

University of Groningen

Functionalization of DNA by electrostatic bonding

Chen, Wei

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:

2019

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

Citation for published version (APA):

Chen, W. (2019). *Functionalization of DNA by electrostatic bonding*. University of Groningen.

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

Functionele nanostructuren hebben de evolutie van de velden van nanowetenschap en nanotechnologie gestimuleerd, door het fabriceren van ongekende architecturen van het moleculaire niveau, om materialen met nieuwe eigenschappen in de macroscopische wereld te bereiken. Op deze gebieden hebben biomacromoleculen, d.w.z. eiwitten, DNA en hun assemblages, zoals virussen, vanwege hun inherente 3D-structuren, enorme aandacht getrokken om hun biologische functie om te zetten in toepasbare materialen in technologische systemen. Er zijn pogingen ondernomen om hun slechte structurele stabiliteit te overwinnen in afwezigheid van een waterige omgeving en ze in hoge concentratie te handhaven tijdens productieprocessen. Door een dubbelstrengs (ds) DNA-surfactant complex te mengen in organische fase met een NLO-actieve kleurstof en een tweede kleurstof, Disperse Red 1, zijn tweed orde niet-lineaire optische (NLO) materialen ^[1] en elektro-optische golfgeleider modulatoren ^[2] met succes gefabriceerd. De dsDNA-lipide film werd gegoten van de organische oplossing, dat anisotroop elektrisch geleidingsvermogen vertoonde, als gevolg van het basenpaar stapelen. ^[3] De algemene benadering is om deze biologische entiteiten te complexeren met moleculen die tegengesteld geladen zijn, zoals oppervlakreactieve stoffen en polymeren, om de aggregatie te minimaliseren en hun natuurlijke conformatie te behouden. Tegelijkertijd maakt de vorming van complexen gemakkelijke verwerking van de biomacromoleculen mogelijk.

In **hoofdstuk 1** zijn twee manieren uit de literatuur geïntroduceerd om biomacromolecuulcomplexen te vormen door elektrostatische interacties. Een manier daarvan is door ionenuitwisseling met geladen polyethyleenglycol (PEG) delen in een waterige oplossing. Een andere manier is coöperatieve precipitatie. Oplosmiddelvrije nucleïnezuur-, eiwit- en virus-PEG-complexen werden verkregen als vloeistoffen bij kamertemperatuur met intacte structuren en vertoonden een goede oplosbaarheid in gebruikelijke organische oplosmiddelen, zodat hun biologische functies in watervrije

toestand werden bewaard en de materialen konden worden verwerkt in organische fase. Coöperatieve precipitatie maakte de complexatie mogelijk tussen biomacromoleculen en kationische lipiden op een stoichiometrische manier. De eigenschappen van de verkregen complexen, zoals faseovergangstemperatuur en compacte ordening, kunnen worden afgestemd door de structuur en alkylketenlengte van lipiden te veranderen. Hoewel er twee benaderingen zijn ontwikkeld, heeft elk daarvan een aantal tekortkomingen. De ionenuitwisseling vereist een te grote hoeveelheid liganden en tijdrovende dialyse om een redelijke complexeringsgraad te bereiken. De coöperatieve precipitatie is alleen van toepassing op bepaalde kationische lipiden met alifatische staarten met 8 tot 16 koolstofatomen. Om de keuzes van lipiden te verbreden, hebben we in **hoofdstuk 2** een tweestaps methode ontwikkeld om functionele lipiden zoals π -systemen op DNA te introduceren. Wateroplosbaar 4- (hexyloxy)anilinium (ANI) werd gesynthetiseerd als een sleutel ingrediënt om DNA uit de waterige fase te precipiteren en vervolgens oplosbaar te maken in de organische fase, waarbij ANI vervolgens kan worden uitgewisseld voor een meer hydrofoob van amine verkregen surfactant. We hebben aangetoond dat deze methode volledige uitwisseling van de surfactant oplevert en de modificatie van DNA met hydrofobe primaire, secundaire en tertiaire alkylamines mogelijk maakt. Zelfs een amine afgeleid van aromatisch terthiofeen werd met succes gecomplexed met DNA, door op deze manier een rechtshandige helix aan te nemen als een resultaat van gecomplexed te zijn met het DNA-molecuul. Uitgaande van dergelijke architecturen met aromatische moleculen, werd een op DNA gebaseerd lichttoogststelsel gefabriceerd door complexeren met van amine afgeleide pyreneenheden, die licht absorberen bij 350 nm en vervolgens de energie langs het DNA naar een chromofor overbrengen aan het uiteinde van de DNA-streng om fotonen uit te zenden bij 610 nm.

