

# Ein Chaperonin als Protein-Nanoreaktor für die radikalische Atomtransferpolymerisation\*\*

Kasper Renggli, Martin G. Nussbaumer, Raphael Urbani, Thomas Pfohl und Nico Bruns\*

**Abstract:** Das Gruppe-II-Chaperonin Thermosom (THS) des Archaeons *Thermoplasma acidophilum* wurde als Nanoreaktor für die radikalische Atomtransferpolymerisation (ATRP) verwendet. Ein Kupfer-Katalysator wurde ins Innere des THS eingeschlossen, um die Polymerisation in den Hohlraum des Proteinkäfigs zu beschränken. THS besitzt Poren, die groß genug sind, die gebildeten Polymere in die umgebende Lösung abzugeben. Der nanoskalige Reaktionsraum im Protein hat einen vorteilhaften Effekt auf die Polymerisation von *N*-Isopropylacrylamid und Poly(ethylenglycol)methylether-Acrylat. Eng verteilte Polymere mit Polydispersitätsindizes (PDIs) von minimal 1.06 wurden erhalten, während Kontrollreaktionen mit einem globulären Protein-Katalysator-Konjugat lediglich Polymere mit PDIs von über 1.84 ergaben.

Ein Reaktor bietet die Möglichkeit, chemische Reaktionen auf ein definiertes Volumen zu begrenzen. Dies ist, makroskopisch gesehen, eine wichtige Voraussetzung, um Parameter wie Temperatur, Rührgeschwindigkeit und Zuführen von Reaktanten zu kontrollieren und zu modulieren. Wenn eine Reaktion jedoch in einem Gefäß mit Dimensionen auf der Nanoskala durchgeführt wird, d.h. in dem Yoktoliter ( $=10^{-24}$  L)-Volumen eines Nanoreaktors, kann eine chemische Reaktion in einzigartiger Weise beeinflusst werden.<sup>[1]</sup> So können Reaktionsgeschwindigkeiten verbessert werden, indem Reaktant und Katalysator näher zusammen gebracht werden.<sup>[2]</sup> Nebenreaktionen können dadurch unterdrückt werden, dass die Zahl der reaktiven Spezies, die miteinander in Kontakt treten, minimiert wird.<sup>[3]</sup> Der Reaktor kann als Templat dienen, das die Größe des Produkts definiert.<sup>[4]</sup> Zudem kann der Nanoreaktor einen Hohlraum bieten, welcher die Faltung von einzelnen Polymerketten beeinflusst.<sup>[5]</sup>

Nanoreaktoren eröffnen die Möglichkeit, Reaktionen in Umgebungen durchzuführen, in denen sie normalerweise nicht stattfinden würden. Beispiele hierfür sind die Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln<sup>[6]</sup> oder in lebenden Zellen.<sup>[7]</sup> Nanoreaktoren bieten weiter die Möglichkeit, Reaktionen auf der Ebene einzelner Moleküle zu untersuchen, um Erkenntnisse über Reaktions- und Katalysemechanismen zu gewinnen.<sup>[8]</sup>


Diverse Nanogefäße wurden bisher als potenzielle Nanoreaktoren untersucht, dazu gehören gequollene Domänen in Polymernetzwerken,<sup>[6,9]</sup> Lipid- und Polymervesikel<sup>[10]</sup> sowie hohle Proteinkomplexe, so genannte Proteinkäfige.<sup>[1a-e,11]</sup> Diese Systeme haben gemeinsam, dass Katalysatoren, meist Enzyme, in einem Hohlraum eingeschlossen sind, welcher durch eine Hülle oder Membran begrenzt ist. Diese Grenzschicht ist entweder permeabel für Substrate und Produkte, oder besitzt Poren, welche den Austausch von Materie zwischen dem Inneren des Nanoreaktors und der Umgebung ermöglichen. Somit sind die Aktivität und die Substratspezifität nicht nur abhängig von den intrinsischen Eigenschaften des Katalysators, sondern auch von den maßgeschneiderten Eigenschaften des Nanoreaktors.<sup>[1e]</sup> Die Natur bietet faszinierende Nanogefäße mit definierten Poren. Ferritine und virale Kapside sind die bekanntesten Vertreter dieser hohlen Proteinkäfige.<sup>[1a-e]</sup> Einige Proteinkäfige agieren als natürliche Nanoreaktoren in lebenden Zellen, z.B. mikrobielle Mikrokompimente.<sup>[12]</sup> Die Verwendung von hohlen Proteinkomplexen in nichtnativer Umgebung mit nichtnativen katalytischen Spezies stellt jedoch eine Herausforderung dar. Erfolgreiche Beispiele sind der CCMV („cowpea chlorotic mottle virus“) mit verkapselter Peroxidase<sup>[8a]</sup> oder Alkoholdehydrogenase in dem Kapsid des Bakteriophagen P22.<sup>[13]</sup>

