

# DNA-Nanogele als Falle für Karzinogene: ein bioinspiriertes, generisches Konzept mit hoher Effizienz

Fuat Topuz<sup>+</sup>,\* Smriti Singh<sup>+</sup>, Krystyna Albrecht, Martin Möller und Jürgen Groll\*

**Abstract:** Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) sind allgegenwärtige Schadstoffe in der Umwelt und insbesondere im Trinkwasser. Nach Kontakt von PAHs mit DNA bilden sich als erster Schritt der toxischen Wirkung schnell stabile PAH-DNA-Zusammenlagerungen. In dieser Arbeit wurden hydrophile DNA-Nanogele hergestellt, um den Komplexierungsprozess als eine biomimetische Reinigungsmethode zu nutzen. Der Ansatz ist dabei nicht auf die Adsorption an der Nanogeloberfläche beschränkt, sondern beruht auf der Wechselwirkung zwischen PAHs mit der gesamten Netzwerkstruktur der mit Wasser gequollenen Hydrogelnetzwerke. Die Aufnahme von bis zu 720 µg PAH pro Gramm DNA belegt eine Reinigungskapazität von 1 mg DNA pro Liter Wasser mit einer kritischen, potentiell krebsauslösenden PAH-Konzentration von 600 ng L<sup>-1</sup>. Aufgrund der kurzen Diffusionswege erfolgt die schnelle Aufnahme von PAHs mit einer 50 %igen Beladung nach 15 min. Daneben könnten DNA-Nanogele für die allgemeine Entgiftung von Trinkwasser hilfreich sein, da die meisten bekannten Moleküle, die starke Wechselwirkungen mit DNA zeigen, Mutagene sind.

Trotz ihrer hydrophoben Eigenschaften sind PAHs zu einem gewissen Maß in Wasser löslich und können etwa im Oberflächenwasser als einer Trinkwasserquelle in Konzentrationen bis zu 830 ng L<sup>-1</sup> nachgewiesen werden.<sup>[1]</sup> PAHs werden zu Epoxiden metabolisiert,<sup>[2]</sup> die zwischen die Nukleotid-Basen interkalieren und dann kovalent gebunden werden. Dies führt zu einer allgemeinen Fehlkodierung,<sup>[3,4]</sup> und eine Reihe von Krebsarten wird direkt mit der Bildung von PAH-DNA-Addukten in Verbindung gebracht.<sup>[5-7]</sup> Dementsprechend erhöht eine langzeitige PAH-Exposition das Risiko für Lungenkrebs beim Menschen<sup>[8]</sup> mit einer kritischen Konzentration im Trinkwasser von 600 ng L<sup>-1</sup>.<sup>[9]</sup> Bis heute existieren verschiedene Reinigungskonzepte für PAHs (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen), beispielsweise unter Verwendung von Cyclophanen,<sup>[10]</sup> Cyclodextrinen,<sup>[11]</sup> Butyl-Elastomeren<sup>[12]</sup>

und neuerdings auch photoschaltbaren, wasserlöslichen Nanopartikeln, die nach Bestrahlung mit PAH aggregieren.<sup>[13]</sup> Die Ansätze nutzen vorzugsweise die Grenzflächenadsorption von PAHs an hydrophoben Materialien.

Initial erfolgt die PAH-Interkalation in DNA über physikalische Wechselwirkungen der planaren PAH-Moleküle in den hydrophoben Zwischenräumen der benachbarten Basenpaare der DNA-Stränge.<sup>[14-16]</sup> Diese Anbindung ist generisch und funktioniert besser für DNA als etwa für Cyclodextrine.<sup>[17]</sup> Daneben konnte kürzlich gezeigt werden, dass DNA auch eine ganze Reihe anderer, hydrophober aromatischer Moleküle binden kann.<sup>[18]</sup>