In hoofdstuk 3 hebben we de tweestaps lipide-uitwisselingsmethode toegepast op negatief geladen gesulfateerde cyclodextrine (CD). CD werd gecomplexed met ANI

in waterige oplossing en vervolgens onderworpen aan de uitwisseling van tris[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]amine in organische fase. Volledig gesulfateerde gesubstitueerde α -cyclodextrine en β -cyclodextrine (α - en β -volledige-CD), evenals heptakis(6-O-sulfo)- β -cyclodextrine (β -half-CD) werden vervaardigd in complexen die vloeidend eigenschappen vertonen bij kamertemperatuur. De viscositeit en overgangstemperaturen van de complexen variëren van -5 tot 22 °C en nemen toe in de volgorde van β -volledige CD < α -volledige CD < β -half-CD. Ze zijn allemaal thermisch stabiel tot 220°C en gedragen zich als kamertemperatuur CD ionische vloeistof. De holte van CD werd gehandhaafd om gastmoleculen zoals pyreen op te nemen. De succesvolle opname werd aangetoond door de fluorescentieverandering van pyreen voor en na menging met CD- ionischevloeistoffen. Deze vondst duidde op de opname van pyreen in de hydrofobe holte van CD- ionischevloeistoffen.

In **hoofdstuk 4** hebben we deze lipiden uitwisselingsmethode toegepast op complexe amine-afgeleide PEG's met DNA. Als een standaardprocedure werd eerst ANI toegepast om DNA uit de waterige fase te precipiteren en werd vervolgens onderworpen aan de verplaatsing van PEG's met MW 350, 500, 750, 1000 en 1500 Dalton in organische fase. Hieruit kwam, dat alleen de eerste vier met succes elektrostatisch kunnen worden geïntroduceerd op DNA met DNA-PEG-complexen vormend. De complexen werden gekarakteriseerd door NMR, UV/Vis en CD spectroscopie. Het MW van DNA-PEG-complexen werd verder bestudeerd via GPC gekoppeld aan statische lichtverstrooiing, hetgeen aantoonde dat de substitutiegraad van PEG alleen volledige omzetting kan bereiken wanneer laagmolecuulgewicht PEG met een massa van 350 Da wordt gebruikt. De substitutiegraad daalde geleidelijk tot 30% wanneer de MW van de PEG's werd verhoogd tot 1000 Da.

In **hoofdstuk 5** werd een nieuwe generatie van lipiden uitwisselingsmethoden ontwikkeld op basis van een vergelijkbaar werkingsprincipe als de vorige. Dit maakte de introductie mogelijk van quaternaire ammoniumverbindingen op negatief geladen

DNA door elektrostatische interacties. ANI werd gebruikt om DNA uit waterige fase te precipiteren. Daarna werd het vervangen door quaternaire ammoniummoleculen die acetylacetaat als tegen ion bevatten. Dit uitwisselingsproces kan worden gerealiseerd, omdat de geconjugeerde base van acetylacetaat erg sterk is, waardoor een proton van ANI kan worden geabstraheerd. Als gevolg wordt ANI neutraal en aanvaardt acetylacetaat het proton om het neutrale diketon te vormen. Het positief geladen quaternaire ammonium bindt vervolgens elektrostatisch met de negatief geladen fosfaatgroepen van DNA met nieuwe DNA-complexen vormend. (Polyethyleenglycol) trimethylammonium (TMA-PEG) en tetra-alkylammonium verbindingen werden op deze wijze op DNA geïntroduceerd en werden grondig gekarakteriseerd. Bovendien werd de stabiliteit van het DNA-TMA-PEG750-complex vergeleken met DNA-PEG-complexen gemaakt in hoofdstuk 4 in verschillende bufferoplossingen, waaruit bleek dat quaternair ammonium kwetsbaarder is voor ionenverplaatsing dan de primaire amine PEG's, vanwege de lage bindingsconstante van quaternair ammonium aan fosfaatgroepen.

Samenvattend, twee nieuwe uitwisselingsmethoden zijn ontwikkeld om een grote verscheidenheid van kationische groepen als tegenionen aan de anionische DNA-backbone te introduceren. De omvang van tegenionen varieert van aminen die lange niet in wateroplosbare alkylketens dragen, amines met n-systemen tot quaternaire ammoniumgroepen die een proton missen in het stikstofcentrum. Verder werden kleine moleculen met een laag molecuulgewicht gecomplexeerd met DNA tot polymeren met een molecuulgewicht van meer dan 1,5 KDa. Het laatste type moleculen leidt tot DNA-flessenborstelstructuren. Verwacht wordt, dat de nieuwe methoden die in dit proefschrift worden geïntroduceerd, invloed hebben op DNA dat wordt gebruikt in technische toepassingen of op het gebied van de biogeneeskunde. Voor het laatste toepassingsveld werden nucleïnezuren vaak covalent gefunctionaliseerd met PEG om hun degradatie door nucleasen in biologische media te vertragen. De nieuwe elektrostatisch gebonden DNA-PEG-hybriden kunnen leiden

tot een verhoging van de stabiliteit van het nucleïnezuurgedeelte. Bewerkelijke chemische functionalisering van het DNA zou daardoor kunnen worden vermeden en tegelijkertijd zou de nieuwe elektrostatische functionalisering strategie nucleïnezuurmedicijnen kunnen helpen effectiever te zijn.

Referenties

1. Wanapun, D., Hall, V. J., Begue, N. J., Grote, J. G., Simpson, G. J., *ChemPhysChem*, **2009**, *10*, 2674.
2. Heckman, E. M., Grote, J. G., Hopkins, F. K., Yaney, P. P., *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 181116.
3. Okahata, Y., Kobayashi, T., Tanaka, K., Shimomura, M., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6165.

