eines Enzyms vergrößert werden konnte.^[85]

In einem anderen Beispiel wurden DBCs verwendet, um organisch-anorganische Partikelnetzwerke zu erzeugen. DNA-*b*-PS-Micellen wurden mit DNA-modifizierten Goldnanopartikeln, die eine komplementäre Sequenz auf der Oberfläche aufweisen, hybridisiert.^[69] Die resultierenden Komposite beweisen, dass DBCs durch sequenzspezifische Hybridisierung mit anderen DNA-modifizierten Nanomaterialien höher geordnete Strukturen bilden können. Überdies wurden bei ihrer Dehybridisierung scharfe Schmelztemperaturen beobachtet, was durch ein kooperatives Modell des Schmelzvorgangs erklärt wurde.

Die Watson-Crick-Basenpaarung von DBCs ist nicht auf die Bildung nanoskaliger Systeme begrenzt; die Doppelhelixbildung wurde auch zur Herstellung von Mikrokapseln eingesetzt. Auf Siliciumtemplaten wurden alternierende Schichten von T₃₀-*b*-PNIPAM und A₃₀-*b*-PNIPAM angeordnet. Nach Auflösung des Kerns und Funktionalisierung der Oberfläche mit PEG wurden stabile Mikrokapseln erhalten, die zum Transport von small interfering RNA (siRNA) und Tumorthapeutika genutzt werden könnten.^[88]

2.3.2. Diagnostik

Zum DNA-Nachweis mithilfe linearer DNA-Blockcopolymeren wurden die Nucleinsäureeinheiten an emittierende Oligomere oder Polymere gekuppelt. Ein Sondenstrukturtyp bestand aus einer zentralen Fluoremittereinheit, an die zwei identische ODNs angeknüpft wurden (twin probe; Abbildung 6a). Dieses Konjugat wurde in homogenen Assays zum Nachweis von DNA verwendet. Über einen Mechanismus, der auf der Aufhebung der Fluoreszenzlöschung (Dequenching) durch Hybridisierung beruht, konnten komple-

mentäre Zielsequenzen sowie Einzelnucleotidpolymorphismen (SNPs) detektiert werden. Die Selektivität dieses Sondenpaarsystems war bemerkenswert, da es nur eine einzige emittierende Spezies enthält und keine doppelte Markierung benötigte. Der DNA-Nachweis erfolgte im Konzentrationsbereich von 10⁻³ bis 10⁻⁸ M.

Andere DBC-Sondenstrukturen setzen hingegen auf die Markierung mit mehreren emittierenden Einheiten. Ein sehr gutes Beispiel für diesen Strukturtyp ist ein Molecular Beacon, das auf einem konjugierten Polymer beruht. Es besteht aus einer ssDNA-Einheit, die an einem Ende mit negativ geladenem, stark emittierendem PPE funktionalisiert ist, während das andere Ende an einen Fluoreszenzlöcher gebunden ist (Abbildung 6b).^[73] Die DNA-Sequenz ist dabei so gewählt, dass sie eine Stamm-Schleifenstruktur bildet. In dieser Konfiguration befindet sich das konjugierte Polymer in enger Nachbarschaft zum Fluoreszenzlöcher, sodass die Emission des konjugierten Polymers durch einen als „Superquenching“ bezeichneten Effekt vollständig unterdrückt wird.^[89] Ist eine komplementäre Zielsequenz vorhanden, führt die Hybridisierung zu einer räumlichen Trennung von Polymer und Fluoreszenzlöcher und damit zur Lichtemission des konjugierten Emitters. Leider ist diese vielversprechende Sonde noch nicht auf ihre Empfindlichkeit und Selektivität geprüft worden. Eine Kombination aus einer Twin-Sonde und dem beschriebenen Molecular Beacon gelang, indem zwei Stamm-Schleifenstrukturen mit terminalen Fluoreszenzlöchern an beiden Enden eines negativ geladenen PPE-Polymers angeheftet wurden (Abbildung 6c). Bei Konzentrationen des Zielmoleküls von 4 × 10⁻⁶ M war das Fluoreszenzsignal des konjugierten Polymers um zwei Größenordnungen stärker als das Signal, das mit einer nichtkomplementären Sequenz erhalten wurde. Mit einer solchen Sonde war auch ein SNP-Nachweis möglich.^[66]

2.3.3. Biomedizin

Außer in der Diagnostik wurden lineare DBCs auch in der Biomedizin eingesetzt. Oligonucleotide (hauptsächlich Aptamere, Antisense-ODNs und siRNA) werden derzeit wegen ihrer sehr hohen Selektivität bei der Erkennung von Zielmolekülen intensiv als neue Wirkstoffkandidaten erforscht. Sie alle haben jedoch kurze Halbwertszeiten in vivo wegen ihrer geringen Stabilität gegen Nucleasen im Plasma und Zellinneren oder werden wegen ihres relativ geringen Molekulargewichts rasch ausgeschieden. Überdies verhindert ihre negative Ladung eine zügige Aufnahme in Zellen. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Schwierigkeiten ist die Funktionalisierung pharmazeutisch aktiver Nucleinsäuren mit PEG.^[93] Eine direkte Anknüpfung von PEG^[90] oder die Bindung über ein Linker-Molekül^[91] führen durch Maskieren der negativen Ladungen von ODNs zu erhöhter Stabilität gegen enzymatischen Abbau, verlängerter Plasmabeständigkeit und einer besseren Zellpenetration. Ein schon 2004 kommerzialisierter DBC-Wirkstoff ist ein PEG-funktionalisiertes, 28-meres Aptamer – PEG-Aptanib –, das von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung einer altersbedingten Makuladegeneration der Retina zugelassen wurde. Dieses DBC-Medikament besteht

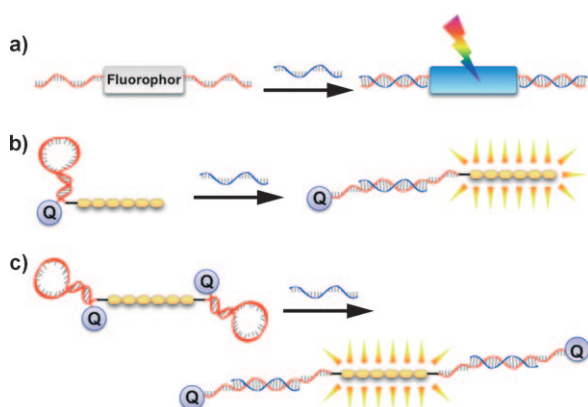


Abbildung 6. DNA-Nachweisverfahren auf DBC-Basis. a) Twin-Probe-Reporter mit Fluoremitter in der Mitte. b) Molecular Beacon mit lichtemittierendem Polymer. c) Beacon mit zwei Stamm-Schleifen-DNAs an beiden Enden des Polymers. Q = Fluoreszenzlöcher.

aus einem verzweigten PEG von 40 kDa, das über einen Pentylamino-Linker mit dem ODN verbunden ist.^[92]

