

# Dynamische 3D-Musterung biochemischer Auslösereize durch photoinduzierte bioorthogonale Reaktionen\*\*

L. Andrew Lee und Qian Wang\*

Hydrogele · Klick-Chemie · Musterbildung ·  
Photolithographie

Im Gebiet der Gewebe- und Organregeneration ist die möglichst naturgetreue Nachbildung der zellulären Mikroumgebung von entscheidender klinischer Bedeutung. Lebendes Gewebe ist ein komplexer Zusammenschluss von Zellen, die in eine extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet sind. Bei der ECM handelt es sich um ein hierarchisch organisiertes Hydrogel, das aus Polysacchariden und Proteinen mit spezifischen biochemischen und biomechanischen Funktionen besteht.<sup>[1]</sup> Die gezielte Steuerung der dreidimensionalen (3D) Mikroumgebung von Zellen ist aber nicht nur für die Gewebezüchtung von Bedeutung, sondern bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Zellen in biologisch relevanteren Systemen untersuchen zu können. Wissenschaftler haben sich diesen Aspekten mit raffinierten Modellen genähert, indem sie Materialien mit zellbiologischen Konzepten kombiniert haben, um so spezifische zelluläre Funktionen mit kontrollierbaren Auslösereizen zu verknüpfen.<sup>[2]</sup> Beispiele für solche Reize sind Zelladhäsionsliganden, Zytokine/Wachstumsfaktoren, mechanische Eigenschaften des Substrats (d.h. Steifigkeit, Porosität), der Übergang von 2D- zu 3D-Architekturen und viele weitere Varianten, die in diversen Zelltypen untersucht wurden.

Die Einführung von 3D-Materialien ebnete den Weg zu einem besseren Verständnis von Zellen, allerdings traten auch bald die Einschränkungen dieser Materialien klar hervor. Ein typisches System besteht aus einer statischen Architektur mit festgelegten Auslösereizen, etwa einem Netzwerk aus elektrogenesponnenen Fasern oder einem porösen Hydrogel mit willkürlich verteilten bioaktiven Molekülen.<sup>[2–4]</sup> In den meisten Fällen besitzen diese bisherigen Systeme ein schlecht definiertes räumliches Muster der biologischen Komponenten. Eine ideale Gelmatrix sollte hingegen den dynamischen Eigenschaften der Zellen und ihrer Mikroumgebung Rechnung tragen. Demzufolge wäre eine Gelstruktur, die sowohl über eine hohe räumliche Auflösung als auch über eine genaue zeitliche Kontrolle der Auslösereize verfügt, von

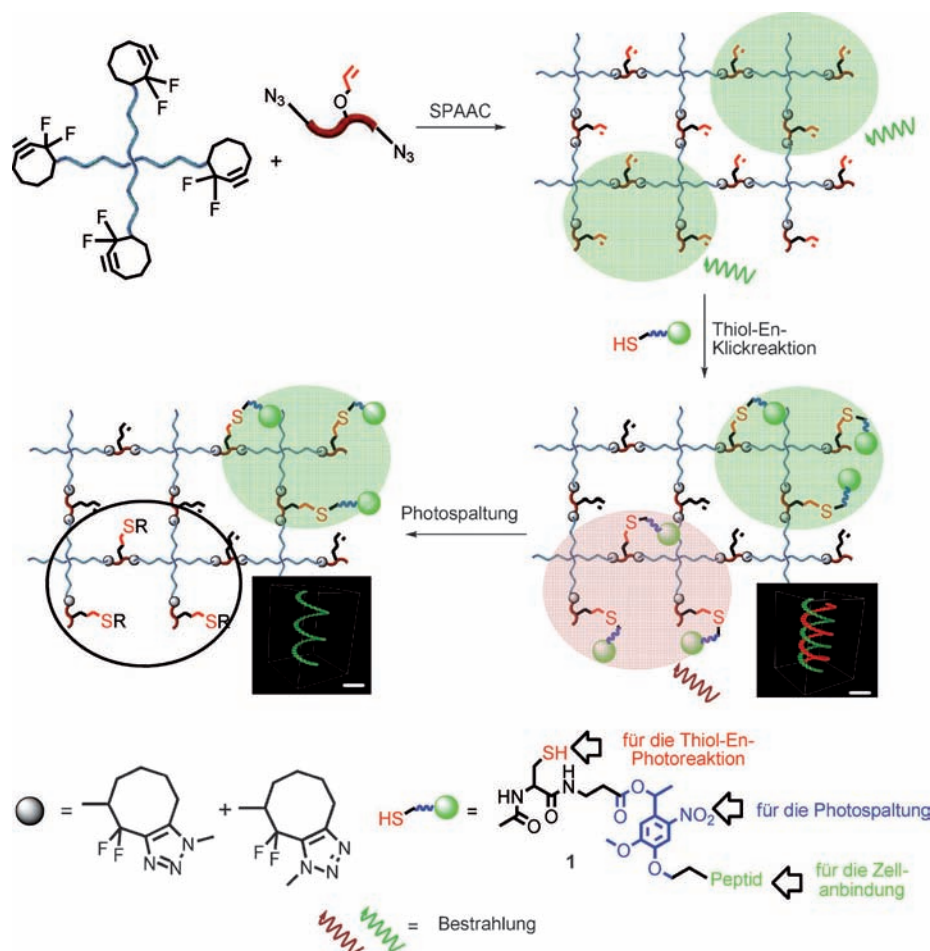
großem Nutzen, um das Verhalten von Zellen in einem dynamischen Netzwerk zu untersuchen.