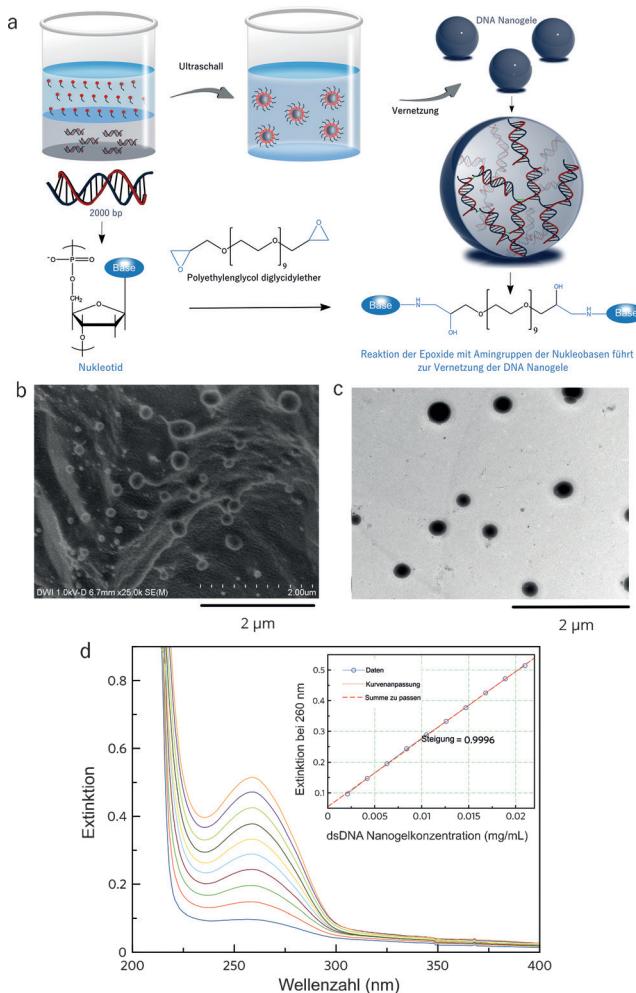
Chemisch vernetzte DNA-Hydrogele stellen eine interessante neue Materialklasse dar,<sup>[19-21]</sup> deren Anwendung etwa als Wirkstofftransportsysteme kürzlich gezeigt werden konnte.<sup>[22,23]</sup> Im Gegensatz zur bisher verwendeten Grenzflächenadsorption zur Abtrennung von PAHs bieten hochgequollene DNA-Netzwerke den Vorteil, das mechanistisch das gesamte Volumen des Gels für die Komplexierung von PAHs zur Verfügung steht. Speziell kolloidale Systeme erscheinen hierbei als vorteilhaft, da die Diffusionswege kurz sind und so eine hohe Aufnahmekapazität mit einer schnellen Abtrennung verbunden werden kann. Die intrinsische Hydrophilie solcher Systeme würde zusätzlich die vollständige Benetzung und Quellung mit wässrigen Lösungen ermöglichen. Zudem sind DNA-basierte Materialien biokompatibel und biologisch abbaubar.

In dieser Arbeit wurde von uns dieses bioinspirierte Konzept der PAH-Abtrennung verfolgt. DNA-Nanogele wurden aus doppel- (ds) und einsträngigen (ss) DNA-Molekülen über die Technik der inversen Mikroemulsion hergestellt. Die chemische Vernetzung wurde durch das Diepoxid Poly(ethylenoxid)diglycidylether (PEG-DGE) als Vernetzer mit Zusatz von Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator (Abbildung 1) unter Variation der Konzentration und Zusammensetzung erreicht (Tabelle S2). Nach Herstellung und Waschen wurden die Nanogele zur Aufreinigung gegen 4 mM NaBr-Lösung dialysiert, um die Konformation der DNA-Stränge in den Nanogelen zu schützen. TEM- und cryo-FE-REM-Untersuchungen (Abbildung 1b,c) zeigten die sphärische Form der Gele ohne die Bildung von Aggregaten. UV/Vis-Messungen bei 260 nm (DNA-Absorptionsbande) an Nanogel-Dispersionen im Vergleich zu DNA-Lösungen ergaben eine Ausbeute an DNA-beladenem Nanogel im Bereich von 50–70 %. Die Messungen verdeutlichen auch einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration der zur Herstellung der Nanogele verwendeten DNA-Lösungen und der DNA-Konzentration im Nanogel (Abbildung 1d, Einschub).

