

# Einbau aktiver Proteine und lebender Zellen in redoxsensitive Hydrogele und Nanogele durch enzymatische Vernetzung\*\*

Smriti Singh, Fuat Topuz, Kathrin Hahn, Krystyna Albrecht und Jürgen Groll\*

Redoxsensitive Materialien sind verstärkt in den wissenschaftlichen Fokus gerückt.<sup>[1]</sup> Insbesondere mit Disulfiden verknüpfte kolloidale Netzwerke werden intensiv erforscht, da sie unter den reduktiven Bedingungen im Zellinneren schnell zu ihren Thiol-funktionalisierten Bausteinen reduziert werden. Dies ermöglicht eine nahezu quantitative Freisetzung von in den Partikeln eingebauten Molekülen in Zellen.<sup>[2]</sup> Darüber hinaus dienen Disulfid-verknüpfte Hydrogele als Zellträgermaterialien, die unter milden reduktiven, zytokompatiblen Bedingungen gezielt abgebaut werden können, ohne die Vitalität der darin eingeschlossenen Zellen zu beeinträchtigen.<sup>[3]</sup>

Disulfid-verknüpfte Polymernetzwerke lassen sich durch direkte Polymerisation Disulfid-funktionalisierter Monomere, mittels Disulfid-haltiger Vernetzer oder durch oxidative Verknüpfung Thiol-funktionalisierter Bausteine (Thiomere) herstellen.<sup>[4,5]</sup> Dabei erlaubt nur der letztgenannte Ansatz einen unmittelbaren kovalenten Einbau Thiol-funktionalisierter Moleküle (wie Cystein-haltige Peptidsequenzen) während der Bildung des Netzwerkes. Eine Gelbildung von Thiomeren durch bloßen Kontakt mit Luftsauerstoff ist möglich, aber zu langsam für die definierte Herstellung von Nanopartikeln mit den meisten üblichen Methoden sowie für eine homogene Zellverteilung in Hydrogelen.<sup>[6]</sup> Daher finden Oxidationskatalysatoren wie das weit verbreitete Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zur Verkürzung der Reaktionszeiten Anwendung. Das starke Oxidationspotential des  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkt jedoch eine Oxidation von Thiolen über Disulfide hinaus,<sup>[7,8]</sup> was die Auswahl der Moleküle, die während der Netzbildung anwesend sein können, begrenzt und die

vollständige Abbaubarkeit der Netzwerke durch reduktive Stimuli beeinträchtigt.

Im Gegensatz dazu können Enzyme unter milden Bedingungen mit einzigartiger Selektivität und ohne zusätzliche chemische Vernetzer eingesetzt werden. Eine große Anzahl von Studien beschäftigt sich daher mit enzymvermittelter Hydrogelbildung.<sup>[9–11]</sup> So haben Lütolf und Mitarbeiter in Analogie zum natürlichen Vernetzungsprozess des Fibrins Transglutaminasen zur Vernetzung von Hydrogelen verwendet, die mit Zelladhäsionspeptiden versehen werden können und anschließend durch Matrix-Metalloproteasen abbaubar sind.<sup>[12]</sup> Ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel zur enzymatischen Vernetzung von Hydrogelen zeigt, dass diese Methode bisher generell zu Gelen geführt hat, die entweder durch enzymatisch katalysierten Bruch kovalenter Bindungen, oder durch harsche und nicht zytokompatible chemische Bedingungen wie drastische pH-Änderungen abbaubar sind.<sup>[13]</sup>