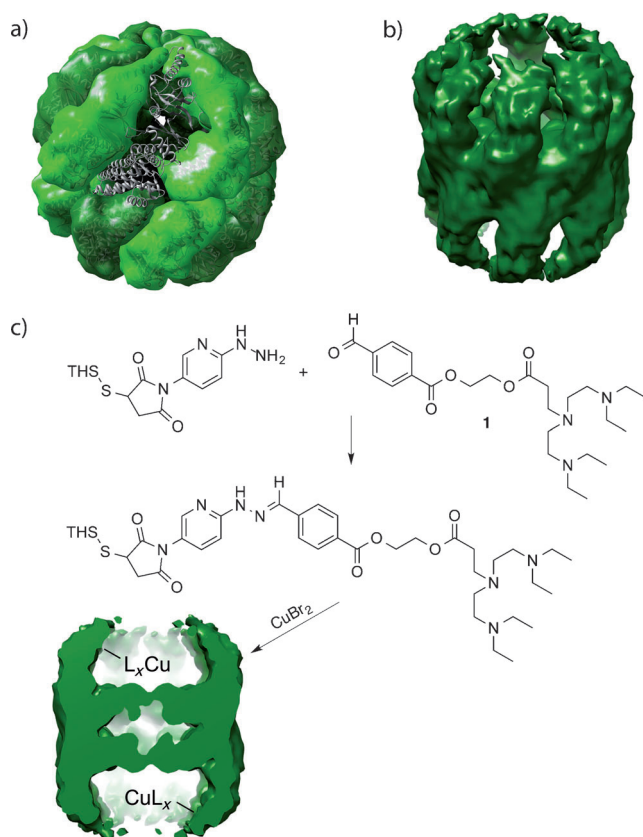
Hier beschreiben wir das Thermosom (THS), ein Gruppe-II-Chaperonin des Archaeons *Thermoplasma acidophilum*<sup>[17]</sup> als Nanoreaktor für Polymerisierungen. THS ist ein hexadecamerer Proteinkomplex, der aus acht  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten besteht. In seiner geschlossenen Konformation ist es ein sphärischer Proteinkäfig mit einem Durchmesser von ungefähr 16 nm, der zwei Hohlräume mit einem Volumen von je circa 130 nm<sup>3</sup> einschließt (Schema 1a).<sup>[14]</sup> THS stellt eine Faltungskammer zur Verfügung, um denaturierte Proteine in ihre native Form zu falten, und durchläuft, angetrieben durch die Hydrolyse von ATP, Konformationsänderungen zwischen offenen und geschlossenen Kammern.<sup>[17]</sup> THS bietet gegenüber anderen Nanoreaktoren den Vorteil, dass es in seiner offenen Konformation Poren besitzt, die groß genug sind, dass Makromoleküle in die Kammern ein- und austreten können (Schema 1b).<sup>[14,17,18]</sup> Somit stellt es einen idealen Nanoreaktor dar, um Polymere im Inneren zu synthetisieren und sie anschließend in die Umgebung freizusetzen.

[\*] Prof. Dr. N. Bruns  
Adolphe Merkle Institut, Universität Fribourg  
Rte de l'Ancienne Papeterie CP209, 1723 Marly (Schweiz)  
E-Mail: nico.bruns@unifr.ch

K. Renggli, M. G. Nussbaumer, R. Urbani, Prof. Dr. T. Pfohl,  
Prof. Dr. N. Bruns  
Departement Chemie, Universität Basel  
Klingelbergstrasse 80, 4056 Basel (Schweiz)

[\*\*] Diese Zuschrift wurde finanziell unterstützt durch ein Marie Curie Intra European Fellowship, ein Marie Curie European Reintegration Grant, die Holcim Stiftung Wissen, den Schweizerischen Nationalfonds und den NCCR Nanoscale Science. Die Autoren bedanken sich bei W. Meier (Departement Chemie) für seine Unterstützung, M. Zehring (Kantonales Laboratorium Basel-Stadt) und J. Jourdan (Departement Physik) für die NAA und V. Olivieri (Zentrum für Mikroskopie) für die TEM-Bilder.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306798> zu finden.