Um Antisense-DNA wirksam zu verabreichen, wurden ODNs ebenfalls mit PEG konjugiert; für einen erfolgreichen Transport wurden sie jedoch mit positiv geladenen Polyelektrolyten komplexiert. Es wurden Polyionkomplex-Micellen^[67,68] oder (synonym) Polyelektrolytkomplex-Micellen^[61,94] mit einer Kern-Schale-Struktur erhalten. Die Nucleinsäureeinheit und der positiv geladene Polyelektrolyt bildeten dabei durch ionische Wechselwirkungen den Kern und die PEG-Ketten die Schale. Zum effizienten Transport in HuH-7-Zellen wurden DBCs mit einer Disulfidbrücke zwischen ODN und PEG entwickelt. Mit diesem Linker wurde bessere Antisense-Wirkung erzielt als bei Verwendung eines durch Säure abspaltbaren Verbindungselements. Der Polyelektrolyt-Typ ist ein weiterer wichtiger Parameter. Poly(L-lysin) enthaltende Micellen erwiesen sich als weniger wirksam als Poly(ethylenimin) (PEI), was darauf hindeutete, dass durch die Pufferwirkung von PEI das DNA-*b*-PEG erfolgreich vom endosomaln Kompartiment in das Cytoplasma transportiert wurde und dass – als Antwort auf die hohen Glutathionspiegel im cytoplasmatischen Kompartiment – durch Spaltung der Disulfidbrücke Hunderte aktiver Antisense-ODNs ins Zellinnere freigesetzt wurden.^[67] In einer ähnlichen Reihe von Experimenten wurde die Aufnahme der Polyionkomplex-Micellen in HuH-7-Zellen durch die Bindung einer Lactoseeinheit am anderen Ende des PEG-Blocks (gegenüberliegend zum ODN) gefördert; diese Modifizierung führte zu erhöhter Antisense-Aktivität.^[68]

Außer zum Transport von Antisense-DNA *in vitro* wurden Polyelektrolytkomplex-Micellen auch eingesetzt, um in Versuchstieren Onkogene zu unterdrücken. Eine c-raf-Antisense-ODN-Formulierung, die Nacktmäusen mit humanen Lungenkrebstumoren intravenös verabreicht wurde, wies deutliche Antitumoraktivität auf. Zudem zeigten DBC-haltige Micellen stärkere Anreicherung in der festen Tumoregion als das nicht polymermodifizierte ODN.^[61] Dieselbe Arbeitsgruppe hatte in vorhergehenden Experimenten eine signifikante Verringerung des Tumorwachstums beobachtet, wenn Polyelektrolytkomplex-Micellen mit einem c-raf-Antisense-ODN-Kern direkt in die Tumoregion injiziert worden waren.^[94]

Kürzlich wurden die gleichen elektrostatisch induzierten DBC-Aggregate zur therapeutischen Verabreichung von siRNA genutzt.^[62,95] Im Zusammenhang mit einer anti-angiogenen Gentherapie wurde gezeigt, dass PEG-konjugierte, gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtete siRNA, die mit PEI komplexiert war, die Expression von VEGF im Tumorgewebe inhibierte und das Tumorwachstum in einem Tiertumormodell ohne erkennbare Entzündungsreaktion unterdrückte.^[95] Die Micellen wurden Mäusen intravenös und intratumoral verabreicht. Nach der intravenösen Injektion wurde eine erhöhte Anreicherung der nanometergroßen DBC-Partikel in der Tumoregion nachgewiesen. Diese Studie belegte, dass sich DBC-Micellen als Träger für therapeutische siRNA zur lokalen und systemischen Behandlung von Krebs eignen könnten.

Wie DBC-Nanopartikel, die sich über elektrostatische Wechselwirkungen organisieren, wurden auch amphiphile

DBC, die durch Mikrophasentrennung Nanopartikel bilden, für den Wirkstofftransport verwendet. In diesem Fall hatte die DNA keine biologische Funktion, ermöglichte aber eine äußerst einfache Bildung multifunktionaler Teilchen. Diese Nanoobjekte wurden mit Einheiten ausgestattet, die spezifisch Rezeptoren an der Zelloberfläche von Caco-2-Zellen, einer Krebszelllinie, erkennen (Abbildung 7). Folsäure wurde

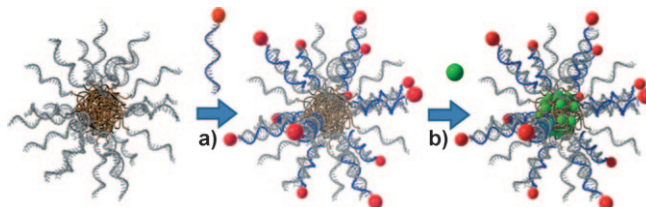


Abbildung 7. Auf DNA-Blockcopolymer-Micellen basierendes Wirkstofftransportsystem. a) Die Micelle aus DNA-Einzelsträngen wird mit Folsäure-konjugierter, komplementärer DNA (rote Kugel, blauer Strang) zur spezifischen Rezeptorerkennung hybridisiert. b) Das hydrophobe Tumortherautikum Doxorubicin (grüne Kugel) wird im PPO-Kern der Micelle angereichert. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [96]. Copyright 2007, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

an eine zur Micellenkorona komplementäre Sequenz gekuppelt, wodurch die Einführung dieser Gruppen durch einen einfachen Hybridisierungsvorgang möglich wurde (Abbildung 7a). In einem zweiten Schritt wurde der hydrophobe Kern der DBC-Micellen mit einem hydrophoben Tumortherautikum, Doxorubicin, beladen (Abbildung 7b). Durch Zusammenwirken der beiden Komponenten wurden die Krebszellen wirksam zerstört.^[96] Vor dem Wirkstofftransport-Experiment wurde gezeigt, dass eine zunehmende Zahl an Rezeptor erkennenden Einheiten auf der Micelloberfläche die Aufnahme der DBC-Nanoteilchen durch rezeptorvermittelte Endocytose erleichtert. Sind dagegen die Folsäurereste in das Innere der nanometergroßen Objekte gerichtet, werden sie durch die Zellen nicht erkannt. Der Aufnahmevorgang wurde mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie mit DBC-Partikeln verfolgt, die über den gleichen Hybridisierungsvorgang wie bei der Einführung der Rezeptor erkennenden Einheiten fluoreszenzmarkiert wurden. Wegen der unkomplizierten Funktionalisierung der DBC-Micellen eignen sich diese Materialien als kombinatorische Plattform zur Prüfung und zum Hochdurchsatz-Screening von Wirkstofftransportern.

Die ungerichtete Aufnahme von DBC-Systemen (d.h. ohne externe Erkennungseinheiten) wurde ebenfalls untersucht. Man befasste sich besonders mit der Frage, ob die Form der Nanoobjekte die Aufnahme in die Zelle beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Caco-2-Zellen mit sphärischen ss- und dsDBC-Partikeln sowie mit den schon in Abschnitt 2.2 beschriebenen, stäbchenförmigen Partikeln inkubiert (Abbildung 4). Man stellte fest, dass die stäbchenförmigen Strukturen, obwohl alle Partikel aus den gleichen DBC-Materialien zusammengesetzt waren, um eine Größenordnung schneller in die Zelle aufgenommen wurden als die kugelförmigen.^[97] Solche Experimente sind von Bedeutung, weil sie darauf schließen lassen, dass die Form eines Nanopartikels

eine weitere wichtige Einflussgröße bei der Planung von Wirkstofftransportern sein könnte.

3. DNA-Seitenkettenpolymere

Wie in der Einleitung erwähnt, sind zwei Klassen von DNA-Seitenkettenpolymeren bekannt. Die Strukturen, die zuerst besprochen werden sollen, bestehen aus einem dsDNA-Rückgrat, auf das organische Polymere aufgepfropft sind. Die erste Struktur mit einem solchen Aufbau wurde aus DNA des Bacteriophagen T4 (166 kbp) oder des λ -Phagen (48.5 kbp) gebildet, an die Polyacrylamid oder PNIPAM angehängt war.^[98,99] Die Verbindung zwischen DNA und Polymer wurde durch einen Intercalator, ein Acrylsäure-funktionalisiertes Phenaziniumderivat, hergestellt. Die Pfropfstruktur wurde anschließend durch Polymerisation von Acrylamid oder *N*-Isopropylacrylamid mit dem polymerisierbaren Intercalator als Comonomer in Gegenwart der DNA erhalten. Diese Strategie führte jedoch nicht zur kovalenten Verknüpfung der biologischen und organischen Segmente. Aus diesem Grund wandte man sich Psoralen zu; dieser Intercalator reagiert mit Nucleobasen durch Cycloaddition. Wurde ein Psoralen-haltiges Vinylmonomer unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie oben eingesetzt, erfolgte bei Bestrahlung mit UV-Licht eine kovalente Verknüpfung der Acrylsäurepolymere mit der DNA.^[100,101] Später wurde diese Synthesestrategie etwas weiterentwickelt: Statt zahlreiche intercalierende Reste entlang der Hauptkette der synthetischen Polymereinheit einzubauen, wurden semitelechele PNIPAM-Moleküle, die mit einer Psoralengruppe terminiert waren, synthetisiert. Dies ermöglichte die Vorfertigung des organischen Polymerbausteins und die anschließende, durch UV-Licht vermittelte Pfropfung auf die dsDNA.^[102]