DeForest und Anseth konnten nun zeigen,<sup>[5]</sup> dass eine dreidimensionale räumliche Musterung der Hydrogelmatrix mithilfe bioorthogonaler Photoreaktionen zum Anbringen und Abspalten funktioneller Gruppen realisiert werden kann. Das Vorgehen ermöglicht eine dynamische Kontrolle des perizellulären Raums und die Untersuchung der Antwort von Zellen auf biochemische Veränderungen in ihrer lokalen Umgebung. Die Verwendung von Multiphotonenchemie zur 3D-Immobilisierung von Proteinen oder anderen Signalmotiven wurde zuvor bereits durch andere Gruppen beschrieben.<sup>[6,7]</sup> DeForest und Anseth haben diese Strategie aber durch die Kombination von drei bioorthogonalen chemischen Prozessen entscheidend weiterentwickelt (Abbildung 1). Im ersten Schritt verwenden die Autoren eine strangvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC; strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) zur Bildung des Hydrogels.<sup>[8]</sup> Die als Vernetzer dienende Bis(azido)-Verbindung weist eine Alkenylfunktion auf, die eine Thiol-En-Klickreaktion<sup>[9]</sup> zur Einbindung des zellbindenden Peptids in das Hydrogelnetzwerk eingehen kann. Jedes Peptid trägt außerdem einen photospaltbaren *o*-Nitrobenzylether, über dessen Abspaltung eine räumlich-zeitliche Kontrolle über die Liganden erreicht wird. Die Anwendung von zwei Klick-Prozessen, d.h. der SPAAC- und der Thiol-En-Reaktion, in Verbindung mit einem multifunktionellen molekularen Design bietet einen raffinierten Ansatz zur Untersuchung eines breiten Spektrums bioaktiver Motive mit guter räumlich-zeitlicher Kontrolle.

Des Weiteren wurde dieser Prozess genutzt, um lineare oder exponentielle Gradienten zellbindender Einheiten mithilfe eines benutzerdefinierten Gradienten der Lichteinstrahlung zu erzeugen. Solche funktionell regulierbaren Materialien mit der Möglichkeit räumlich-zeitlicher Kontrolle bieten leistungsfähige Verfahren zur Untersuchung vieler biologischer Prozesse, wie z.B. der Richtung des retinalen Neuronenauswuchses oder des Knochen-Muskel-Kontakts mit Sehnen- oder Bänderregeneration.<sup>[10,11]</sup> Das Konzept der positionellen Information, dass also eine Zelle ihre Position im Gradienten „kennt“ und ihre weitere Entwicklung festlegt, kann mit dem von DeForest und Anseth beschriebenen 3D-Modell weiter ausgearbeitet werden. Vollzieht z.B. eine Zelle einen Positionswechsel (z.B. wenn das Band vom Knochen zum Muskel übergeht), so folgen die umgebenden

[\*] Dr. L. A. Lee, Prof. Q. Wang  
Department of Chemistry & Biochemistry, University of South Carolina, Columbia, SC 29208 (USA)  
E-Mail: wang@mail.chem.sc.edu

[\*\*] Wir danken der NSF (CHE-0748690) und dem U.S. Army Research Office (DoD-W911NF-09-1-0236) für die finanzielle Unterstützung unserer Forschungen. Q.W. ist Robert L. Sumwalt-Professor an der University of South Carolina.



**Abbildung 1.** Synthesansatz mit drei bioorthogonalen Reaktivitäten. Das Hydrogelnetzwerk wird durch strangvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) zwischen Polyethylenglycol mit Difluorcyclooctin-Endgruppen und Bis(azido)-Crosslinkern gebildet. Diese Ankerpunkte (gekennzeichnet durch graue Kreise und eine rot hervorgehobene Linie) enthalten außerdem eine überhängende Alkenylgruppe für die photoinduzierbare Thiol-En-Reaktion, die bioaktive Liganden regioselektiv fixiert. Der Ligand **1** trägt eine reaktive Sulfhydrylgruppe (rot) für die Thiol-En-Reaktion und eine biologisch relevante fluoreszierende Peptidgruppe (grün), die über einen photospaltbaren *o*-Nitrophenylether (blau) gebunden ist. Um die chemische Selektivität und räumliche Auflösung zu demonstrieren, werden zwei unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Liganden (rot und grün) durch Thiol-En-Reaktion in einer helicalen Anordnung positioniert (Einschub unten rechts). Die Liganden mit rot fluoreszenzmarkierten Peptidkonjugaten werden durch die Spaltung der *o*-Nitrobenzylgruppe selektiv entfernt, sodass nur die Liganden mit dem grünen Fluorophor zurückbleiben (Einschub unten links).