[\*] Dr. F. Topuz,<sup>[+]</sup> Dr. S. Singh,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. M. Möller  
DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien, RWTH Aachen  
Forckenbeckstraße 50, 52074 Aachen (Deutschland)  
E-Mail: fuat.topuz@rwth-aachen.de

Dr. K. Albrecht, Prof. Dr. J. Groll  
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde und Bayerisches Polymerinstitut (BPI), Universitätsklinikum Würzburg  
Pleicherwall 2, 97070 Würzburg (Deutschland)  
E-Mail: juergen.groll@fmz.uni-wuerzburg.de

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.  
([ ]) Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)  
([ ]) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601983> zu finden.

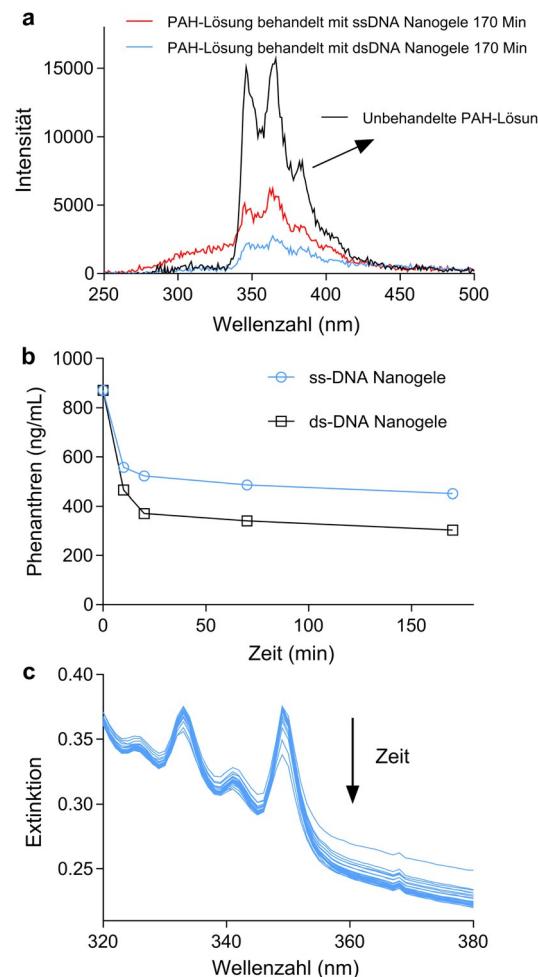


**Abbildung 1.** Syntheseweg und Charakterisierung von DNA-Nanogelen. a) Schema der DNA-Nanogel-Herstellung über eine inverse Mikroemulsion. b) Cryo-REM- und c) TEM-Bilder der DNA-Nanogele aus ds-DNA-Molekülen. d) UV/Vis-Spektren von ds-DNA-Nanogeldispersionen bei ansteigender Nanogelkonzentration mit der zugehörigen Absorptionsänderung bei 260 nm (Einschub).

DNA-Nanogele wurden mit hydrodynamischen Durchmessern im Bereich von 150 nm bis 650 nm und Polydispersitätsindizes (PDI) von 0.2–0.5 erhalten, abhängig von der verwendeten Konzentration an DNA und Quervernetzern (Abbildung S4). Eine Erhöhung des PEG-DGE/DNA-Verhältnisses führte zur Abnahme der Größe durch eine stärkere Quervernetzung, wobei ab einer kritischen PEG-DGE-Konzentration die Größe der Nanogelpartikel konstant blieb. Dieses Verhalten kann einem antagonistischen Effekt der PEGDGE-TEMED-Paarbildung zugeordnet werden (eine detaillierte Diskussion findet sich in den Hintergrundinformationen). Unterstützende Messungen des Zeta-Potentials (Abbildung S3) sowie Untersuchungen zum Circulardichroismus (CD) (Abbildung S4d) zeigen den Erhalt der nativen, rechtshändigen B-Form der DNA-Doppelhelix in den ds-DNA-Gelen. Dagegen führt eine starke Quervernetzung der Gele zur Konformationsänderung der  $\alpha$ -Helix zu einer Spiralstruktur (Abbildung S4d, Einschub).