Wie im Fall der linearen DNA-*b*-PNIPAM-Polymere^[101] wurden diese Pfropfstrukturen zur Hitzegefällung verwendet (Abbildung 8). Dabei fungierte das DNA-Rückgrat als Erkennungseinheit, während die PNIPAM-Seitenketten die temperaturempfindlichen Eigenschaften bewirkten. Ein Konjugat wurde zum Abfangen von Ethidium genutzt: Aus einer hoch verdünnten Lösung (3 ppm) konnten so über 95 % dieses DNA bindenden Gentoxins abgetrennt werden. Außer

zur thermisch induzierten Affinitätsstrennung kleiner Moleküle wurden solche Pfropfarchitekturen auch zur Isolierung von DNA bindenden Proteinen eingesetzt. Hind III, eine Endonuclease, konnte durch Zugabe von Glycerin, das die untere kritische Entmischungstemperatur (T_{LCST}) herabsetzt, als DNA-PNIPAM-Konjugat mitgefällt werden.^[99] Dieses Experiment wurde in einem Mg^{2+} -freien Puffer durchgeführt. In Abwesenheit dieses Cofaktors band Hind III DNA stark, zeigte aber keine Nucleaseaktivität. Eine noch wirksamere DNA-PNIPAM-Struktur beruhte auf einer DNA-Block-Bürste-Struktur (Abbildung 8).^[41] Diese Struktur bestand aus einem Nucleinsäuresegment mit PNIPAM-Seitenketten und einem weiteren Segment aus unveränderter dsDNA, die für die TATA-Box codiert, die an der Initiation der Transkription in Eukaryoten beteiligt ist. Wurde ein Gemisch aus TATA-Box-bindendem Protein (TBP) und Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA), das keine Affinität zu DNA zeigt, mit solch einem Blockkonjugat inkubiert, dann wurde durch Temperatureinstellung eine schnelle und selektive Fällungstrennung von TBP erreicht. Das unter homogenen Bedingungen gereinigte TBP wies eine Reinheit von mehr als 90 % (durch SDS-PAGE-Analyse ermittelt) auf.

Ein anderer DNA-Seitenkettenpolymertyp besteht aus einem synthetischen Polymerrückgrat, auf das ODNs gepfropft sind (Abbildung 9). Diese bioorganischen Hybridstrukturen sind über zwei Synthesestrategien zugänglich: Die erste Strategie beruht auf der Funktionalisierung eines vorgefertigten synthetischen Polymerrückgrats mit ODNs (Abbildung 9a), während die zweite auf der Anheftung des ODN an eine polymerisierbare Einheit basiert, die anschließend durch Copolymerisation in die Polymerhauptkette eingebaut wird (Abbildung 9b). Für die erste Variante wurden zahlreiche Syntheseverfahren ausgearbeitet, um das ODN an das Polymerrückgrat zu binden. Unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) als Kupplungsreagens konnte ein Copolymer der Polyacrylsäure (PAA) durch Amidbildung mit Amino-terminierten ODNs als Seitenketten modifiziert werden.^[103] Für den Aufbau einer stabilen Amidbrücke zwischen Polymerrückgrat und Nucleinsäureeinheit wurden nach einer ähnlichen Methode Amino-funktionalisierte ODNs mit einem Poly(*N,N*-dimethylacryl-

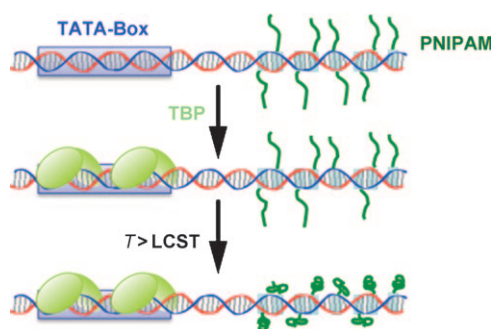


Abbildung 8. Affinitätsfällung und Trennung des DNA bindenden Proteins TBP unter Verwendung eines thermoresponsiven Polymers. Nach Bindung von TBP an die TATA-Box wird die Lösung erhitzt, um das infolge des thermisch induzierten Phasenübergangs von PNIPAM-Seitenketten gebildete Aggregat zu fällen (Wiedergabe aus Lit. [41]).

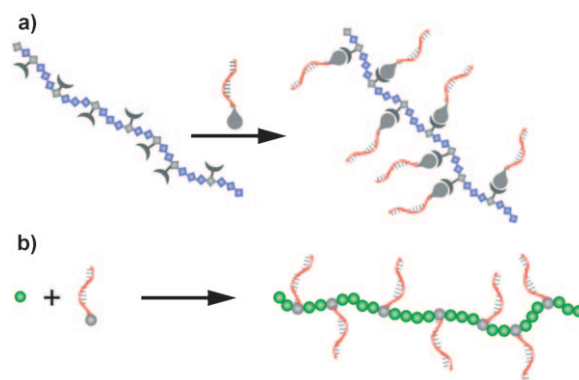


Abbildung 9. Synthese von Seitenkettenpolymeren mit aufgepfropfter DNA. a) DNAs werden an den funktionellen Gruppen entlang eines Polymerrückgrats angeknüpft. b) Copolymerisation von Monomer mit Nucleinsäuremonomer.

amid)copolymer, das aktivierte Estergruppen enthielt, umgesetzt.^[104] RNA-Einheiten konnten durch Bildung von *N*-Morpholinringen an ein Poly(L-lysin)-Rückgrat gekuppelt werden. Dazu wurde die Riboseeinheit am 3'-Ende mit Periodsäure oxidiert und mit Cyanoborhydrid reduziert.^[105]

Zusätzlich zu den Methoden, die auf einer Kupplung beider Segmente in Lösung beruhen, wurden Syntheserouten entwickelt, die von einer Pfropfung auf einem festen Träger ausgehen. Zum Beispiel wurden die Nucleinsäureeinheiten nach der ODN-Synthese auf der festen Phase belassen, und die detritylierten 5'-OH-Gruppen der ODNs wurden mit einem organischen Polymer umgesetzt, das entlang der Kette zahlreiche Phosphoramiditgruppen enthielt.^[106,107] Diese Methode ermöglichte die Synthese von Block-Bürste-Copolymeren, da die Hauptkette durch sequenzielle Ringöffnungsmetathese-Polymerisation (ROMP) verschieden funktionalisierter Norbornenmonomere aufgebaut wurde.

Eine weitere Möglichkeit, um DNA-Seitenkettenpolymere auf einem festen Träger zu erhalten, ist die Immobilisierung des synthetischen Polymerrückgrats auf Glaskugeln.^[108] Die Hydroxygruppen auf der Oberfläche von porösem Glas mit definierter Porengröße (controlled pore glass) wurden dabei mit alternierenden Copolymeren mit Maleinsäureanhydrid-Einheiten umgesetzt, sodass sich eine kovalente Esterbindung zwischen dem Träger und dem Polymer bildete. Die verbleibenden Anhydridstrukturen wurden genutzt, um durch Amidbildung ein 5'-Trityl-geschütztes Mononucleotid mit Aminoalkyl-Spacer zu binden, das als Initiator der ODN-Synthese fungierte. Wegen der unterschiedlichen Stabilität der Ester- und Amidbindungen konnten die DNA-Seitenkettenpolymere nach beendeter DNA-Synthese unter basischen Bedingungen selektiv vom festen Träger abgespalten werden.

