

University of Groningen

Amphiphilic DNA and its application in biomedicine

Li, Hongyan

DOI:
[10.33612/diss.125274906](https://doi.org/10.33612/diss.125274906)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Li, H. (2020). *Amphiphilic DNA and its application in biomedicine*. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.125274906>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Doorbraken in lipide-DNA, DNA geconjugeerd met hydrofobe eenheden, hebben het bewezen als een veelzijdig functioneel materiaal op veel verschillende gebieden. Het samenspel tussen unieke structurele en chemische eigenschappen van nucleïnezuren en hydrofobiciteit maakt lipide-DNA met nieuwe functionaliteiten mogelijk en verbreedt de toepassing ervan op het gebied van nanotechnologie, diagnostiek en biomedische geneeskunde. In **hoofdstuk 1** werden de huidige staat van DNA-amfifielen synthese en hun assemblage in nanostructuren samengevat. Vervolgens werd een overzicht van de interactie tussen DNA-amfifielen en membranen gegeven, met details over de drijvende krachten en de stabiliteit van deze interactie. Bovendien werd de interactie met celoppervlakken met betrekking tot therapeutica, biologische detectie en celmembraantechniek benadrukt. Ten slotte werden de uitdagingen en vooruitzichten voor deze veelbelovende klasse van DNA-hybride materialen aangepakt.

In **hoofdstuk 2** werd lipide-DNA gesynthetiseerd, 1-dodeceen-gemodificeerde deoxyuridine-nucleotiden opgenomen in standaard DNA-sequenties, en zijn interactie met zowel liposomale als cellulaire membranen werd gepresenteerd. De Förster resonantie-energieoverdracht methode bewees dat dit lipide-DNA zich in liposomale membranen kon ankeren, hetzij in onverzadigde (DOPC:DOPE:cholesterol = 2:1:1) of verzadigde (DPPC:cholesterol = 2:1) liposoom formuleringen. Deze methode gaf ook aan dat liposomaal-membraan verankerd lipide-DNA toegankelijk is voor DNA-hybridisatie. Zelfs wanneer 5% PEG werd opgenomen in de liposoom samenstelling, was lipide-DNA nog steeds met succes verankerd en met hoge efficiënte gehybridiseerd met zijn complementaire streng. Na bevestiging van het vermogen van lipide-DNA om in te verankeren liposomale membranen, daagden we het systeem verder uit om zich in cellulaire membranen te verankeren. Na een korte incubatie met HeLa-cellen drong lipide-DNA snel door in cellulaire membranen en was het membraan-verankerde DNA opnieuw toegan-

kelijk voor hybridisatie met zijn complementaire streng, zoals aangegeven door flowcytometrie metingen. Confocale fluorescentiemicroscopie beelden toonden aan dat complementaire strengen van het lipide-DNA homogeen op het cellulaire membraan waren verdeeld. Dit bewees opnieuw dat het lipide-DNA in het membraan was verankerd. We hebben ook de verankeringsstabiliteit gemeten en vastgesteld dat lipide-DNA gedurende enkele uren stabiel in het membraan is opgenomen. Bij het verhogen van de hydrofobiciteit van het lipide-DNA door het toevoegen van meer gemodificeerde nucleotiden, werd de stabiliteit van de membraanverankering verhoogd. Deze bevindingen suggereerden mogelijke toepassingen van lipide-DNA in biomedische geneesmiddelen, dus werd ons gevraagd de cellulaire biocompatibiliteit ervan te evalueren. We bevonden dat de toxiciteit van lipide-DNA concentratieafhankelijk was, en bij een concentratie van 10 μM was de toxiciteit ervan acceptabel.

