

Diss. ETH No. 20689

# **Dendronized Polymers and Enzymes: A Molecular Hybrid Structure**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Andrea Grotzky

M.Sc. Chemistry, ETH Zurich

born January 15<sup>th</sup>, 1983

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. Dieter Schlüter, examiner

Prof. Dr. Peter Walde, co-examiner

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, co-examiner

Prof. Dr. Viola Vogel-Scheidemann, co-examiner

Zurich 2012

---

## **Abstract**

---

Polymer-protein conjugates are synthetic hybrid structures of polymers and proteins that combine the properties of both the polymer as well as the protein within one macromolecule. A special case are polymer-enzyme conjugates, in which the protein is an enzyme, a biomacromolecule that is able to catalyze a chemical reaction.

The aim of the work presented was to synthesize water-soluble molecular hybrid structures of polycationic polymers and enzymes that have a defined architecture consisting of a *single linear polymer backbone* to which *multiple copies of two different types of enzymes* are bound. Due to its vast number of available reactive groups on its periphery and its increased thickness and rigidity compared to conventional linear polymers, water-soluble dendronized polymers (denpols) were utilized. The two model enzymes horseradish peroxidase (HRP) and superoxide dismutase (SOD) were chosen because of their compatibility and ability to catalyze two steps of a cascade reaction. These enzymes were bound to first, second and third generation denpols *via* stable, covalent bis-aryl hydrazone (BAH) bonds which were formed upon reaction of polymer-bound aromatic hydrazines (HyNic) with a benzaldehyde moiety (4FB) incorporated into the enzyme. Since the newly formed BAH bond has a characteristic absorption band in the UV/Vis region with an absorption maximum at 354 nm, ( $\epsilon_{354\text{nm}} = 29,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) it was not only possible to follow the kinetics of the ligation reaction but also to quantify the number of bonds formed. This in turn made possible to easily obtain the number of enzymes bound to the denpol.

The desired hybrid structures were obtained by consecutive addition of first HRP and then SOD to a fluorescein (FL)-labeled denpol. On average a single dendronized polymer chain of 2000 repeating units carried 20 FL, 120 HRP and 60 SOD molecules, i.e. a molar ratio of HRP/SOD of 2:1. It was also possible to alter this ratio to 1:1 and 1:2. The conjugates were then purified by ultrafiltration, a method whereby free unconjugated enzymes were filtered through a membrane. With size exclusion chromatography it was proven that the hybrids did not contain free enzymes so that the enzymatic activity measurements that were carried out

in the following truly reflected the activity of denpol-bound enzymes. The chosen enzyme model system allowed the measurement of both the individual activities as well as the two step cascade reaction. For the first generation denpol hybrid the activities of both HRP and SOD were fully preserved such that the cascade reaction conducted with the hybrid was similarly efficient as a mixture of free enzymes. The second and third generation hybrids were found to be less efficient. Moreover, the synthesized hybrid structures could be visualized by atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM) as single molecular objects.

In summary, the results clearly show that a new class of polymer-biohybrids, whereby a single polymer chain carried multiple copies of two different types of enzymes, was synthesized. The dendronized polymers served as a macromolecular linking unit to bring the enzymes in close proximity. In terms of residual enzymatic activity the first generation denpol-enzyme hybrid turned out to be best. Moreover, the usefulness of the bis-aryl hydrazone linking chemistry as a mild, chemoselective, efficient, fast, controllable and quantifiable ligation method was demonstrated. It is expected that this outstanding but currently rather unknown BAH ligation will gain in popularity.

These results open the door to eventually perform enzymatic cascade reactions in confined geometries, e.g. femtoliter-sized compartments and vesicles. Since all enzymes are bound to one and the same polymer chain in a desired ratio and composition, the entrapment of different types of enzymes at a defined ratio within one and the same compartment is no longer unreasonable when using the hybrid. For statistical reasons this is unlikely to obtain with a mixture of free enzymes.

To further look into this matter a first generation denpol-HRP hybrid was encapsulated in giant vesicles of about 10  $\mu\text{m}$  in diameter. First results obtained by confocal fluorescence microscopy and enzymatic activity measurements showed that it was possible to entrap the hybrid which was also able to catalyze a reaction, which is not trivial at all.

---

## Zusammenfassung

---

Polymer-Protein Konjugate sind synthetische Hybrid-Strukturen, die aus Polymeren und Proteinen bestehen und die die Eigenschaften des Polymers und des Proteins in einem Makromolekül vereinen. Ein Sonderfall sind Polymer-Enzym Konjugate, bei denen das Protein ein Enzym ist. Enzyme sind Biomakromoleküle, die in der Lage sind chemische Reaktionen zu katalysieren.