Die beiden genannten Festphasenstrategien führen zu stark unterschiedlichen Pfropfungsdichten: Wird die Knüpfungsreaktion als letzter Schritt der Konjugatsynthese durchgeführt, resultieren im Durchschnitt fünf ODN-Einheiten pro Polymerrückgrat,^[107] während die DNA-Synthese an immobilisierten Polymerinitiatoren bis zu 109 Nucleinsäureeinheiten pro Polymerrückgrat ergibt.^[109] Zu erwähnen ist, dass diese Festphasenmethoden zu unterschiedlichen Verknüpfungsstellen am ODN führen: Die erste Route liefert Konjugate, in denen das ODN über das 5'-Ende an die Polymerkette gebunden ist, während nach der zweiten Route Hybride mit am 3'-Ende gebundenem ODN entstehen.

Ein konzeptionell anderer Zugang zu DNA-Polymer-Hybriden mit ODNs als Seitenketten besteht in der Copolymerisation von ODN-Makromonomeren. Zu diesem Zweck muss das ODN mit einer polymerisierbaren Gruppe funktionalisiert werden. Dies kann entweder durch Kupplung Amino-terminierter ODNs an Methacrylsäure in Lösung^[110] geschehen oder durch Anlagerung eines Acrylamid-funktionalisierten Phosphoramidits an die ODN-Sequenz auf der festen Phase.^[111,112] Zahlreiche Vinyl-ODN-Makromonomere wurden mit Acrylamid und *N*-Isopropylacrylamid radikalisch polymerisiert, um die entsprechenden Seitenkettenpolymere zu erhalten.^[112–115] Überdies wurde eine Vielzahl ODN-haltiger Seitenkettenpolymere für elektrochemische und optische Sensoren synthetisiert. Diese Strukturen zeigten jedoch un-

genügende Löslichkeit und konnten daher strukturell nicht gut charakterisiert werden.^[116–120]

Die Anordnung mehrerer ODN-Einheiten entlang einer einzelnen Polymerkette hat bedeutende Konsequenzen für die Basenpaarungseigenschaften, wenn zwei dieser Strukturen mit komplementären Sequenzen hybridisiert werden. Es zeigte sich, dass die Schmelzkurven schärfer sind als jene der Hybridisierung komplementärer, nicht gebundener ODNs in Lösung. Zudem haben sich die Schmelztemperaturen zu höheren Werten verschoben. Dieses charakteristische Schmelzverhalten war Thema mehrerer physikalischer Studien.^[121,122] Diese Eigenschaften, die aus der Multimerisierung von ODNs entlang einer Polymerkette folgen, könnten für hoch selektive Systeme zur Detektion von DNA genutzt werden. Insbesondere ermöglichen die scharfen Schmelzkurven eine verbesserte Auflösung bei der Detektion von einzelnen Basenfehlpaarungen in anderen Nanopartikelsystemen, z. B. in DNA-modifizierten Goldnanopartikeln.^[123–125]

Ein ähnliches System beruhte auf ssDNA-Seitenkettenpolymeren mit PNIPAM-Rückgrat.^[126] Wurden die gelösten Stoffe über T_{LCST} erhitzt, neigten sie zur Bildung von Kern-Schale-Partikeln mit PNIPAM im Innern und den Nucleinsäureeinheiten in der äußeren Zone. Wurden die Partikel mit der komplementären Sequenz hybridisiert, wurden die von den Teilchen gebildeten Kolloide instabil, was bei definierten Salzkonzentrationen zur Bildung von Teilchenaggregaten führte (Abbildung 10a). Diese Aggregation wurde durch Absorptionsmessung bei 500 nm verfolgt. Da hier die Teilchen nicht über verbrückende ODNs verbunden waren, unterschied sich ihr Aggregationsmechanismus von dem der ODN-funktionalisierten Goldnanopartikel. Ein Nachteil des DNA-PNIPAM-Seitenkettenpolymersystems ist die hohe Nachweisgrenze im μM -Bereich. Nachweissysteme, die auf Block-Pfropfstrukturen mit einem Polynorbornenrücken basieren, sind sehr viel empfindlicher.

Nicht nur ODN-, sondern auch Ferroceneinheiten wurden an die Polymerhauptkette geheftet. Diese Konjugate wurden in einer Sandwich-artigen elektrochemischen Drei-Komponenten-Nachweisstrategie eingesetzt (Abbildung 10b).^[107] Nach Immobilisierung einer Sondensequenz wurde mit dem elektroaktiven DNA-Seitenkettenpolymer und der Ziel-DNA, die zu beiden Sequenzen komplementär ist, versetzt und das Redoxsignal gemessen. Zielsequenzen konnten bis zu einer Konzentration von 100 pM nachgewiesen werden.

In einem anderen Ansatz wurden nicht ein, sondern zwei Seitenkettenpolymere in einem Sandwich-DNA-Nachweis-Assay verwendet (Abbildung 10c). Ein DNA-Seitenkettenpolymer wurde als Fänger-ODN eingesetzt, und nach Zugabe der Ziel-DNA wurde das zweite Seitenkettenpolymer als Nachweispolymer genutzt. Die Fluoreszenzintensität einer enzymkatalysierten Umwandlung eines fluorogenen Cumarinderivats diente als Signal in der Untersuchung. Die Verwendung von DNA-Seitenkettenarchitekturen erhöht die Empfindlichkeit gegenüber derjenigen nichtgebundener, unveränderter Referenz-ODNs um das 50fache. Die Nachweisgrenze dieser Assay-Anordnungen liegt ungefähr bei 0.1 pM.^[127,128]

Zum Nachweis von DNA wurden auch DNA-Seitenkettenpolymere mit einem konjugierten Poly(oxadiazol-fluo-

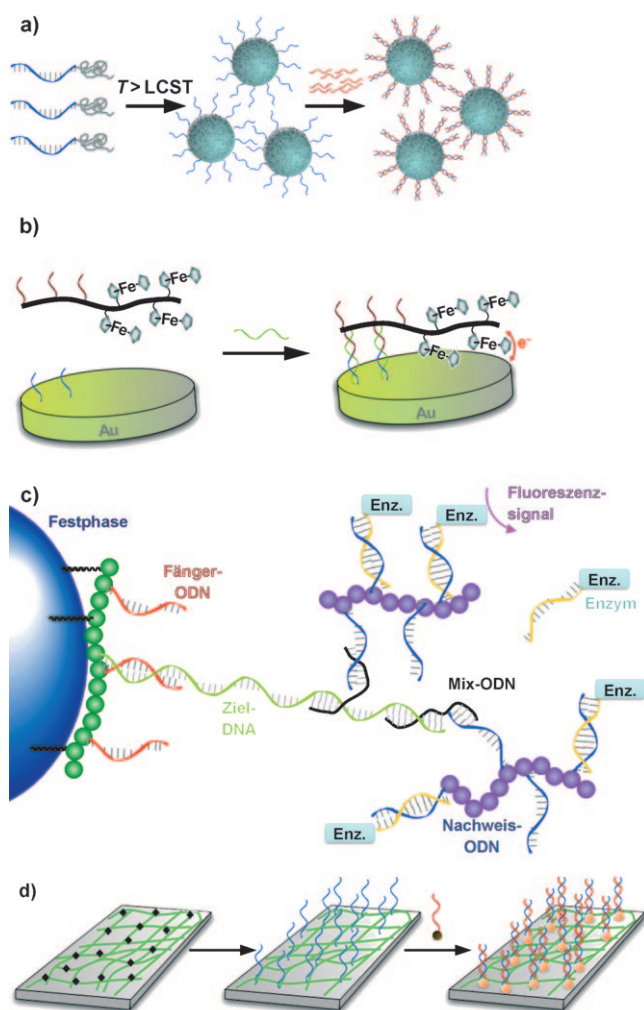


Abbildung 10. Beispiele für DNA-Nachweismethoden auf der Basis von Polymeren und DNA-Polymer-Konjugaten. a) PNIPAM-dsDNA, vernetzt durch Ziel-DNA. Nachweis der Partikelaggregation durch optische Absorption (Wiedergabe aus Lit. [126]). b) Elektrochemische Detektion von DNA mit einem DNA-Ferrocen-Polymer (Wiedergabe aus Lit. [107]). c) Sandwich-Methode mit ELOSA (enzyme-linked oligosorbent assay)-Testsystem. Die Enzymreaktion induziert das Fluoreszenzsignal (Wiedergabe aus Lit. [127]). d) DNA-Nachweis unter Verwendung eines lichtemittierenden Polymers, das an der Chipoberfläche immobilisiert ist (Wiedergabe aus Lit. [117]).