Die in der Biotechnologie weit verbreitete Meerrettich-peroxidase (HRP) ist eines der am besten untersuchten oxidationskatalysierenden Enzyme.<sup>[14]</sup> Der konventionelle HRP-Zyklus wird durch die Reaktion von HRP mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  initiiert, woraus hochreaktive Intermediate als starke Oxidationsmittel resultieren. In Gegenwart von Thiolen werden dadurch Thiyl-Radikale gebildet, die zu Disulfiden dimerisieren oder mit Thiolaten zum Disulfid-Radikal reagieren können, das schließlich durch Reaktion mit Sauerstoff zu einer Disulfidgruppe umgesetzt wird. Daher wird für eine HRP-unterstützte Vernetzung normalerweise die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  benötigt, um die Reaktion zu initiieren.<sup>[15–17]</sup> Unter aeroben Bedingungen ist dies jedoch nicht notwendig, da  $\text{H}_2\text{O}_2$  während der Autoxidation von Thiolen in stöchiometrischen Mengen gebildet wird.<sup>[18]</sup> Dieses kann dann die Bildung von Disulfiden katalysieren, wobei das absolute stöchiometrische Verhältnis eine weitere Oxidation der Disulfide verhindert.

Hier beschreiben wir die HRP-vermittelte Herstellung von funktionalen, redoxsensitiven, Disulfid-vernetzten Hydrogelen und Nanogelen durch oxidative Kupplung von Thiomeren ohne Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Thiol-funktionalisierte lineare Poly(glycidole) ( $M_n = 6100 \text{ g mol}^{-1}$ ; HS-PG) wurden hierzu als hydrophile und zytokompatible Gel-Vorstufen gewählt.<sup>[19]</sup> Homogene Lösungen von HS-PG in phosphatpufferter Salzlösung (PBS; 30 Gew.-%, pH 7.4, 8.0, 8.5) zeigten bei Raumtemperatur ohne Zugabe von HRP keine Gelbildung innerhalb von 24 Stunden. In Gegenwart von HRP gelierte das System jedoch bei pH 8.5 innerhalb von maximal 4 Stunden (Abbildung 1). Die Gelbildung wurde dabei in situ mithilfe eines Oszillationsrheometers verfolgt. Ein typisches Zeitprofil der Gelierung ist durch zwei Phasen charakterisiert. Während einer initialen Anlaufphase von

[\*] S. Singh,<sup>[+]</sup> F. Topuz<sup>[+]</sup>

DWI e.V. und Institut für Technische und Makromolekulare Chemie  
RWTH Aachen

Forckenbeckstraße 50, 52056 Aachen (Deutschland)

K. Hahn, Dr. K. Albrecht, Prof. J. Groll

Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universität Würzburg

Pleicherwall 2, 97070 Würzburg (Deutschland)

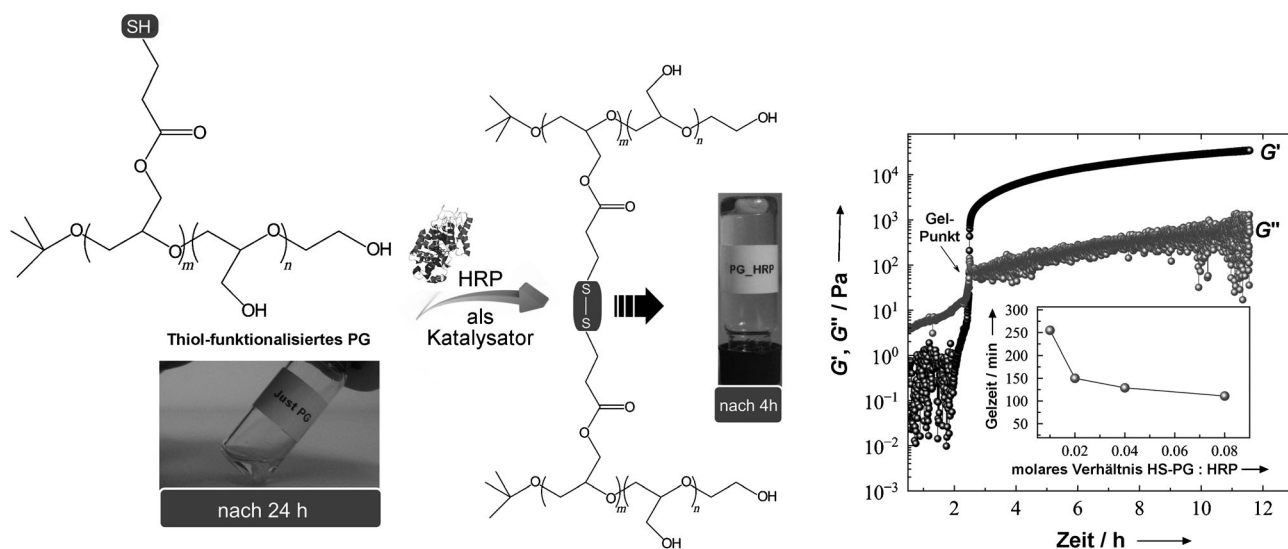
E-Mail: juergen.groll@fmz.uni-wuerzburg.de