Diese Arbeit hatte die Herstellung von wasserlöslichen, molekularen Hybrid-Strukturen zwischen polykationischen Polymeren und Enzymen zum Ziel, welche eine klar definierte Architektur besitzen: eine *einzelne* Polymerkette sollte dabei eine *hohe Anzahl von zwei verschiedenen Enzymen* tragen. Aufgrund der ungewöhnlich grossen Anzahl an reaktiven Gruppen an ihrer Oberfläche und wegen ihrer erhöhten Steifigkeit wurden dendronisierte Polymere verwendet. Als Modellenzyme dienten Meerrettich Peroxidase (HRP) und Superoxid Dismutase (SOD), welche zusammen in der Lage sind zwei Stufen einer Kaskadenreaktion zu katalysieren. Diese Enzyme wurden über stabile, kovalente Bis-Aryl Hydrazonbindungen (BAH) an dendronisierte Polymere der ersten, zweiten und dritten Generation gebunden, indem ein mit einem Benzaldehyd (4FB) versehenes Enzym mit einem Polymer, welches mit aromatischen Hydrazinen (HyNic) modifiziert wurde, zur Reaktion gebracht wurde. Die bei der Reaktion entstehende Hydrazonbindung hat eine charakteristische Absorptionsbande im UV/Vis-Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 354 nm ( $\epsilon_{354\text{nm}} = 29,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Dadurch war es nicht nur möglich die Kinetik der Konjugationsreaktion mitzuverfolgen, sondern auch die Anzahl der gebundenen Enzyme schnell und einfach zu quantifizieren.

Die gewünschten Hybrid-Strukturen wurden mittels aufeinander folgender Addition der beiden Enzyme zum dendronisierten Polymer hergestellt. Zuerst wurde die HRP dann die SOD an die zuvor fluoreszenz-markierte Polymerkette gehängt, welche dann im Durchschnitt 20 Fluoreszein-, 120 HRP- und 60 SOD-Moleküle pro 2000 Wiederholungseinheiten trug. In diesem Fall betrug das Molverhältnis der beiden Enzyme HRP und SOD 2:1. Durch Anpassung

der Reaktionsbedingungen konnte dieses Verhältnis in 1:1 und 1:2 geändert werden. Die Konjugate wurden anschliessend mit Ultrafiltration aufgereinigt, wobei die freien, nicht konjugierten Enzyme über eine Membran abfiltriert wurden. Mittels Grössenausschlusschromatographie wurde bewiesen, dass das Konjugat keine freien Enzyme mehr enthielt. Im Nachfolgenden wurden sowohl die einzelnen Enzymaktivitäten der beiden Enzyme als auch deren Kaskadenreaktion untersucht. Die Aktivitäten der Enzyme, die an das dendronisierte Polymer der ersten Generation gebunden wurden, konnten vollständig erhalten werden, so dass die Kaskadenreaktion ähnlich effizient war wie die einer Mischung der freien Enzyme. Die Aktivitäten der Konjugate mit zweiter und dritter Generation hingegen nahmen ab. Zudem wurden die Hybrid-Strukturen mit dem Rasterkraft- und dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht, wobei einzelne Hybridmoleküle beobachtet wurden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine neue Art von Polymer-Biohybriden hergestellt wurde, wobei *auf ein und derselben Polymerkette eine hohe Anzahl von zwei verschiedenen Enzymen* gebunden war. Das Polymer diente als ein makromolekulares Verbindungsstück um viele Enzyme in räumliche Nachbarschaft zu bringen. Ausserdem wurde die Nützlichkeit der Bis-Aryl Hydrazonbindung bewiesen, da sie chemoselektiv, schnell, effizient und unter milden Bedingungen kontrolliert hergestellt werden konnte. Wahrscheinlich wird sich diese bis dato eher unbekannte Ligationsmethode in Zukunft grösserer Beliebtheit erfreuen.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird es in Zukunft möglich sein, definierte Reaktionssysteme mit einem bestimmten Verhältnis von Enzymen in femtoliterkleine Kompartemente und Vesikel einzuschliessen. Dies mit einer Mischung aus freien Enzymen zu erreichen ist statistisch gesehen unwahrscheinlich.

Auch in diese Richtung wurden erste Versuche unternommen. Dabei wurde ein Konjugat bestehend aus einem dendronisierten Polymer der ersten Generation und mehreren HRP- und FL-Molekülen in Riesenvesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 10  $\mu\text{m}$  eingeschlossen. Mit Hilfe von Enzymaktivitätsmessungen und dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurde gezeigt dass das Hybrid eingeschlossen werden konnte und dass es in der Lage war eine Reaktion zu katalysieren.