ren)-Rückgrat verwendet.^[117] Dieser experimentelle Aufbau war ungewöhnlich, da das Rückgrat auf einer Glasoberfläche immobilisiert wurde und die lichtgesteuerte Synthese der Sonden-DNA direkt auf dem Chip durchgeführt wurde, d.h. auf dem Überzug aus konjugiertem Polymer (Abbildung 10d). Wegen der harschen Bedingungen der DNA-Synthese wurde beim Entwurf des konjugierten Polymers besonders auf die Stabilität des Materials geachtet. Für den DNA-Nachweis-Assay wurde ein Farbstoff-markiertes Zielmolekül auf dem Chip hybridisiert. Der Fluoreszenzenergietransfer vom konjugierten Polymer zum Farbstoff diente dabei als Messwert. Die Nachweisgrenze dieser Chips liegt bei 100 pm.

DNA-Seitenkettenpolymere werden in großem Ausmaß als Antisense-Reagentien eingesetzt. Der Vorteil einer Kupplung von ODNs an ein positiv geladenes PLL-Rückgrat besteht in einer besseren Zellgängigkeit als bei unveränderter DNA. Eine 15-mere ODN-PLL-Seitenkettenarchitektur, die komplementär zur Initiationsregion der mRNA für das N-Protein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) war, inhibierte spezifisch die Expression von VSV-Proteinen. Außerdem wurde antivirale Aktivität beobachtet, wenn das DNA-Seitenkettenpolymer in Dosen von 100 nM zum Zellkulturmedium gegeben wurde.^[58] Nach einer ähnlichen Methode wurde die antivirale Aktivität gegen das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) bewertet.^[129] Es wurden zwei Regionen der viralen RNA als Ziele für Antisense-ODNs ausgewählt und in Seitenkettenarchitekturen eingebaut. Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, dass der erste Schritt der viralen Infektion, die reverse Transkription und die Synthese proviraler DNA, in Zellkulturen verhindert werden kann.

Die Verwendung von PNIPAM als synthetisches Polymerrückgrat der DNA-Seitenketten-Polymerstrukturen anstelle von PLL ermöglichte es, die Antisense-Aktivität solcher Konjugate über die Temperatur zu steuern. In ersten Experimenten wurde nachgewiesen, dass DNA-PNIPAM-Seitenkettenpolymere die komplementäre RNA-Sequenz spezifisch bei 27°C – diese Temperatur liegt unterhalb ihrer T_{LCST} (33°C) – binden. Bei 37°C dagegen, was noch unter der ODN-Schmelztemperatur liegt, war die Bindung an die komplementären Sequenzen deutlich verringert, vielleicht wegen der eingeschränkten räumlichen Zugänglichkeit der ODNs, die durch den Übergang vom Knäuel zur Kugel bewirkt wurde.^[115] Dieses charakteristische Erkennungsverhalten des ODN-Seitenkettenpolymers wurde in einem In-vitro-Transkriptions/Translations-System zur Stimulus-responsiven Regulation der Genexpression genutzt. Bei 27°C waren die Expressionsgrade signifikant herabgesetzt, ähnlich wie bei der Verwendung unveränderter Antisense-ODN. Oberhalb der T_{LCST} hatte die Gegenwart von Antisense-DNA-Seitenkettenpolymer keinen Einfluss auf den Expressionsgrad, wogegen die Kontroll-ODN einen erheblichen Antisense-Effekt induzierte.^[113] Zudem wurde nachgewiesen, dass die Antisense-Aktivität des DNA-PNIPAM-Konjugats als Resultat der Konformationsänderung des PNIPAM-Rückgrats schnell reguliert wird. Der Kugelzustand des DNA-Seitenkettenpolymers erhöht die Stabilität gegen Nucleasen. Bei 37°C wurde völlige Resistenz gegen Nuclease S1 beobachtet.^[114]

4. DNA-Polymer-Netzwerke

DNA-Seitenkettenpolymere können nach zwei Methoden in vernetzte Strukturen umgewandelt werden: 1) Wenn zwei derartige Konjugate mit komplementären Sequenzen hybridisiert werden, können Netzwerke erhalten werden.^[104] 2) Die zweite Strategie beruht auf vernetzender DNA; dazu wird ein DNA-Seitenkettenpolymer mit einem ODN gemischt, das die komplementäre Sequenz des Nucleinsäure-Polymer-Hybrids zweimal codiert.^[104] Warum sind solche Netzwerke wichtig? In den letzten Jahren haben Hydrogele

beträchtliche Aufmerksamkeit erlangt, da sie die Fähigkeit haben, auf Änderungen ihrer Umgebung zu reagieren. Diese Reizantwort, die bei Polymeren primär mit Quellung und Entquellung des Materials verbunden ist, kann durch Wechsel der Temperatur, des pH-Werts oder des Photonenflusses ausgelöst werden. Im Fall der DNA-Hydrogele wurden thermoreversible Materialien erhalten: Während bei niedrigen Temperaturen stark quellfähige Netzwerke produziert wurden, disaggregierten die Netzwerke bei erhöhten Temperaturen und lösten sich auf.^[104] In anderen Hydrogelsystemen wurden reizinduzierte Phasenübergänge z.B. zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung aus nanometergroßen^[130] und makroskopischen Netzwerken genutzt.^[131] Ein spezifischer Auslöser für Änderungen in den physikochemischen Eigenschaften der Hydrogele ist die Erkennung von Biomolekülen. Polymernetzwerke mit einem kovalent eingebauten Antikörper-Fab-Fragment zeigten nach Inkubation mit dem Antigen Fluorescein reversible Volumenänderungen.^[132] Bei Verwendung eines anderen Antikörper-haltigen Hydrogels als Membran fand eine pulsformige Permeation eines makromolekularen Modellwirkstoffs als Reaktion auf die schrittweise Änderung der Antigenkonzentration statt.^[133] Ähnlich zur spezifischen Erkennung von Antikörpern und Antigenen reagieren DNA-Hydrogele auf die Basenpaarung komplementärer Sequenzen. Durch Zugabe eines ODN wurde sowohl ein Schrumpfen als auch ein Aufquellen von DNA-Hybridnetzwerken erreicht. Molecular Beacons lieferten Maeda und Murakami die Anregung, Stamm-Schleifenstrukturen als Vernetzungsstellen in eine Polyacrylamidmatrix einzubauen. Sowohl die 3'- als auch die 5'-Enden wurden dabei an das synthetische Polymer gebunden.^[134] Wurden diese Netzwerke mit zur Stamm-Schleifenstruktur komplementären DNA-Sequenzen hybridisiert, dehnten sich die Hydrogele aus. Diese Volumenzunahme kann durch die konzertierte Auflösung der Stamm-Schleifenstruktur während des Hybridisierungsvorgangs und die damit verbundene, longitudinale Dehnung der Vernetzungen erklärt werden. Wenn dagegen die in das Hydrogel eingelagerte Sequenz so konstruiert wurde, dass sie keine Sekundärstruktur bildete, führte die Zugabe der komplementären DNA-Sequenz zu einer Kontraktion des Hydrogels. Dieser Schrumpfprozess erfolgt, weil dsDNA im Allgemeinen kürzer ist als ssDNA. Bemerkenswert ist dabei, dass die Sequenz dieser Netzwerke schon auf einzelne Basenfehlpaarungen empfindlich reagiert. In einem ähnlichen Ansatz demonstrierte dieselbe Arbeitsgruppe das Schrumpfen semi-interpenetrierender DNA-Polymer-Hybridnetzwerke.^[135]