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] F.T. bedankt sich beim Marie Curie Initial Training Network „Hierarchy“ (Projektnummer: 215851). Wir danken der DFG (SPP 1259 „Intelligente Hydrogele“) und der EU (FP 6, Projekt NanoBio-Pharmaceutics) für finanzielle Unterstützung sowie der Firma Aplagen für die Peptide.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206266> zu finden.

Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.



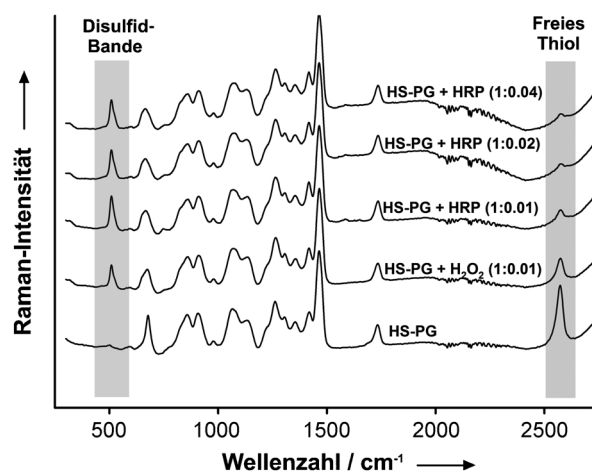
**Abbildung 1.** HRP-katalysierte Gelbildung aus Thiol-funktionalisiertem PG. Das Diagramm zeigt den Verlauf des elastischen ( $G'$ ) und viskosen ( $G''$ ) Moduls während der Vernetzung bei 1 Hz, sowie den Einfluss des molaren Verhältnisses zwischen HRP und HS-PG auf die Gelierungszeit.

2 Stunden, in welcher der elastische ( $G'$ ) und viskose ( $G''$ ) Modul fast unverändert bleiben, bilden sich zunächst größere Polymeraggregate in Lösung, ohne ein makroskopisches Netzwerk zu bilden. Darauf folgt eine Log-Phase, in der das Einsetzen der Vernetzung zwischen den Aggregaten zu einem dreidimensionalen Gel zu einem schnellen Anstieg von  $G'$  führt. Der Gel-Punkt kann in erster Näherung als der Zeitpunkt angenommen werden, an dem die Kurven von  $G'$  und  $G''$  kreuzen. Die Kinetik der Vernetzung hängt stark von der HRP-Konzentration ab, wobei eine erhöhte HRP-Konzentration zu schnellerer Vernetzung führt. Ab einem molaren Verhältnis von HRP/HS-PG = 0.08 erreicht die Gelzeit bei 110 min ein Plateau, d.h. eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration bewirkt dann keine schnellere Vernetzung mehr.