In **hoofdstuk 3** werd een snel, efficiënt en gericht liposoomafgiftesysteem gepresenteerd dat werd aangestuurd door DNA-hybridisatie. We hebben cellen en liposomen apart verankerd met lipide-DNA, en vervolgens samen gedurende slechts 15 minuten geïncubeerd. Wanneer lipide-DNA op het liposomale membraan complementair was aan dat op het cellulaire membraan, was cellulaire internalisatie van liposomen 18 keer verhoogd in vergelijking met de niet-gehybridiseerde controle, zoals gekwantificeerd door flowcytometrie. De daarop volgende dynamische studie gaf aan dat liposomen zo snel als in 5 minuten in cellen binnengingen, terwijl voor de niet-gehybridiseerde controle zelfs na 30 minuten geen duidelijke opname kon worden gedetecteerd. Vanwege de hoge specificiteit van DNA-hybridisatie vonden we dat liposomen alleen konden worden afgegeven aan cellen waarvan het membraan vooraf was gelabeld met complementaire lipide-DNA strengen. Wanneer twee soorten liposomen werden gemengd met twee populaties van cellen, richtte nauwkeurige herkenning door DNA-hybridisatie liposomen op de beoogde cellen. Het mechanisme van liposoomafgifte werd ook onderzocht. De opname van liposomen was significant verminderd wanneer internalisatie-experimenten werden uitgevoerd bij lage temperatuur. Dit duidde op een energie-afhankelijk internalisatieproces. Verdere behandeling van cellen met verschillende endocytose-remmers toonde aan dat caveolae-medieerde endo-

cytose de dominante liposoom-internalisatieroute was en scavenger receptoren ook bijdraagden aan de cellulaire opname. Ten slotte onthulde het cellulaire spoor van liposomen en zijn lading het liposoom lot na internalisatie als volgt: liposomen accumuleren eerst op cellulaire membranen door DNA-hybridisatie. Met behulp van caveolae en scavenger receptoren komt het vastgebonden liposoom het cellulaire endosoom binnen. Zodra het lysosoom is bereikt, worden liposomen afgebroken en wordt de lading vrijgegeven. Nadat we hadden bevestigd dat DNA-hybridisatie liposoomhechting aan het celmembraan kon bevorderen en cellulaire internalisatie kon verbeteren, hebben we verder onderzocht om deze methode te veralgemenen van liposomen naar andere soorten nanodeeltjes. Daarom werd in **hoofdstuk 4** een eenvoudige DNA-nanostructuur, d.w.z. een DNA-tetraëder, bekleed met vrije overhangen. Wanneer geïncubeerd met HeLa-cellen welke vooraf verankerd waren met lipide-DNA, werd een significante hoeveelheid cellulair DNA-tetraëder waargenomen terwijl voor niet-gehybridiseerde controles geen duidelijke internalisatie werd gedetecteerd. Flowcytometrie resultaten kwamen overeen met deze verbeterde opname, die wel 100 keer zo hoog was. Bovendien werd bevonden dat de internalisatie van DNA-tetraëder concentratieafhankelijk was. Een incubatie-tijdreeks van DNA-tetraëder met groeimedium gaf de structurele stabiliteit aan, wat betekent dat het stabiel is tot 5 uur. We hebben ook 13 nm AuNP's geconjugerd met oligonucleotiden op het oppervlak gesynthetiseerd. Net als voor de DNA-tetraëder, werd de AuNP-internalisatie verhoogd met behulp van oppervlakte DNA-hybridisatie, zoals bevestigd door donkerveldmicroscopie. Om verder te bevestigen dat deze DNA-hybridisatiemethode zou kunnen worden toegepast als een algemene manier om de opname van nanodeeltjes te verhogen, werd een ander type nanodeeltje, d.w.z. polystyreen nanodeeltjes, ook gemodificeerd met vrije oligonucleotiden en werd de cellulaire internalisatie ervan bestudeerd. We hebben ontdekt dat DNA-hybridisatie ook de opname van dit type nanodeeltjes in de cel kan bevorderen.

Afgezien van het inbrengen van zijn hydrofobe-einde in membranen, kan het DNA-segment van lipide-DNA worden ontworpen om biologisch functioneel te zijn. In **hoofdstuk 5** werd lipide-DNA met een CpG-sequentie gesynthetiseerd. Het kan ofwel zelfassembleren in nano-formaat micellen om een immunosti-

mulerende micel te vormen, of zich in liposomale membranen voegen om een immunostimulerend liposoom te vertegenwoordigen. Om hun immunostimulerende effecten te vergelijken met conventionele nanodeeltjes, werden 13 nm AuNP's met geconjugeerde CpG-sequenties ook gesynthetiseerd. Deze drie soorten nanodeeltjes werden in muizen geïnjecteerd en hun dendritische celactiveringsvermogen werd geëvalueerd. Er werd bevonden dat immunostimulerende micellen het beste presteerden en effectief immuunactivatie konden bevorderen, zoals aangegeven door verhoogde expressie van co-stimulerende moleculen en secretie van ontstekingsbevorderende cytokinen.