Diese Volumenänderungen sind irreversibel, es können allerdings auch DNA-Hydrogele hergestellt werden, deren mechanische Zustände sich durch Hybridisierung hin- und herschalten lassen. Dieser Schaltvorgang beruht auf DNA-Sequenzen, die im Zusammenhang mit DNA-betriebenen Maschinen entwickelt wurden.^[136,137] Übertragen auf Polymernetzwerke wurden die DNA-Seitenkettenpolymere mit einem Vernetzungsstrang hybridisiert (Abbildung 11). Ein besonderes Merkmal dieser Vernetzungssequenz ist, dass sie nicht nur für das Gegenstück der DNA-Polymer-Hybride codiert, sondern eine zusätzliche Sequenz enthält. Im Verlauf der Vernetzung durch Hybridisierung wurde ein Überhang

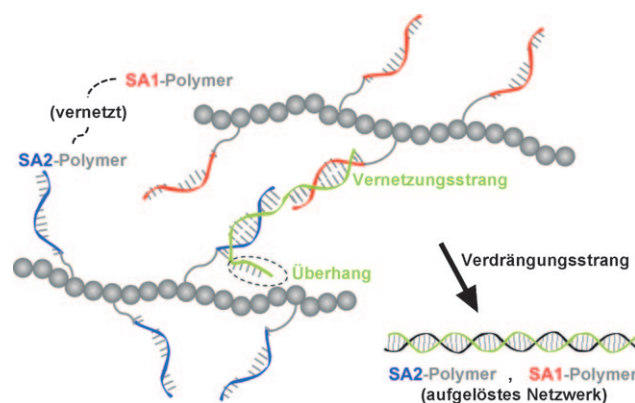


Abbildung 11. Ein Polyacrylamidhydrogel mit reversiblen DNA-Vernetzungen. Der Überhang der vernetzenden DNA ermöglicht die reversible Auflösung des Netzwerks durch Hybridisierung des Verdrängungsstrangs, der in voller Länge komplementär zum Vernetzungsstrang ist (Wiedergabe aus Lit. [112]).

oder „toehold“ erzeugt. Wird nun das vollständige Gegenstück zum Vernetzungsstrang inklusive Überhang – der Verdrängungsstrang (removal strand) – zugegeben, werden die Vernetzungspunkte gelöst.^[112] Dies ist ein bedeutender Fortschritt auf dem Gebiet der reizempfindlichen Hydrogele, da die Umkehrung der Vernetzung einfach durch Zugabe von DNA induziert wird, ohne externe Parameter wie Temperatur, pH-Wert oder Salzgehalt ändern zu müssen. Da ein derartig milder Stimulus sehr interessant für den Wirkstofftransport ist, bewiesen Simmel et al. mithilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie das kontrollierte Einfangen und Freisetzen von Quantenpunkten in diesen DNA-Hydrogel-Systemen.^[138]

Eine ähnliche Hybridisierungsstrategie wurde eingesetzt, um die mechanischen Eigenschaften eines DNA-Hybridnetzwerks zu verändern, ohne das Gel vollständig aufzulösen. In diesem Fall wurden nicht zwei, sondern drei unveränderte DNA-Stränge benötigt. Zunächst wurde eine vernetzende DNA von größerer Länge (80 Basen) als im vorigen Beispiel zum DNA-Seitenkettenpolymer (20-mere ODN-Pfropfungen an beiden Enden) gegeben, um das Netzwerk zu bilden. Anschließend wurde ein „Treibstoff“-Strang (fuel strand) von 50 Basen Länge eingeführt, der die mittlere ss-Region des vernetzenden Strangs in dsDNA überführte und gleichzeitig einen Überhang von zehn Basen erzeugte. Durch die Hybridisierung wurde die Vernetzungsstelle versteift, und es wurden Druckkräfte erzeugt, die zu Spannungen in den Polymerketten führten. Nach Zugabe des Verdrängungsstrangs hybridisierte dieser – beginnend am einzelsträngigen Überhang – vollständig mit dem „Treibstoff“-Strang, und das Gel kehrte ohne Auflösung der Netzwerkstruktur in seinen Ausgangszustand zurück. Auf diese Weise wurden Änderungen der Steifigkeit um mehr als den Faktor drei bewirkt.^[111]

Solche Hybridnetzwerke sind nicht die einzigen bekannten DNA-haltigen Hydrogele – es wurden auch Netzwerke hergestellt, die nur aus DNA bestehen. Dies wurde durch chemische Vernetzung von Lachs-Testes-DNA erreicht. Als vernetzendes Agens wurde Ethylenglycoldiglycidylether

eingesetzt.^[139] Charakteristisch für diese Gele war eine diskontinuierliche Volumenänderung bei Zugabe von Aceton zum wässrigen DNA-Hydrogel. Bei einem Acetongehalt von 63 % wurde eine 15fache Schrumpfung des Materials gegenüber dem Anfangsvolumen beobachtet.^[139] Die Abhängigkeit des Volumenübergangs solcher Hydrogele von Natrium- und Calciumionen wurde untersucht. Bei hohen Na^+ - und niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen verringerte sich das Gelvolumen mit zunehmender Ca^{2+} -Aufnahme.^[140]

PCR ist eine alternative Methode zur Erzeugung verzweigter DNA-Netzwerke. In einem zweistufigen Prozess wurden zwei Y-förmige Trisoligonucleotide zusammen mit einem ds-Templat in Hydrogele umgewandelt, die Segmentlängen zwischen den Verzweigungspunkten lagen im Bereich von 70 bis 1062 Nucleotiden.^[141]

Eine weitere Methode zur Synthese reiner DNA-Hydrogele nutzt auch einen enzymkatalysierten Aufbau.^[142] Die Bausteine dieses Hydrogeltyps waren verzweigte DNA-Moleküle, die aus drei oder vier sich gegenseitig durchdringenden Nucleinsäuresträngen bestanden und komplementäre überhängende Enden (sticky ends) enthielten. Die X-, Y- und T-förmigen Einheiten wurden hybridisiert und nachfolgend mithilfe der T4-DNA-Ligase über kovalente Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Während der Gelbildung, die unter physiologischen Bedingungen ablief, wurden Wirkstoffe und sogar lebende Säugetierzellen eingeschlossen. Mögliche Anwendungen, die für diese Hydrogele vorgeschlagen wurden, umfassen den kontrollierten Wirkstofftransport, Gewebezüchtung, 3D-Zellkultur und Zelltransplantation. In Fortsetzung dieser Arbeit wurden Netzwerke erhalten, in denen ein ganzes Gen die DNA-Verzweigungspunkte überbrückt. Mit einem In-vitro-Transkriptions/Translations-System wurden in den DNA-Hydrogelen funktionale Proteine synthetisiert. Die Syntheseeffizienz war 300-mal höher als in gebräuchlichen lösungsbasierten Ansätzen.^[143]

Wegen der symmetrischen C_3 -Struktur und der geringen Zahl an Bestandteilen (drei ODNs) wurden Y-förmige Bausteine zur Bildung responsiver DNA-basierter Hydrogele weiterentwickelt.^[144] Eine modifizierte dreiarmlige DNA-Struktur konnte durch einfache pH-Änderung, die ein In-einandergreifen terminaler Cytosin-reicher DNA-Sequenzen bewirkte, schnell und reversibel ein Hydrogel bilden.