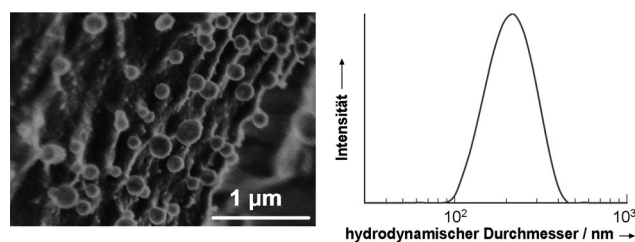
Eine vergleichende Messung an einem mit  $H_2O_2$  statt mit HRP gelierten Hydrogel zeigte eine langsamere Gelierung bei Verwendung von  $H_2O_2$  (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen), wobei ebenfalls ein elastisches Gel erhalten wurde.

Zur qualitativen Bestimmung der Reaktionsprodukte wurde Raman-Spektroskopie an vernetzten Hydrogelen durchgeführt (Abbildung 2). Die Spektren der mit  $H_2O_2$  vernetzten Gele zeigen einen hohen Restgehalt freier Thiolgruppen ( $2075\text{ cm}^{-1}$ ), während bei den mit HRP vernetzten Gelen nach 4 Stunden fast alle Thiolgruppen zu Disulfiden ( $507\text{ cm}^{-1}$ ) umgesetzt waren. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Rheologiedaten und deuten darauf hin, dass HRP ein effektiverer Katalysator für die Gelbildung ist als Wasserstoffperoxid.

Mittels inverser Miniemulsionen konnten durch HRP-Katalyse auch Disulfid-verknüpfte Nanogele hergestellt werden, die durch Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM) und dynamische Lichtstreuung (DLS) analysiert wurden (Abbildung 3). Kryo-REM zeigte dabei sphärische Partikel mit hydrodynamischen Durchmessern zwischen 200 und 350 nm. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem



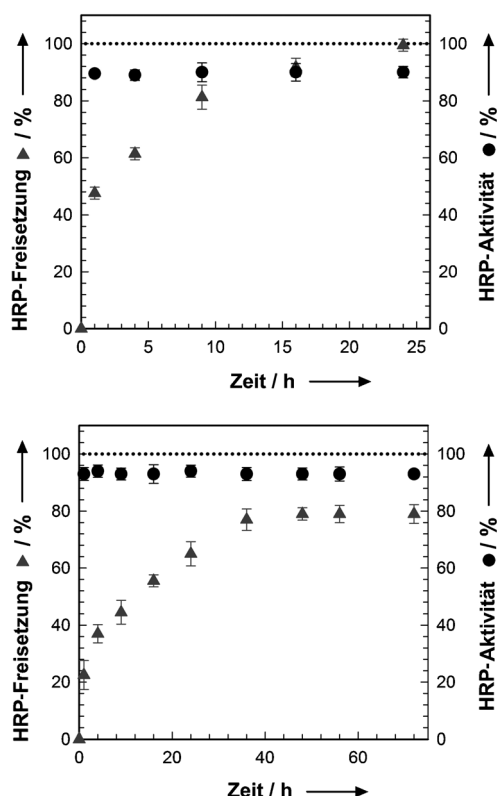
**Abbildung 2.** Raman-Spektren von mit  $H_2O_2$  und HRP vernetzten HS-PG-Hydrogelen mit den genannten molaren Verhältnissen.



**Abbildung 3.** Kryo-REM und DLS von HS-PG-Nanogelen in Wasser.

durch DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmesser von 250 nm mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0.24.