Die Kapazität zur PAH-Abtrennung durch die DNA-Nanoge wurde durch Auslagerung in Lösungen von Phen-

anthren, Anthracen, Coronen und Perylen mit anschließender fluoreszenzspektroskopischer Messung nach Filtration bestimmt. Wenn nicht anders indiziert, wurden jeweils Nanogelproben mit der Kodierung dsDNA1-1 und ssDNA1-1 in der Studie benutzt. Die initiale Konzentration von Phenanthren (0.871  $\mu$ g/mL) wurde durch die ds-DNA-Nanogele auf 0.304  $\mu$ g/mL und durch ss-DNA-Nanogele auf 0.451  $\mu$ g/mL nach 170 min Einwirkzeit reduziert (Abbildung 2a). Die Einbindung von Phenanthren in die ssDNA-Stränge kann dabei auch auf die Wechselwirkung gestapelter, aromatischen Ringsysteme mit den Nukleobasen sowie die partielle Interkalation in ds-Bereiche im Gel zurückgeführt werden (für eine detaillierte Diskussion siehe die Hintergrundinformationen). Zeitaufgelöste Untersuchungen (Abbildung 2b) zeigten eine quantitative Sättigung innerhalb von Stunden. Allerdings konnte bereits nach nur 15 min eine 50%ige Beladung der ds-DNA-Nanogele erreicht werden. Diese Ergebnisse konnten durch UV/Vis-Spektren (320 bis 380 nm) in



**Abbildung 2.** PAH-Abtrennungseigenschaften der DNA-Nanogelen. a) Fluoreszenzspektren einer Phenanthrenlösung vor und nach Behandlung mit dsDNA- (dsDNA1-1) und ssDNA-Nanogelen (ssDNA1-1) für 170 min. b) Phenanthrenkonzentration als Funktion der Zeit. c) Zeitaufgelöste UV/Vis-Spektren der ds-DNA-Nanogelen nach Phenanthren-Exposition. Alle 2 Minuten wurde jeweils ein Spektrum über den gesamten Wellenlängenbereich aufgenommen.

destilliertem Wasser bei 25°C bestätigt werden (Abbildung 2c). Weiterhin zeigten unsere Daten, dass mit 1 mg DNA-Nanogel 1 L Wasser mit einer potentiell krebsauslösenden, kritischen PAH-Konzentration von  $600 \text{ ng L}^{-1}$  aufgereinigt werden konnte.<sup>[9]</sup>

Die Effizienz der PAH-Abtrennung wurde auch mit Anthracen, Coronen und Perylen anhand von Fluoreszenzmessungen bei der jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlänge überprüft. Abbildung 3 zeigt die Fluoreszenzspektren von PAH-Lösungen vor und nach 10-minütiger Einwirkung der DNA-Nanogele. Für alle PAH-Lösungen zeigten die Nanogele eine gute Aufreinigung bei gleichzeitig kurzer Reaktionsdauer. Die Sorptionskinetik von Phenanthren zu den DNA-Strängen stimmt dabei gut mit einer Kinetik pseudosekundärer Ordnung überein ( $t/q_t$  versus  $t$ ), mit jeweiligen Bindungskonstanten ( $k_2$ ) zwischen 0.39–0.45 ( $\text{g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) in Abhängigkeit der DNA-Konformation in den Nanogelen (Abbildung S6 und Tabelle S3). Der signifikante Abfall der Fluoreszenz war für die Perylenlösungen nach 10-minütiger Einwirkung der DNA-Nanogele auch visuell zu beobachten (Abbildung S5). Die vollständige Entfernung des Phenanthrens wurde bei Erhöhung der DNA-Nanogelkonzentration auf das Doppelte erreicht (Abbildung S7).

CD-Spektren der ds- und ss-DNA-Nanogele (ds- bzw. ss-DNA 1–1, siehe Tabelle S2) mit bzw. ohne Gegenwart von