5. Schlussfolgerungen

Die gezielte Einstellung von Struktur, Molekulargewicht und chemischer Funktion ist seit langem ein Hauptziel der chemischen Synthese in der organischen Chemie und den Materialwissenschaften. Blockcopolymere, besonders solche mit Biomakromolekülen, sind ein wichtiger Schritt, um dieses Ziel zu erreichen. Hybride aus Peptid und organischem Polymer sind für diese Zwecke schon umfangreich untersucht worden, aber die relativ neue Entwicklung der DNA-Blockcopolymer-Materialien ist vielversprechender. Die DNA selbst zählt zu den am umfassendsten untersuchten Biomakromolekülen, und ein breites Spektrum an biologischen und chemischen Methoden ermöglicht die Synthese monodisperser DNA-Segmente nahezu jeder Länge und Sequenzabfolge.

Wie in diesem Aufsatz ausgeführt, gibt es zahlreiche Methoden, um dieses Molekül an hydrophile oder hydrophobe Polymere zu knüpfen, sowohl in Lösung als auch auf der festen Phase. Die einzigartigen Selbsterkennungseigenschaften der DNA ermöglichen eine direkte Anwendung, beispielsweise für den Antisense-RNA-Transport oder empfindlichen DNA-Nachweis sowie eine spezifische und einfache Funktionalisierung für DNA-gestützte Reaktionen oder Teilchenerkennung. Die DNA-Hybridisierung kann auch eingesetzt werden, um kompliziertere Strukturen zu bilden, von Multiblockcopolymeren bis hin zu mehrschichtigen Vesikeln und reversiblen Hydrogelen. Ohne Frage sind die möglichen Anwendungen für diese interessante Materialklasse äußerst vielfältig, ob zum Wirkstofftransport oder zum Aufbau gut definierter Nanostrukturen. Dies erfordert jedoch viele weitere Studien. Überdies sollten zusätzliche Synthesestrategien erforscht werden, um das Spektrum zugänglicher Hybride und Strukturvarianten zu erweitern. Angesichts der bedeutenden Fortschritte, die in der letzten Dekade erzielt wurden, dürften schon bald praktische Anwendungen für diese Materialien zu erwarten sein.

Wir danken der EU (ERC starting grant, ECCell), der DFG und dem Zernike Institute for Advanced Materials für finanzielle Unterstützung sowie Andrew Musser und Alessio Marcozzi für ihre Mithilfe.

Eingegangen am 3. Dezember 2009

Online veröffentlicht am 15. September 2010

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] T. E. Patten, K. Matyjaszewski, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 901.
- [2] N. Hadjichristidis, S. Pispas, G. Floudas, *Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications*, Wiley, New York, **2002**.
- [3] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendrimers and Dendrons—Concepts, Syntheses, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [4] U. M. Wiesler, T. Weil, K. Müllen, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *212*, 1.
- [5] A. Herrmann, T. Weil, V. Sinigersky, U. M. Wiesler, T. Vosch, J. Hofkens, F. C. De Schryver, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4844.
- [6] T. Weil, U. M. Wiesler, A. Herrmann, R. Bauer, J. Hofkens, F. C. De Schryver, K. Müllen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8101.
- [7] T. Weil, E. Reuther, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1900.
- [8] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [9] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis—A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [10] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923.
- [11] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106.
- [12] G. Casi, D. Hilvert, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 589.
- [13] R. Serwa, I. Wilkening, G. Del Signore, M. Mühlberg, I. Claussnitzer, C. Weise, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8234.
- [14] M. H. Caruthers, G. Beaton, J. V. Wu, W. Wiesler, *Methods Enzymol.* **1992**, *211*, 3.
- [15] M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 278.

- [16] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Y. Tang, *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287.
- [17] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, in *Combinatorial Chemistry, Part B, Vol. 369*, **2003**, S. 235.
- [18] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 751.
- [19] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature* **2007**, 446, 1046.
- [20] N. M. Bell, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2691.
- [21] K. E. Lundin, L. Good, R. Stromberg, A. Graslund, C. I. E. Smith, *Adv. Genet.* **2006**, 56, 1.
- [22] P. E. Nielsen, G. Haaima, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 73.
- [23] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2796.
- [24] J. S. Jepsen, M. D. Sorensen, J. Wengel, *Oligonucleotides* **2004**, 14, 130.
- [25] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 74.
- [26] H. M. König, R. Abbel, D. Schollmeyer, A. F. M. Kilbinger, *Org. Lett.* **2006**, 8, 1819.
- [27] L. Hartmann, E. Krause, M. Antonietti, H. G. Börner, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1239.
- [28] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, **2001**.
- [29] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 34.
- [30] T. Hohsaka, M. Sisido, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 809.
- [31] R. E. Connor, D. A. Tirrell, *Polym. Rev.* **2007**, 47, 9.
- [32] S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3337.
- [33] H. O. Smith, C. A. Hutchison, C. Pfannkuch, J. C. Venter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15440.
- [34] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, 446, 1105.
- [35] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579.
- [36] O. Seitz in *Organic Synthesis Highlights V* (Hrsg. H. G. Schmalz, T. Wirth) Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 230.
- [37] N. Venkatesan, B. H. Kim, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3712.
- [38] T. S. Zatsepin, J. J. Turner, T. S. Oretskaya, M. J. Gait, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, 11, 3639.
- [39] C. H. Tung, S. Stein, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 605.
- [40] T. J. Kelly, M. S. Wold, J. Li, *Adv. Virus Res.* **1988**, 34, 1.
- [41] N. Soh, D. Umeno, Z. L. Tang, M. Murata, M. Maeda, *Anal. Sci.* **2002**, 18, 1295.
- [42] B. Perly, A. Douy, B. Gallot, *C. R. Seances Acad. Sci. Ser. C* **1974**, 279, 1109.
- [43] Y. Yamashita, Y. Iwaya, K. Ito, *Makromol. Chem.* **1975**, 176, 1207.
- [44] T. J. Deming, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 1145.
- [45] H. A. Klok, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1579; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1509.
- [46] D. Löwik, L. Ayres, J. M. Smeenk, J. C. M. Van Hest, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 202, 19.
- [47] T. J. Deming, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 202, 1.
- [48] J. C. M. Van Hest, *Polym. Rev.* **2007**, 47, 63.
- [49] H. G. Börner, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, 208, 124.
- [50] H. G. Börner, H. Schlaad, *Soft Matter* **2007**, 3, 394.
- [51] J. F. Lutz, H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 1.
- [52] M. A. Gauthier, H. A. Klok, *Chem. Commun.* **2008**, 2591.
- [53] H. Schlaad, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 202, 53.
- [54] H. A. Klok, S. Lecommandoux, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 202, 75.
- [55] H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 811.
- [56] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1220; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1200.
- [57] F. E. Alemдарoglu, A. Herrmann, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1311.
- [58] M. Lemaitre, B. Bayard, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 648.
- [59] J. P. Leonetti, G. Degols, P. Milhaud, C. Gagnor, M. Lemaitre, B. Lebleu, *Nucleosides Nucleotides* **1989**, 8, 825.
- [60] J. P. Leonetti, B. Rayner, M. Lemaitre, C. Gagnor, P. G. Milhaud, J. L. Imbach, B. Lebleu, *Gene* **1988**, 72, 323.
- [61] J. H. Jeong, S. H. Kim, S. W. Kim, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1034.
- [62] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1624.
- [63] Y. G. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, Y. Sakurai, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 42.
- [64] R. B. Fong, Z. L. Ding, C. J. Long, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 720.
- [65] J. H. Jeong, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 917.
- [66] K. Lee, L. K. Povlich, J. Kim, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17, 2580.
- [67] M. Oishi, T. Hayama, Y. Akiyama, S. Takae, A. Harada, Y. Yarnasaki, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2449.
- [68] M. Oishi, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *ChemBioChem* **2005**, 6, 718.
- [69] Z. Li, Y. Zhang, P. Fullhart, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1055.
- [70] F. E. Alemдарoglu, K. Ding, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4313; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4206.
- [71] F. E. Alemдарoglu, M. Safak, J. Wang, R. Berger, A. Herrmann, *Chem. Commun.* **2007**, 1358.
- [72] F. Teixeira, Jr., P. Rigler, C. Vebert-Nardin, *Chem. Commun.* **2007**, 1130.
- [73] C. Y. J. Yang, M. Pinto, K. Schanze, W. H. Tan, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2628; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2572.
- [74] M. Safak, F. E. Alemдарoglu, Y. Li, E. Ergen, A. Herrmann, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 1499.
- [75] F. E. Alemдарoglu, W. Zhuang, L. Zophel, J. Wang, R. Berger, J. P. Rabe, A. Herrmann, *Nano Lett.* **2009**, 9, 3658.
- [76] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427.
- [77] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, 440, 297.
- [78] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1856.
- [79] C. Lin, Y. Liu, H. Yan, *Biochemistry* **2009**, 48, 1663.
- [80] T. F. A. de Greef, E. W. Meijer, *Nature* **2008**, 453, 171.
- [81] E. A. Fogleman, W. C. Yount, J. Xu, S. L. Craig, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4198; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4026.
- [82] Z. X. Deng, S. H. Lee, C. D. Mao, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, 5, 1954.
- [83] N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.* **2007**, 37, 246.
- [84] K. Ding, F. E. Alemдарoglu, M. Börsch, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1172.
- [85] F. E. Alemдарoglu, J. Wang, M. Börsch, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 988; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 974.
- [86] N. Cottenye, F. Teixeira, A. Ponche, G. Reiter, K. Anselme, W. Meier, L. Ploux, C. Vebert-Nardin, *Macromol. Biosci.* **2008**, 8, 1161.
- [87] X. Y. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4848.
- [88] F. Cavalieri, A. Postma, L. Lee, F. Caruso, *ACS Nano* **2009**, 3, 234.
- [89] C. H. Fan, S. Wang, J. W. Hong, G. C. Bazan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6297.
- [90] A. Jaschke, J. P. Furste, D. Cech, V. A. Erdmann, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 301.
- [91] C. J. Langer, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2004**, 13, 1501.
- [92] T. E. S. Group, *Retina* **2002**, 22, 143.
- [93] Aktuelle Übersicht zur Anwendung von PEG beim Wirkstofftransport: K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S.