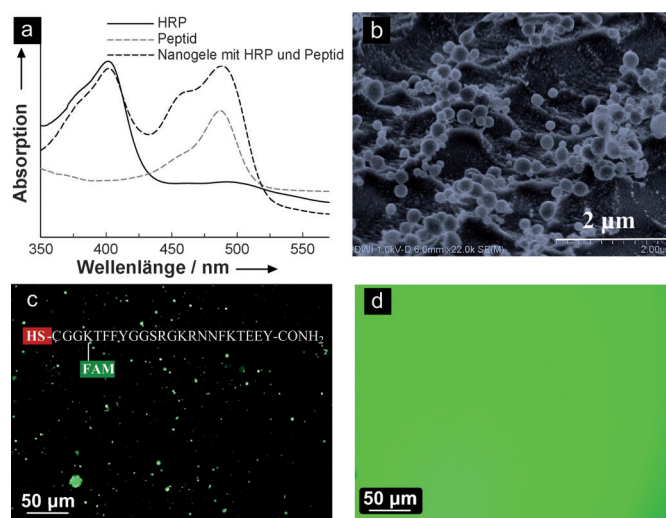
Die Freisetzung von HRP aus den Nanogelen wurde mittels der HRP-katalysierten Umsetzung des farblosen Pyrogallol zum gelbgefärbten Purpurogallin gemessen (siehe Hintergrundinformationen). Während aus Hydrogelen innerhalb der ersten Stunde 45 % und nach 24 Stunden mehr als 98 % der HRP freigesetzt wurden, war die Freisetzung aus



**Abbildung 4.** HRP-Freisetzungsprofile und Aktivitätsmessungen für Hydrogele (oben) und Nanogele (unten).

Nanogelen langsamer und nicht vollständig (Abbildung 4). Erst nach 9 Stunden waren 45 % der HRP aus den Nanogelen freigesetzt, und nach 36 Stunden erreichte die Freisetzung bei 80 % ein Plateau. Eine bräunliche Färbung der Nanogele nach 2 Tagen an Raumluft (Abbildung S3) deutet auch darauf hin, dass die fehlenden 20 % HRP in den Nanogelen verbleiben. Um den Unterschied zwischen Hydrogelen und Nanogelen zu verstehen, wurden die Vernetzungsdichten beider Systeme berechnet (siehe Hintergrundinformationen). Die Maschenweite der Hydrogele wurde zu 4.9 nm, die der Nanogele zu 3 nm bestimmt. Da der Trägheitsradius von HRP zwischen 2.5 und 3 nm liegt, erklären die berechneten Vernetzungsdichten die unterschiedlichen Freisetzungsprofile und den Verbleib von 20 % HRP in den Nanogelen sehr gut. Dies könnte in zukünftigen Arbeiten für Kombinationstherapien mit Wirkstoffen von Nutzen sein, welche durch Oxidation mit HRP erst am Wirkzielort aktiviert werden.<sup>[20]</sup> Die aus Hydrogelen und Nanogelen freigesetzte HRP zeigte in allen Fällen katalytische Aktivitäten von mehr als 90 % im Vergleich zur reinen Enzymkontrolle (Abbildung 5). Dies beweist, dass die enzymatische Aktivität auch nach der oxidativen Vernetzung der Gele erhalten bleibt und eine Verkapselung aktiver Enzyme mit dieser Methode möglich ist.

Um die Zellverträglichkeit der HRP-vermittelten Vernetzung und die Eignung des Verfahrens zur Zellverkapselung zu demonstrieren, wurden L929-Fibroblasten in Hydrogele eingebettet und nach 1 Stunde und 18 Stunden Zellkultur mittels lebend/tot-Färbung analysiert (Abbildung S4). Diese ersten Experimente unterstreichen durch hohe Zellüberle-



**Abbildung 5.** a) UV-Spektren von HRP, der FAM-markierten Peptidsequenz CGGKTFFYGGSRGKRNNFKTEEY und der mittels HRP-Katalyse hergestellten Peptid-konjugierten HS-PG-Nanogele; b) Kryo-REM-Aufnahme von Peptid-konjugierten Nanogelen (Durchmesser: 200–350 nm). c, d) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Peptid-konjugierten Nanogele in Lösung vor (c) und nach (d) Reduktion mit Glutathion.

bensraten die Zellverträglichkeit der Vernetzung sowie der Hydrogele. Weiterhin belegten Zellaktivitätstests nach 24 und 48 Stunden Inkubation von humanen dermalen Fibroblasten mit HRP-vernetzten Nanogelen ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) auch die exzellente Zellverträglichkeit der Nanogele (siehe die Hintergrundinformationen).