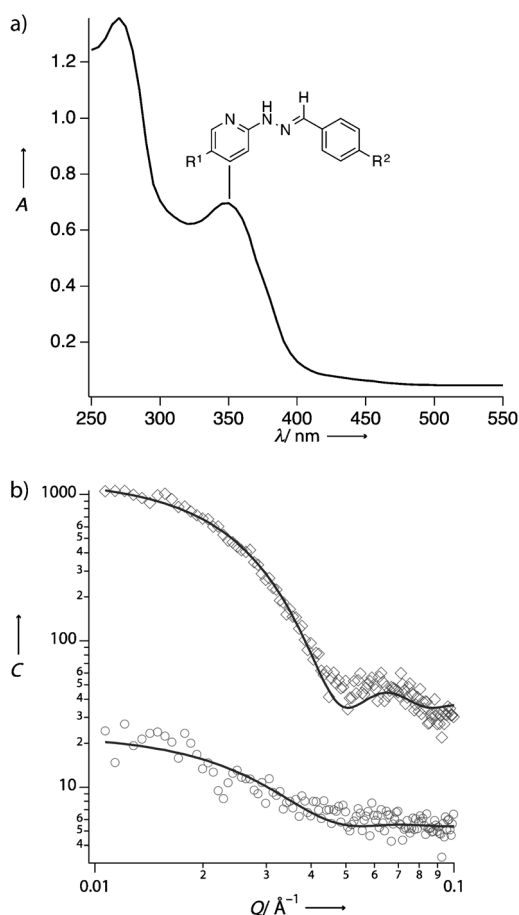
**Schema 1.** Struktur des THS und Strategie, um den Katalysator in den Proteinkäfig zu binden. a) Repräsentation des THS in seiner geschlossenen Konformation.<sup>[14]</sup> b) Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM)-Elektronendichtekarte eines Thermosoms in seiner offenen Konformation (Daten für *Methanococcus maripaludis*,<sup>[15]</sup> da keine Daten für THS in dieser Konformation in den Datenbanken existieren. Diese Struktur ist in guter Übereinstimmung mit den Kryo-EM-Daten des THS.<sup>[16]</sup>) c) Konjugationsstrategie, um ein TEDETA-Derivat (**1**) kovalent in die Kammern des THS zu binden. Dieser Ligand wurde genutzt, um Cu<sup>II</sup> zu komplexieren und so ein Protein-Katalysator-Konjugat, d. h. einen Nanoreaktor für ATRP, zu erhalten.

Auf dem Gebiet der Polymersynthese hat sich die radikalische Atomtransferpolymerisation (ATRP) als eine der vielseitigsten und erfolgreichsten kontrollierten/lebenden radikalischen Polymerisationen erwiesen, weil sie eine Vielzahl an funktionellen Gruppen, Biomolekülen und Reaktionsmedien toleriert.<sup>[19]</sup> Polymere, die mit ATRP synthetisiert worden sind, wurden unter anderem als Bausteine für Nanostrukturen,<sup>[20]</sup> als Protein-Polymer-Konjugate<sup>[21]</sup> und als Wirkstofftransportsysteme verwendet.<sup>[22]</sup> Obwohl ATRP in wässriger Lösung durchgeführt worden ist,<sup>[19, 21c, 23]</sup> stellt die Polymerisation in Wasser eine Herausforderung dar, da die Reaktionsgeschwindigkeit zu hoch sein kann und Nebenreaktionen, im Vergleich zu anderen Reaktionsmedien, eine wichtigere Rolle spielen.<sup>[19b, 24]</sup> Wenn eine Reaktion jedoch auf das Volumen eines Nanoreaktors beschränkt wird, sollte die Kontrolle über die Polymerisation sowie die Endgruppendifunktionalisierung des Produktes verbessert werden können.<sup>[25]</sup>

Eine Strategie, um ATRP in Protein-Nanoreaktoren durchzuführen, ist die Konjugation von Initiatoren in die

Proteinkäfige.<sup>[26]</sup> Dieser Ansatz ermöglicht jedoch keine kontinuierliche Produktion von Polymeren, da nur eine Polymerkette pro proteingebundenem Initiator entsteht, die zudem kovalent an das Protein gebunden ist. Um das THS als Nanoreaktor für ATRP zu nutzen, haben wir deshalb einen ATRP-Katalysator in das THS eingebunden, und wir starteten das Kettenwachstum mit Initiatoren, welche in das THS eindiffundierten. Somit können die gebildeten Polymerketten den Hohlraum des Proteinkäfigs verlassen und Platz für die Synthese weitere Polymerketten schaffen.