- Schubert, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 6430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6288.
- [94] J. H. Jeong, S. W. Kim, T. G. Park, *J. Controlled Release* **2003**, 93, 183.
- [95] S. H. Kim, J. H. Jeong, S. H. Lee, S. W. Kim, T. G. Park, *J. Controlled Release* **2008**, 129, 107.
- [96] F. E. Alemdaroglu, C. N. Alemdaroglu, P. Langguth, A. Herrmann, *Adv. Mater.* **2008**, 20, 899.
- [97] F. E. Alemdaroglu, C. N. Alemdaroglu, P. Langguth, A. Herrmann, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, 326.
- [98] K. Minagawa, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, Y. Masubuchi, M. Matsumoto, M. Doi, C. Nishimura, M. Maeda, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 37.
- [99] M. Maeda, C. Nishimura, A. Inenaga, M. Takagi, *React. Polym.* **1993**, 21, 27.
- [100] M. Maeda, C. Nishimura, D. Umeno, M. Takagi, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 527.
- [101] D. Umeno, M. Maeda, *Anal. Sci.* **1997**, 13, 553.
- [102] D. Umeno, M. Kawasaki, M. Maeda, *Supramol. Sci.* **1998**, 5, 427.
- [103] S. Taira, K. Yokoyama, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 88, 35.
- [104] S. Nagahara, T. Matsuda, *Polym. Gels Networks* **1996**, 4, 111.
- [105] G. Degols, J. P. Leonetti, C. Gagnor, M. Lemaitre, B. Lebleu, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 9341.
- [106] K. J. Watson, S. J. Park, J. H. Im, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5592.
- [107] J. M. Gibbs, S. J. Park, D. R. Anderson, K. J. Watson, C. A. Mirkin, S. T. Nguyen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1170.
- [108] C. Chaix, C. Minard-Basquin, T. Delair, C. Pichot, B. Mandrand, *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, 70, 2487.
- [109] C. Minard-Basquin, C. Chaix, C. Pichot, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, 20, 895.
- [110] T. Mori, D. Umeno, M. Maeda, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 72, 261.
- [111] D. C. Lin, B. Yurke, N. A. Langrana, *J. Mater. Res.* **2005**, 20, 1456.
- [112] D. C. Lin, B. Yurke, N. A. Langrana, *J. Biomech. Eng.* **2004**, 126, 104.
- [113] M. Murata, W. Kaku, T. Anada, Y. Sato, M. Maeda, Y. Katayama, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 986.
- [114] M. Murata, W. Kaku, T. Anada, Y. Sato, T. Kano, M. Maeda, Y. Katayama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3967.
- [115] M. Murata, W. Kaku, T. Anada, N. Soh, Y. Katayama, M. Maeda, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 266.
- [116] D. J. Caruana, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 769.
- [117] K. Lee, J.-M. Rouillard, T. Pham, E. Gulari, J. Kim, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 4751; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4667.
- [118] H. Korri-Youssoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, A. Yassar, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7388.
- [119] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2915.
- [120] T. Livache, B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, G. Bidan, R. Teoule, G. Mathis, *Anal. Biochem.* **1998**, 255, 188.
- [121] A. Kudlay, J. M. Gibbs, G. C. Schatz, S. T. Nguyen, M. O. de La Cruz, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 1610.
- [122] S. Y. Park, J. M. Gibbs-Davis, S. T. Nguyen, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 8785.
- [123] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1959.
- [124] R. C. Jin, G. S. Wu, Z. Li, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1643.
- [125] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547.
- [126] T. Mori, M. Maeda, *Polym. J.* **2002**, 34, 624.
- [127] C. Minard-Basquin, C. Chaix, C. Pichot, B. Mandrand, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 795.
- [128] C. Minard-Basquin, C. Chaix, F. D'Agosto, M. T. Charreyre, C. Pichot, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 92, 3784.
- [129] B. Bordier, M. Peralaepe, G. Degols, B. Lebleu, S. Litvak, L. Sarihcottin, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9383.
- [130] S. Nayak, L. A. Lyon, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7862; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7686.
- [131] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1345.
- [132] Z. R. Lu, P. Kopeckova, J. Kopecek, *Macromol. Biosci.* **2003**, 3, 296.
- [133] T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, *Nature* **1999**, 399, 766.
- [134] Y. Murakami, M. Maeda, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2927.
- [135] Y. Murakami, M. Maeda, *Macromolecules* **2005**, 38, 1535.
- [136] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, 406, 605.
- [137] L. P. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4342.
- [138] T. Liedl, H. Dietz, B. Yurke, F. Simmel, *Small* **2007**, 3, 1688.
- [139] T. Amiya, T. Tanaka, *Macromolecules* **1987**, 20, 1162.
- [140] F. Horkay, P. J. Basser, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 232.
- [141] S. Keller, J. Wang, M. Chandra, R. Berger, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13188.
- [142] S. H. Um, J. B. Lee, N. Park, S. Y. Kwon, C. C. Umbach, D. Luo, *Nat. Mater.* **2006**, 5, 797.
- [143] N. Park, S. H. Um, H. Funabashi, J. F. Xu, D. Luo, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 432.
- [144] E. J. Cheng, Y. Z. Xing, P. Chen, Y. Yang, Y. W. Sun, D. J. Zhou, L. J. Xu, Q. H. Fan, D. S. Liu, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7796; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7660.