Durch HRP-vermittelte Vernetzung von Thiomeren können ebenfalls direkt funktionalisierte Nanogele in einem Schritt hergestellt werden. Um dies zu zeigen, wurde die mit Carboxyfluorescein (FAM) markierte Peptidsequenz CGGKTFFYGGSRGKRNNFKTEEY zur Lösung der Thiomere bei der Nanogel-Herstellung zugegeben. Durch das N-terminale Cystein kann dieses Peptid von der HRP kovalent in das Polymernetzwerk eingebaut werden. Abbildung 5a zeigt die UV-Spektren der nativen HRP, des mit FAM markierten Peptids und der Peptid-konjugierten HS-PG-Nanogele nach Zentrifugation und Dialyse.

Native HRP zeigt in wässriger Umgebung die für Hämhaltige Verbindungen typische intensive Soret-Bande bei 403 nm. Dagegen zeigt das Spektrum des Peptids aufgrund des konjugierten FAM ein Maximum bei 488 nm. In den Spektren der mittels Dialyse gereinigten Nanogele kommen beide Banden vor, was sowohl den Restgehalt an HRP als auch die Gegenwart des Peptides in den Nanogelen beweist. Die Konjugationseffizienz des Peptides liegt in erster Näherung durch den Vergleich mit einer bei 475 nm gemessenen Standard-Absorptions-Kalibrierkurve etwa bei 56 %.

Die Redoxsensitivität der Peptid-konjugierten Nanogele wurde durch Inkubation mit Glutathion (GSH) untersucht. Dieses Tripeptid ist wesentlicher Bestandteil des zellulären Redox-Puffers und enthält eine freie Thiolgruppe, mit der es Disulfide schnell und effizient zu Thiolen spaltet.<sup>[21]</sup> Aufgrund der FAM-Markierung der Peptid-konjugierten Nanogele konnte der Degradationsprozess mit Fluoreszenzmikroskopie

analysiert werden. Vor der Inkubation mit GSH wurden die Nanoge­le mit Kryo-REM als sphärische Partikel charakterisiert (Abbildung 5b). In der Fluoreszenzmikroskopie erschienen die verdünnten Nanoge­le als individuelle helle Punkte auf dem dunklen Hintergrund der nicht-fluoreszierenden Lösung (Abbildung 5c). Dies impliziert, dass die vorhandenen Peptide kovalent in den Nanogelen gebunden sind und alle freien Peptide durch die Dialyse erfolgreich entfernt wurden. Nach Zugabe von GSH (10 mM) ergibt sich als Zeichen des Abbaus der Nanoge­le eine homogene Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Lösung (Abbildung 5d).

Zur Demonstration der milden Bedingungen bei Vernetzung mit HRP wurden Nanoge­le mit  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal), einem 464 kDa homo-tetrameren Protein, das die Hydrolyse von  $\beta$ -Galactosiden zu Monosacchariden katalysiert, beladen. Dieses Protein wird durch die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken inaktiviert<sup>[22]</sup> und ist daher funktionell äußerst sensitiv gegenüber oxidativen Bedingungen. Obwohl die Beladungseffizienz nur bei 40–43 % lag, wurden Nanoge­le erhalten, aus denen nach Beladung, Reinigung und Degradation 83–85 % der  $\beta$ -Gal-Aktivität erhalten wurde (Tabelle 1; siehe Hintergrundinformationen). Trotz der nicht opti-