Ein metallorganischer Katalysator wurde mit Bisarylhydrazon-Chemie in den Hohlraum des THS konjugiert (Schema 1c), in Anlehnung an eine Methode, um Fluoreszenzproteine in das THS einzuschließen.<sup>[18]</sup> Ein genetisch verändertes THS, das ein freies Cystein auf der Innenseite jeder  $\beta$ -Untereinheit aufweist, wurde verwendet. Diese Cysteine wurden mit einem 25-fachen Überschuss (im Verhältnis zu den Thiolgruppen) an 3-Maleimido-6-hydraziniumpyridin-Hydrochlorid (MHPH) vollständig modifiziert, wie durch UV/Vis-Spektroskopie ermittelt wurde (für Details siehe die Hintergrundinformationen). Nach der Aufreinigung wurde das modifizierte THS mit **1** umgesetzt, einem Derivat des Liganden *N,N,N',N'*-Tetraethyldiethylentriamin (TEDETA) mit Arylaldehydfunktion (Schema 1c). Die Reaktion ergibt eine stabile Bisarylhydrazon-Verknüpfung zwischen dem Protein und dem Liganden.<sup>[27]</sup> Die erfolgreiche Bildung dieses Linkers ist mit UV/Vis-Spektroskopie nachweisbar. Das Spektrum in Abbildung 1a zeigt die typische Absorptionsbande für Proteine bei 280 nm, sowie die Bande des Bisarylhydrazon-Linkers mit einem Maximum bei 354 nm. Die quantitative Auswertung des Spektrums ermöglicht die Berechnung der durchschnittlichen Zahl an Bisarylhydrazon-Gruppen und ergab ein Verhältnis von  $3.9 \pm 0.1$  Liganden pro THS. Der gebundene Ligand wurde verwendet, um Cu<sup>II</sup>-Ionen zu komplexieren, gefolgt von einer Aufreinigung des modifizierten THS (THS-L<sub>x</sub>Cu) durch Größenausschluss-zentrifugation. Der Linker kann sich aufgrund der Lage des eingefügten Cysteins nur im Inneren des THS bilden. Deshalb muss der TEDETA-Cu-Komplex im Hohlraum des Chaperons eingeschlossen sein. Dies wurde durch Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen (SAXS) bestätigt. THS-L<sub>x</sub>Cu zeigte einen erhöhten Kontrast im Vergleich zum nichtmodifizierten THS (Abbildung 1b). Die SAXS-Daten belegen, dass THS-L<sub>x</sub>Cu, aufgrund des eingeschlossenen Kupfers, ein Nanoobjekt mit höherer Elektronendichte als nichtmodifiziertes THS ist. Die beste Anpassung an die Streudaten resultierte in einem Durchmesser von 17.2 nm für THS-L<sub>x</sub>Cu, was in guter Übereinstimmung mit dem Protein im offenen Zustand ist.<sup>[16]</sup> Daraus resultiert, dass sich das elektronendichte Kupfer in dem THS befindet. Um zu eruieren, ob das THS alleine, also ohne TEDETA-Ligand, Kupfer-Ionen bindet, wurde nichtmodifiziertes THS in einer CuBr<sub>2</sub>-Lösung inkubiert und wie oben beschrieben aufgereinigt. Der Vergleich von SAXS-Daten dieser Probe mit THS, das nicht Cu<sup>II</sup> ausgesetzt worden war, zeigt keinen Unterschied der gemessenen Strukturen (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Dies bestätigt, dass Kupfer nicht durch das THS selbst komplexiert wird.

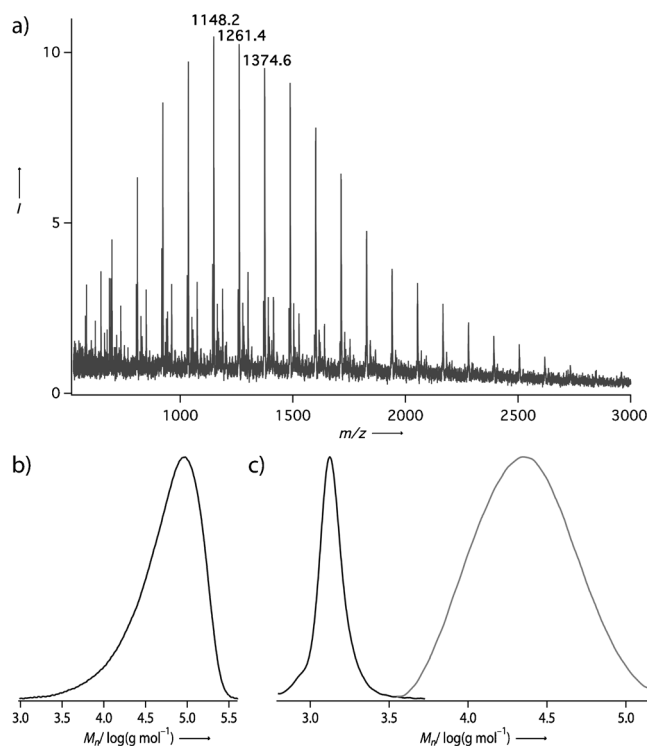


**Abbildung 1.** Charakterisierung von THS- $L_x$ Cu. a) Das UV/Vis-Spektrum zeigt die Absorptionsbanden des Proteins und des Bisarylhydrazons, das den Katalysator mit dem Protein verbindet. b) SAXS-Daten des THS- $L_x$ Cu ( $\diamond$ ) im Vergleich zu nichtmodifiziertem THS ( $\circ$ ), zeigen einen höheren Kontrast, welcher auf den elektronendichteren Kupferkomplex im THS hindeutet.

Der Proteinkäfig wurde mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und nativer PAGE auf seine strukturelle Integrität untersucht (Abbildungen S2a und b). Beide Gele zeigen dieselben Banden für THS, unabhängig davon, ob das Protein mit dem ATRP-Katalysator modifiziert war oder nicht. Ergänzend zeigen Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahmen von Protein-Katalysator-Konjugaten sphärische Objekte mit einem Durchmesser von circa 16 nm. Diese sind charakteristisch für vollständig assemblierte THS (Abbildung S2c).<sup>[16]</sup> Demzufolge ist die Gesamtstruktur des THS durch die Einkapselung des ATRP-Katalysators unbeeinflusst.