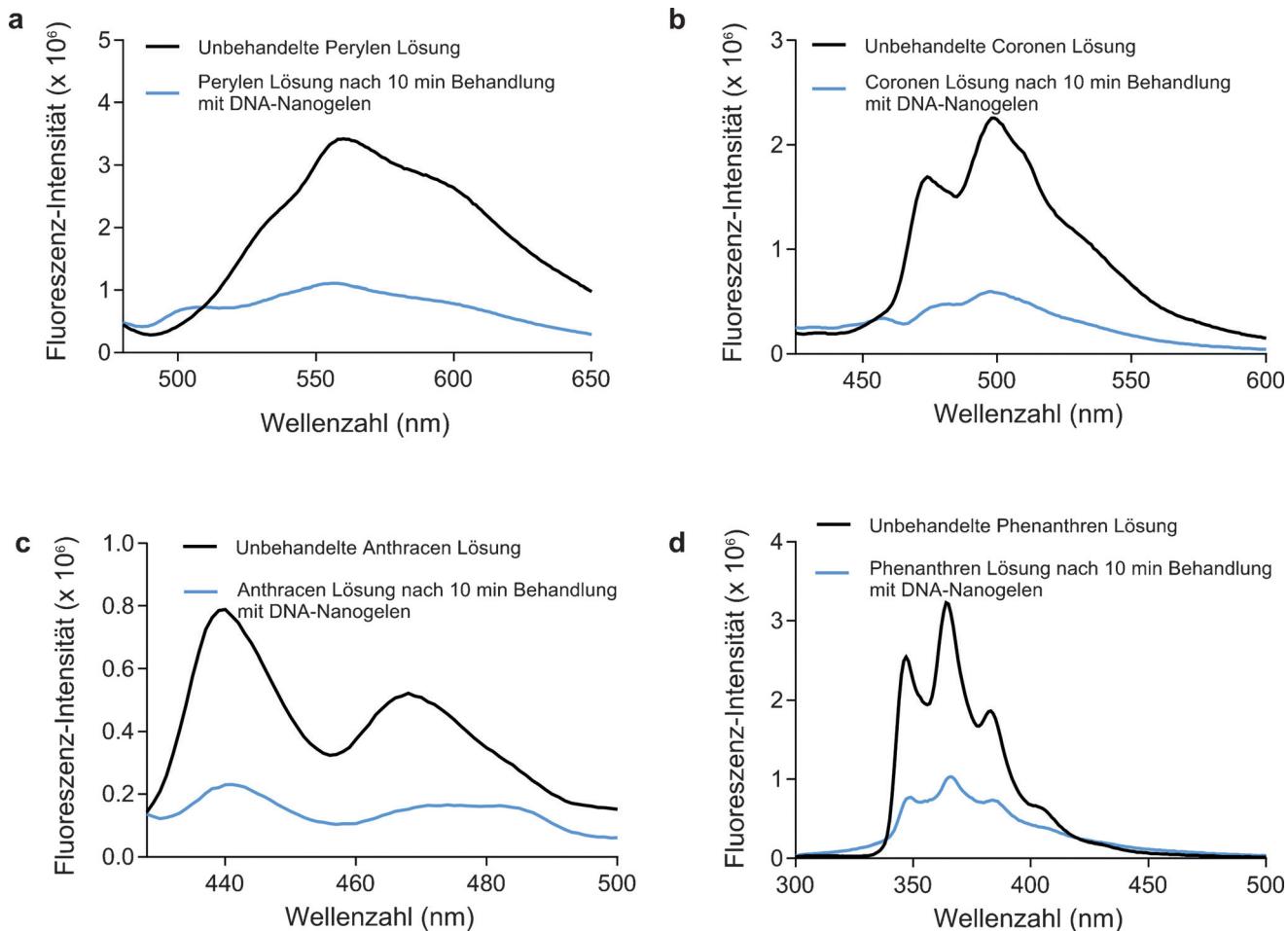
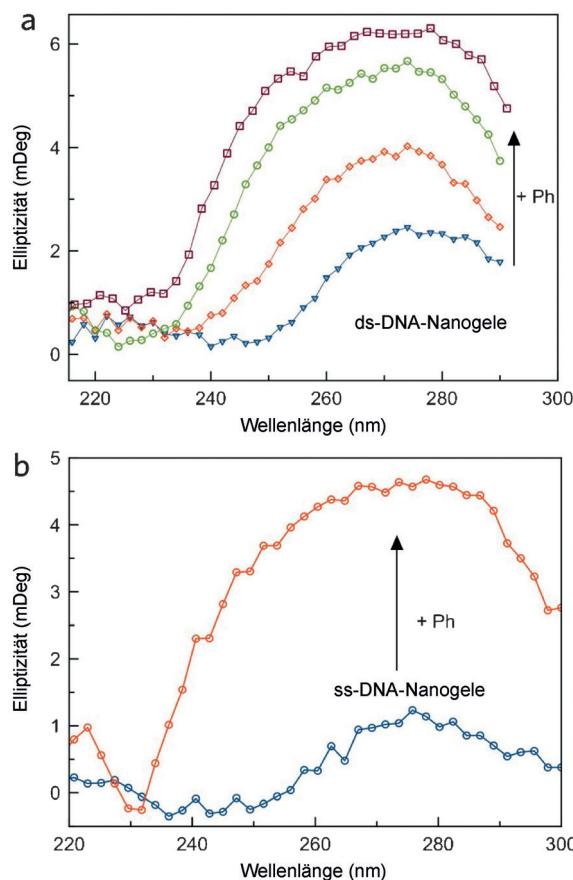