Signaleinheiten spezifischen Gradienten und Mustern des natürlichen Gewebewachstums oder sogar der embryonalen Entwicklung.<sup>[12,13]</sup> Bei Verwendung statischer 3D-Matrizen würden die Zellen in einer einzigen artifiziellen Entwicklungsstufe verharren, solange bioaktive Signale nicht zeitlich und räumlich verändert werden können. Mit der räumlich-zeitlichen Steuerung könnten Moleküle „zur rechten Zeit am rechten Ort“ und möglicherweise mit der richtigen Konzentration zur Erkennung der Schwellenwerte zur Auslösung der Signalerkennung positioniert werden.

Das hier beschriebene System führt In-vitro-Experimente einen Schritt näher an physiologisch relevante Systeme heran. Die Eleganz des von DeForest und Anseth beschriebenen Systems rührt von der einfachen Chemie her, die sich sogar in einer lebenden Zelle ausführen lässt. Diese Ansätze sollten uns letztlich helfen, „intelligenter“ Biomaterialien zu entwerfen, um damit ein besseres Verständnis der Wechselwir-

kungen zwischen Zellen und ihrer Mikroumgebung zu erlangen.

Eingegangen am 17. Januar 2012

Online veröffentlicht am 29. Februar 2012

- [1] A. Atala, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, 20, 575–592.
- [2] L. Wu, J. Zang, L. A. Lee, Z. Niu, G. C. Horvath, V. Braxton, A. Cahyo Wibowo, M. A. Bruckman, S. Ghoshroy, H.-C. zur Loye, X. Li, Q. Wang, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 8550–8557.
- [3] T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 13–22.
- [4] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 47–55.
- [5] C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Angew. Chem.* **2012**, DOI: 10.1002/ange.201106463; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, DOI: 10.1002/anie.201106463.
- [6] M. S. Hahn, J. S. Miller, J. L. West, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 2679–2684.

- [7] R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 799–806.
- [8] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [9] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1584–1617; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.
- [10] A. Seidi, M. Ramalingam, I. Elloumi-Hannachi, S. Ostrovidov, A. Khademhosseini, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1441–1451.
- [11] V. A. Wallace, *Stem Cells* **2011**, *29*, 412–417.
- [12] J. B. Gurdon, P. Y. Bourillot, *Nature* **2001**, *413*, 797–803.
- [13] S. MacArthur, X.-Y. Li, J. Li, J. B. Brown, H. C. Chu, L. Zeng, B. P. Grondona, A. Hechmer, L. Simirenko, S. V. E. Keränen, D. W. Knowles, M. Stapleton, P. Bickel, M. D. Biggin, M. B. Eisen, *Genome Biol.* **2009**, *10*, R80.

## Neugierig?



Sachbücher von WILEY-VCH

MICHAEL GROß

### Der Kuss des Schnabeltiers

und 60 weitere irrwitzige Geschichten  
aus Natur und Wissenschaft

ISBN: 978-3527-32490-3

September 2009 278 S. mit 26 Abb.

Gebunden € 24,90

Groß berichtet von winzigen „Bärtierchen“, die schon mal einen „Winterschlaf“ von 100 Jahren machen; von Fröschen, die man getrost küssen kann, auch wenn sie sich nicht in Prinzen verwandeln; von der Rekonstruktion genetischer Codes, die uns irgendwann einen echten Jurassic Park beschenken könnten. „Die Maus, die in die Kälte ging“, „Bakterien halten zusammen“ oder „Die spinnen, die Spinnen!“ – Michael Groß hat Spaß an den intelligenten und mitunter etwas bizarren Erfindungen der Natur. Spannende Phänomene, dazu ungewöhnliche Forscherpersönlichkeiten und neueste Technologien stellt er in 61 Kapiteln vor.

Der Chemiker und Wissenschaftsjournalist, der auch für Magazine wie „Nature“ oder „New Scientist“ schreibt, zeigt, dass Wissenschaft Spaß macht, Neugier weckt und den eigenen Forschergeist beflügelt.



529340908\_bu

WILEY-VCH

Wiley-VCH • Tel. +49 (0) 62 01-606-400 • Fax +49 (0) 62 01-606-184 • E-Mail: [service@wiley-vch.de](mailto:service@wiley-vch.de)

[www.wiley-vch.de/sachbuch](http://www.wiley-vch.de/sachbuch)