Polymerisationen wurden durchgeführt, indem THS- $L_x$ Cu unter Argonatmosphäre in eine gepufferte wässrige Lösung (100 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 5.2) mit dem wasserlöslichen Initiator 2-Hydroxyethyl-2-brombutyrat (HEBIB) und dem Monomer *N*-Isopropylacrylamid (NiPAAm) im molaren Verhältnis [Monomer]/[Initiator]/[THS- $L_x$ Cu] 67:1:1.5  $\times 10^{-5}$  gebracht wurde (Reaktionsschema siehe Abbildung S3). Ein Überschuss an Ascorbinsäure (Verhältnis [THS- $L_x$ Cu]/[Ascorbinsäure] 1:2.7  $\times 10^5$ ) wurde hinzugefügt, um Cu<sup>II</sup> in situ in seine katalytisch aktive

Form THS- $L_x$ Cu<sup>I</sup> zu bringen und um Cu<sup>II</sup> zu regenerieren, welches sich während der Polymerisation ansammeln kann. Dies entspricht der ARGET-Methode der ATRP (ARGET ist die Abkürzung für „activators regenerated by electron transfer“; Regenerierung der Aktivatoren durch Elektronentransfer).<sup>[19a]</sup> Die Polymerisation wurde jeweils nach 20 Stunden durch Kontakt mit Luft und Zugabe von nicht-desoxygeniertem Puffer gestoppt. Polymerisationen wurden mit dem THS im Apozustand, d. h. in Abwesenheit von ATP, durchgeführt. In diesem Zustand sind beide Poren des Proteinkäfigs offen.<sup>[15,17]</sup> Somit können Makromoleküle, die im Inneren des THS synthetisiert worden sind, die Proteinkammern nach der Polymerisation verlassen. Poly(*N*-isopropylacrylamid) (pNiPAAm) wurde durch Größenausschlusszentrifugation vom Proteinkäfig getrennt: Das THS verblieb im Retentat, und das Polymer wurde im Durchfluss mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-ToF-MS) nachgewiesen. Das Massenspektrum des Durchflusses zeigt eine Serie von Signalen mit dem Abstand von  $\Delta(m/z)$  113.2, mit einem Zahlenmittel der Molmasse ( $M_n$ ) von 1500 g mol<sup>-1</sup> und einem Polydispersitätsindex (PDI) von 1.11 (Abbildung 2a). Da das Molekulargewicht des Monomers 113.16 g mol<sup>-1</sup> beträgt, beweisen diese Messungen, dass pNiPAAm synthetisiert und freigesetzt wurde. Der niedrige PDI deutet darauf hin, dass die Polymerisation in kontrollierter



**Abbildung 2.** Charakterisierung von pNiPAAm und pPEGA, die mit THS- $L_x$ Cu und BSA- $L_x$ Cu synthetisiert worden sind. a) MALDI-ToF-MS-Daten von pNiPAAm synthetisiert mit THS- $L_x$ Cu in wässrigem Puffer. b) GPC-Elugramm von pNiPAAm synthetisiert mit BSA- $L_x$ Cu in wässrigem Puffer. c) Vergleich der GPC-Elugramme von pPEGA synthetisiert mit THS- $L_x$ Cu (schwarz) bzw. mit BSA- $L_x$ Cu (grau) in einer Wasser/THF(7:3 v/v)-Lösung.



Weise verläuft. Eine detaillierte Analyse der Peaks ist in Abbildung S4 zu sehen.