Abbildung 3. Fluoreszenzspektren von PAHs in Konzentrationen von  $\mu\text{g L}^{-1}$  vor und nach Behandlung mit DNA-Nanogelen für 10 min: a) Perylen:  $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ; b) Coronen:  $4.6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ; c) Anthracen:  $2.5 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ ; d) Phenanthren:  $5.6 \mu\text{M}$ .

Phenanthren wurden zur Untersuchung des Abtrennungsmechanismus aufgenommen (Abbildung 4). Das CD-Spektrum der DNA-Nanogele zeigte eine positive Bande bei 277 nm aufgrund der stapelartigen Anordnung der Nukleobasen („Basenstapelung“), was auf den Erhalt der nativen, rechthändigen B-Form der DNA schließen lässt. Nach Zusatz von Phenanthren steigt die Intensität der positiven Bande bei 277 nm ohne Wellenlängenänderung an, was durch eine Zunahme der Basenstapelung erklärt werden kann. Im Vergleich zeigt reines Phenanthren einen positiven Peak geringer Intensität bei etwa 260 nm aufgrund der stapelartigen Arenanordnung, ohne dass sich die Peakintensität mit steigender Konzentration erhöht (Abbildung S8). Die Ergebnisse stützen die These der Interkalation als zugrundeliegenden Mechanismus der PAH-Sorption durch DNA-Nanogele.

Zusammengefasst führt diese Studie eine neue, bioinspirierte und generische Strategie zur PAH-Abtrennung durch DNA-Interkalation mithilfe hydrophiler DNA-Nanogele ein. Im Gegensatz zu bereits bestehenden Strategien beruht unser biomimetischer Ansatz auf einer volumenbasierten Wechselwirkung von PAHs und dem in Wasser gequollenen, nanogelbildenden Netzwerk. Dieser unspezifische, aber auch allgemeingültige Prozess ist effizient und aufgrund der kurzen Diffusionsstrecken in den Nanopartikeln schnell, mit dem Vorteil, dass die verwendeten Nanogele hydrophil, biologisch



**Abbildung 4.** CD-Spektren von a) ds-DNA- und b) ss-DNA-Nanogelen vor und nach Einwirkung von Phenanthren. Die Phenanthrenkonzentrationen sind: a) 1, 3 und 5 µM für die Auslagerung mit dsDNA-Nanogelen und b) 5 µM für die Auslagerung mit ssDNA-Nanogelen. Das untere Spektrum repräsentiert die reinen DNA-Nanogele vor der Inkubation mit Phenanthren.

abbaubar und zytokompatibel sind. Abseits der Anbindung von PAHs haben kürzlich erschienene Studien auch die Möglichkeit zur Entfernung hydrophober Toxine durch DNA vorgeschlagen, die aufgrund der Wechselwirkung mit DNA normalerweise toxisch im Organismus wirken würden.<sup>[18]</sup> Da DNA in der natürlichen Umgebung weitläufig existent ist und auch aus Abfällen wie Fischmilch und den Gonaden von Muscheln gewonnen werden kann, und da wir keinen dominierenden Einfluss der Partikelgröße oder der Dispersität für Proben mit gleichem DNA Gehalt und Konformation gefunden haben (% ssDNA-Anteil), können die Partikel aus billigen Rohstoffquellen mithilfe einfacher und technologisch etablierter Prozesse gewonnen werden. DNA-Nanogele oder DNA-Mikrogele könnten dementsprechend zukünftig nützlich sein, etwa als immobilisierende Matrix in Filtern oder zwischen Membranen, wobei nicht nur die Entfernung von PAHs, sondern ganz allgemein eine Aufreinigung von Trinkwasser von genotoxischen Substanzen denkbar ist.