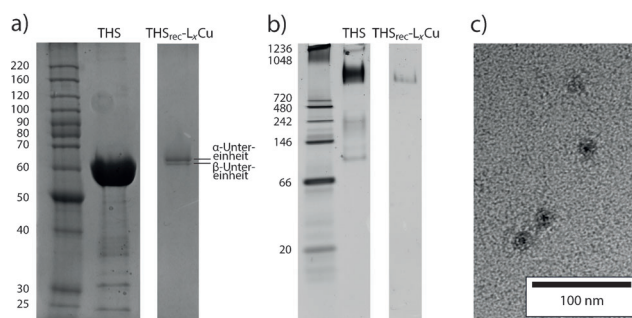
Um diese Ergebnisse in Perspektive zu setzen, wurde der ATRP-Katalysator an das globuläre Protein Rinderserumalbumin konjugiert (BSA- $L_x$ Cu; Charakterisierung siehe Abbildung S5) und die Polymerisation unter denselben Bedingungen durchgeführt. ARGET-ATRP mit BSA- $L_x$ Cu resultierte in pNiPAAM mit einem apparenten  $M_n$  von 42 600  $\text{g mol}^{-1}$  (kalibriert gegen Poly(methylmethacrylat)) und einem PDI von 1.94, gemessen mit Gelpermeationschromatographie (GPC; Abbildung 2b). Der Vergleich der beiden katalytischen Systeme (THS als Nanoreaktor und globuläres BSA) zeigt, dass die im Nanoreaktor synthetisierten Polymerketten substanziell kürzer sind und einen niedrigeren PDI aufweisen. Ein Grund für die relativ breit verteilten Molmassen von Polymeren, die mit BSA- $L_x$ Cu synthetisiert wurden, könnte die sehr niedrige Katalysatorkonzentration in der Reaktionsmischung sein. Im THS spielt dies keine Rolle, da die wachsenden Polymerketten in nächster Nähe zum Katalysator im Nanoreaktor bleiben. Somit profitiert die Synthese von pNiPAAM, welche in wässriger Lösung intrinsisch schwierig zu kontrollieren ist,<sup>[24]</sup> vom begrenzenden Reaktionsgefäß des Nanoreaktors. Das niedrigere  $M_n$  der Polymere, die im Nanoreaktor synthetisiert wurden, kann durch Diffusionsbegrenzung des Monomers oder sterische Einschränkung der wachsenden Polymerkette erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Reaktivierung der „ruhenden“ Polymerspezies unwahrscheinlicher ist, wenn die Polymerkette den Nanoreaktor verlassen hat.

Die Möglichkeiten, die das THS als Nanoreaktor für Polymerisationen eröffnet, wurden weiter untersucht, indem Experimente mit einem anderen Monomer durchgeführt wurden. Poly(ethylenglycol)methylether-Acrylat (PEGA) mit einem  $M_n$  von 480  $\text{g mol}^{-1}$  wurde mit THS- $L_x$ Cu unter denselben ARGET-ATRP-Bedingungen polymerisiert, die auch für NiPAAM verwendet wurden. Dies resultierte in pPEGA mit einem Poly(ethylenoxid)-apparenten  $M_n$  von 14 700  $\text{g mol}^{-1}$  und einem PDI von 1.95, gemessen durch GPC (siehe Abbildung S3). Im Vergleich dazu produzierte der BSA-basierte Katalysator pPEGA mit einem apparenten  $M_n$  von 119 400  $\text{g mol}^{-1}$  und einem PDI von 3.12. Zusätzlich wurde die Polymerisation von PEGA mit THS- $L_x$ Cu in Gegenwart von ATP, welches die Poren des Proteinkäfigs zwischen offener und geschlossener Konformation zirkulieren lässt, durchgeführt.<sup>[17]</sup> Diese Reaktion ergab pPEGA mit einem apparenten  $M_n$  von 17 500  $\text{g mol}^{-1}$  und einem PDI von 2.50. Die Zugabe von ATP resultierte demnach nicht in einer verbesserten Polymerisation, wahrscheinlich weil die Hydrolyse von ATP durch THS bei Raumtemperatur, d.h. bei der Reaktionstemperatur, zu langsam verläuft.<sup>[28]</sup>

Die Addition von organischem Colösungsmittel zu der wässrigen ATRP-Mischung kann die Leistung des Katalysators verbessern. Nebenreaktionen, wie Disproportionierungen des ATRP-Aktivators, Verlust der Halogenidligenanden des ATRP-Desaktivators, sowie schnelle Kettenfortpflanzung können unterdrückt werden, wodurch sich besser kontrollierte Polymerisationen ergeben.<sup>[19b]</sup> Deshalb wurde PEGA mit THS- $L_x$ Cu als Katalysator in einer 7:3(v/v)-Mischung aus Wasser und THF polymerisiert (siehe Abbildung S3). Das

Produkt dieses Experimentes hat einen apparenten  $M_n$  von 1400  $\text{g mol}^{-1}$  und einen PDI von 1.06 (Abbildung 2c). BSA- $L_x$ Cu ergab pPEGA mit einem apparenten  $M_n$  von 14 900  $\text{g mol}^{-1}$  und einem PDI von 1.84. Der Zusatz von organischem Lösungsmittel resultierte also in einem niedrigeren Molekulargewicht und PDI von pPEGA. Außerdem bestätigen diese Experimente, dass Reaktionen, die im Nanoreaktor durchgeführt wurden, Polymere mit schmalere Verteilung ergaben.

Damit die ATRP im THS stattfinden kann, muss der Proteinkäfig während der Polymerisation stabil sein. Die härtesten Reaktionsbedingungen bestanden im Einsatz von THF als Colösungsmittel; daher wurde untersucht, ob THS seine Struktur in einer typischen PEGA-Polymerisation im Wasser/THF-Gemisch beibehält. Nach der Reaktion zeigten SDS- und native PAGE (Abbildung 3a bzw. 3b) die



**Abbildung 3.** Charakterisierung von THS- $L_x$ Cu nach der Polymerisation in einer Wasser/THF(7:3 v/v)-Lösung. a) SDS-Gelelektrophorese, b) native Gelelektrophorese und c) TEM-Bild von THS- $L_x$ Cu, das nach der Polymerisation zurückgewonnen wurde (THS- $L_x$ Cu). Die Daten lassen den Schluss zu, dass das THS während der Polymerisation stabil ist und seine Struktur behält.

charakteristischen Banden der beiden Untereinheiten und des vollständig assemblierten THS. Zusätzlich sprechen TEM-Bilder (Abbildung 3c) dafür, dass der Proteinkäfig intakt bleibt. Insofern war der Proteinkäfig in dieser Reaktion stabil.

Mehrere Kontrolllexperimente wurden durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur der Cu-TEDETA-Komplex im THS Kupfer-Ionen trägt, die katalytisch aktiv in der ATRP sind. Nichtmodifiziertes THS wurde mit  $\text{CuBr}_2$  inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene Kupfer mit Größenauschlusszentrifugation entfernt. Mit dem resultierenden THS wurden Polymerisationen von NiPAAM und PEGA unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Reaktionen ergaben keine Polymerprodukte, was durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und GPC gemessen wurde. Diese Experimente in Kombination mit den oben diskutierten SAXS-Daten (Abbildung S1) zeigen, dass die Kupfer-Ionen nicht durch das Protein komplexiert werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Bisarylhydrazon-Linker Kupfer in einer ATRP-aktiven Form komplexieren kann. Dafür wurde ein Analogon von BSA- $L_x$  verwendet, das zwar den Linker, jedoch keinen TEDETA-Liganden aufweist (BSA-4FB; Abbildung S6). Dieses modifizierte Protein wurde mit  $\text{CuBr}_2$

inkubiert, mittels Größenausschlusszentrifugation aufgereinigt und als Katalysator für die ARGET-ATRP von NiPAAm verwendet. Die  $^1\text{H}$ -NMR- und GPC-Analytik dieser Reaktion zeigte kein Polymer. Obschon Kupfer-Ionen durch den Linker komplexiert werden könnten, zeigt diese Kontrollreaktion mit BSA-4FB, dass nur TEDETA-Cu-Komplexe in der Lage sind, die ATRP unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu katalysieren. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, einen passenden, Kupfer-bindenden Ligand ins THS zu binden, um einen ATRP-Katalysator ins Innere des Proteinkäfigs zu bringen.

Zusammenfassend haben wir das Chaperonin THS als Nanoreaktor eingeführt. In dem Proteinkäfig wurde ATRP durchgeführt, indem ein ATRP-Katalysator in den Hohlraum des Proteinkäfigs konjugiert wurde. Unseres Wissens ist dies das erste beschriebene Protein-Katalysator-Konjugat für ATRP. THS ist besonders attraktiv für diese Anwendung, da es Poren besitzt, die groß genug sind, um Makromoleküle mit der Umgebung auszutauschen. Die synthetisierten Polymere können demnach aus den Kammern diffundieren, ohne dass der Proteinkäfig in seine Untereinheiten zerlegt werden muss. Polymerisationen in dem begrenzten Reaktionsraum innerhalb des Nanoreaktors ergeben Polymere mit engen Molmassenverteilung. Solch ein positiver Effekt auf die Polymerisation ist sehr wahrscheinlich auf die Nähe der ATRP-Reagentien zurückzuführen und ist in guter Übereinstimmung mit Simulationen zu anderen Nanoreaktorsystemen.<sup>[25b]</sup> Protein-Nanoreaktoren haben das Potenzial, Polymerisationen in einzigartiger Weise zu beeinflussen, z.B. durch eine spezifische Selektivität für Monomere oder die Modulierung der Polymerisationsgeschwindigkeit über Auslöser, die die Poren in der Proteinhülle öffnen oder schließen. Da Chaperonine die Faltungskammern der Natur sind, könnten sie zudem die Faltung von (Block)Copolymerketten vorteilhaft beeinflussen, die einzeln im Nanoreaktor synthetisiert werden. Des Weiteren könnten Protein-Nanoreaktoren die Untersuchung von Reaktionsmechanismen der ATRP auf Einzelmolekülebene ermöglichen.

Eingegangen am 3. August 2013,  
veränderte Fassung am 18. September 2013  
Online veröffentlicht am 20. Dezember 2013

**Stichwörter:** Chaperon-Proteine · Kontrollierte/  
Lebende radikalische Polymerisation · Nanoreaktoren ·  
Polymerisationen · Thermosom