## Danksagung

F.T. dankt dem Marie Curie ITN Projekt „Hierarchy“ (Fördernummer: PITN-2007-215851) für ein Stipendium. K.A.

und J.G. danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Fördernummer 13N12248 (Projekt „META“)) für finanzielle Unterstützung.

**Stichwörter:** DNA · Interkalation · Nanogele · Toxine · Umweltchemie

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12210–12213  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 12398–12401

- [1] C. A. Menzie, B. B. Potocki, J. Santodonato, *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 1278–1284.
- [2] D. R. Thakker, W. Levin, A. W. Wood, A. H. Conney, D. M. Jerina in *Bioactivation of Foreign Compounds* (Hrsg.: M. W. Anders), Academic Press, **1985**.
- [3] G. P. Pfeifer, M. F. Denissenko, M. Olivier, N. Tretyakova, S. S. Hecht, P. Hainaut, *Oncogene* **2002**, *21*, 7435–7451.
- [4] S. M. Bamforth, I. Singleton, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2005**, *80*, 723–736.
- [5] J. B. Herbstman, D. Tang, D. Zhu, L. Qu, A. Sjödin, Z. Li, D. Camann, F. P. Perera, *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 733–738.
- [6] A. Rundle, C. Richards, C. Neslund-Dudas, D. Tang, B. A. Rybicki, *Environ. Mol. Mutagen.* **2012**, *53*, 384–391.
- [7] K. M. McCarty, R. M. Santella, S. E. Steck, R. J. Cleveland, J. Ahn, C. B. Ambrosone, K. North, S. K. Sagiv, S. M. Eng, S. L. Teitelbaum, A. I. Neugut, M. D. Gammon, *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 552–558.
- [8] P. Boffetta, N. Journeycova, P. Gustavsson, *Cancer Causes Control* **1997**, *8*, 444–472.
- [9] Guidelines for Drinking-Water Quality. World Health Organization, **2004**.
- [10] J. C. Barnes, M. Jurićek, N. L. Strutt, M. Frasconi, S. Sampath, M. A. Giesener, P. L. McGrier, C. J. Bruns, C. L. Stern, A. A. Sarjeant, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 183–192.
- [11] M. T. Butterfield, R. A. Agbaria, I. M. Warner, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1187–1190.
- [12] D. Ceylan, S. Dogu, B. Karacik, S. D. Yakan, O. S. Okay, O. Okay, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 3846–3852.
- [13] F. Brandl, N. Bertrand, E. M. Lima, R. Langer, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7765–7775.
- [14] F. Li, X. Li, X. Liu, L. Zhang, L. You, J. Zhao, H. Wu, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32*, 373–381.
- [15] B. Binkova, I. Chvatalova, Z. Lnenickova, A. Milcova, E. Tuluopova, P. B. Farmer, R. J. Sram, *Mutat. Res.* **2007**, *620*, 49–61.
- [16] Z. Zhang, Y. Yang, D. Zhang, Y. Wang, X. Qian, F. Liu, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6962–6970.
- [17] R. R. Navarro, H. Ichikawa, Y. Iimura, K. Tatsumi, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4240–4245.
- [18] C. Fernández-Solis, Y. Kuroda, A. Zinchenko, S. Murata, *Colloids Surf. B* **2015**, *129*, 146–153.
- [19] F. Topuz, O. Okay, *Macromolecules* **2008**, *41*, 8847–8854.
- [20] F. Topuz, O. Okay, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2652–2661.
- [21] D. Costa, J. Queiroz, M. G. Miguel, B. Lindman, *Colloids Surf. B* **2012**, *92*, 106–112.
- [22] D. Costa, A. J. M. Valente, M. G. Miguel, J. Queiroz, *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 1243–1252.
- [23] Y. H. Roh, J. B. Lee, P. Kiatwuthinon, M. R. Hartman, J. J. Cha, S. H. Um, D. A. Muller, D. Luo, *Small* **2011**, *7*, 74–78.

Eingegangen am 26. Februar 2016,  
veränderte Fassung am 29. Mai 2016  
Online veröffentlicht am 1. September 2016