- [1] a) D. M. Vriezema, M. C. Aragonès, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445–1489; b) M. Uchida, M. T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1025–1042; c) A. de La Escosura, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2274–2278; d) K. T. Kim, S. A. Meeuwissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Nanoscale* **2010**, *2*, 844–858; e) K. Renggli, P. Baumann, K. Langowska, O. Onaca, N. Bruns, W. Meier, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 1241–1259; f) M. Marguet, C. Bonduelle, S. Lecommandoux, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 512–529.
- [2] P. Cotanda, N. Petzetakis, R. K. O'Reilly, *MRS Commun.* **2012**, *2*, 119–126.
- [3] B. Helms, S. J. Guillaudeu, Y. Xie, M. McMurdo, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6542–6545; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6384–6387.
- [4] a) R. McHale, J. P. Patterson, P. B. Zetterlund, R. K. O'Reilly, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 491–497; b) M. Okuda, Y. Suzumoto, K. Iwahori, S. Kang, M. Uchida, T. Douglas, I. Yamashita, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8797–8799.
- [5] a) J.-F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu, M. Sawamoto, *Science* **2013**, *341*, 1238149; b) O. Altintas, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 958–971.
- [6] N. Bruns, J. C. Tiller, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 45–48.
- [7] P. Tanner, V. Balasubramanian, C. G. Palivan, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2875–2883.
- [8] a) M. Comellas-Aragonès, H. Engelkamp, V. I. Claessen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. E. Rowan, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, B. J. M. Verduin, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 635–639; b) S.-H. Shin, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10462–10463.
- [9] K. Henzler, P. Guttmann, Y. Lu, F. Polzer, G. Schneider, M. Ballauff, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 824–828.
- [10] a) A. Jesorka, O. Orwar, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 801–832; b) R. J. R. W. Peters, I. Louzao, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 335–342; c) A. Lu, R. K. O'Reilly, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 1–7; d) J. Gaitzsch, D. Appelhans, L. Wang, G. Battaglia, B. Voit, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4524–4527; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4448–4451; e) M. Spulber, A. Najer, K. Winkelbach, O. Glaied, M. Waser, U. Piele, W. Meier, N. Bruns, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9204–9212.
- [11] a) D. P. Patterson, B. Schwarz, K. El-Boubbou, J. van der Oost, P. E. Prevelige, T. Douglas, *Soft Matter* **2012**, *8*, 10158–10166; b) A. Schreiber, E. Zaitseva, Y. Thomann, R. Thomann, J. Dengjel, R. Hanselmann, S. M. Schiller, *Soft Matter* **2011**, *7*, 2875–2878.
- [12] T. O. Yeates, C. A. Kerfeld, S. Heinhorst, G. C. Cannon, J. M. Shively, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 681–691.
- [13] D. P. Patterson, P. E. Prevelige, T. Douglas, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5000–5009.
- [14] L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, K.-O. Stetter, H. Huber, R. Huber, S. Steinbacher, *Cell* **1998**, *93*, 125–138.
- [15] J. Zhang, M. L. Baker, G. F. Schroder, N. R. Douglas, S. Reissmann, J. Jakana, M. Dougherty, C. J. Fu, M. Levitt, S. J. Ludtke, J. Frydman, W. Chiu, *Nature* **2010**, *463*, 379–383.
- [16] M. Nitsch, J. Walz, D. Typke, M. Klumpp, L.-O. Essen, W. Baumeister, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 855–857.
- [17] M. G. Bigotti, A. R. Clarke, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 331–339.
- [18] N. Bruns, K. Pustelny, L. M. Bergeron, T. A. Whitehead, D. S. Clark, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5776–5779; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5666–5669.
- [19] a) K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4015–4039; b) N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2270–2299.
- [20] a) E. Cabane, V. Malinova, W. Meier, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1847–1856; b) Y.-C. Lin, S.-W. Kuo, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 882–891.
- [21] a) M. A. Gauthier, H.-A. Klok, *Chem. Commun.* **2008**, 2591–2611; b) R. M. Broyer, G. N. Grover, H. D. Maynard, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2212–2226; c) S. Averick, A. Simakova, S. Park, D. Konkolewicz, A. J. D. Magenau, R. A. Mehl, K. Matyjaszewski, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 6–10.
- [22] a) A. Schallon, C. V. Synatschke, V. Jerome, A. H. Muller, R. Freitag, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3463–3474; b) D. C. Forbes, M. Creixell, H. Frizzell, N. A. Peppas, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 472–478.

- [23] X. S. Wang, R. A. Jackson, S. P. Armes, *Macromolecules* **2000**, 33, 255–257.
- [24] P.-E. Millard, N. C. Mougín, A. Böker, A. H. E. Müller, *ACS Symp. Ser.* **2009**, 1023, 127–137.
- [25] a) P. B. Zetterlund, *Macromol. Theory Simul.* **2011**, 20, 660–666;  
b) P. B. Zetterlund, *Polym. Chem.* **2011**, 2, 534–549.
- [26] J. Lucon, S. Qazi, M. Uchida, G. J. Bedwell, B. LaFrance, P. E. Prevelige, T. Douglas, *Nat. Chem.* **2012**, 4, 781–788.
- [27] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2. Aufl., Academic Press, London, **2008**, S. 730.
- [28] M. G. Bigotti, A. R. Clarke, *J. Mol. Biol.* **2005**, 348, 13–26.
-