**Tabelle 1:** Beladung, Beladungseffizienz und Aktivität von  $\beta$ -Gal.

$\beta$ -Gal eingesetzt [mg]	Nanogel- Beladung [mg]	Beladungs- Effizienz [%]	$\beta$ -Gal- Aktivität [%]
7.5	3.2	43	85
15.0	6.1	40	83

mierten Beladungseffizienz zeigen diese Daten, dass oxidationsempfindliche große Proteine durch die HRP-vermittelte Verknüpfung von Thiomeren unter Erhaltung ihrer enzymatischen Funktion in Nanoge­le eingebaut und unter Bedingungen, die denen im Zytosol ähneln, aus den Gelen wieder freigesetzt werden können.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass HRP ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid für eine milde oxidative Vernetzung von Thiol-funktionalisierten Polymeren zu Hydrogelen und Nanogelen verwendet werden kann. Zellen können in derart hergestellte Hydrogele eingebaut werden, und Nanoge­le lassen sich in einem Schritt mit Thiol-haltigen Peptidsequenzen kovalent funktionalisieren. Diese Nanoge­le sind redoxsensitiv und degradieren schnell unter Bedingungen, die denen im Zytosol ähneln. Wir konnten zudem am Beispiel der  $\beta$ -Galactosidase zeigen, dass große und oxidationsempfindliche Proteine mit dieser Methode in die Nanoge­le eingebaut werden können, und ihre enzymatische

Funktion nach Freisetzung zum großen Teil erhalten bleibt. Damit sind diese Nanoge­le vielversprechende Kandidaten für Wirkstofftransportsysteme, insbesondere für Proteine.

Eingegangen am 5. August 2012,  
veränderte Fassung am 26. November 2012  
Online veröffentlicht am 5. Februar 2013

**Stichwörter:** Enzymkatalyse · Gele · Kolloide · Meerrettich-Peroxidase (HRP) · Redoxsensitive Materialien

- [1] F. Meng, W. E. Hennik, Z. Zhong, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2180–2198.
- [2] G. Saito, J. A. Swanson, K. D. Lee, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 199–215.
- [3] M. Matsusaki, H. Yoshida, M. Akashi, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2729–2737.
- [4] W. Tang, N. Y. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5578–5584.
- [5] K. Albrecht, M. Moeller, J. Groll, *Adv. Polym. Sci.* **2011**, *234*, 65–93.
- [6] H. Lee, H. Mok, S. Lee, Y.-K. Oh, T. A. Park, *J. Controlled Release* **2007**, *119*, 245–252.
- [7] A. H. Krotz, R. C. Mehta, G. E. Hardee, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 341–352.
- [8] D. Luo, S. W. Smith, B. D. Anderson, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 304–316.
- [9] S. Toledanom, R. J. Williams, V. Jayawarna, R. V. Ulijn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1070–1071.
- [10] K. A. Mosiewicz, K. Johnsson, M. P. Lutolf, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5972–5974.
- [11] Z. M. Yang, P. L. Ho, G. L. Liang, K. H. Chow, Y. Cao, Z. H. Guo, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 266–267.
- [12] M. Ehrbar, S. C. Rizzi, R. G. Schoenmakers, B. S. Miguel, J. A. Hubbel, F. E. Weber, M. P. Lutolf, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3000–3007.
- [13] L. S. Moreira Teixeira, J. Feijen, C. A. van Blitterswijk, P. J. Dijkstra, M. Karperien, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1281–1290.
- [14] B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Long, *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 10–13.
- [15] R. Jin, L. S. M. Teixeira, P. J. Dijkstra, C. A. Karperien, F. J. Jan, *J. Controlled Release* **2011**, *152*, 186–195.
- [16] F. Lee, J. E. Chung, M. Kurisawa, *Soft Matter* **2008**, *4*, 880–887.
- [17] M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. Y. Yang, S. J. Gao, H. Uyama, *Chem. Commun.* **2005**, 4312–4314.
- [18] C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, *Phyton* **1997**, *37*, 219–226.
- [19] J. Groll, S. Singh, K. Albrecht, M. Moeller, *J. Polym. Sci. Part A* **2009**, *47*, 5543–5549.
- [20] J. Tupper, R. M. Stratford, S. Hill, M. G. Tozer, U. G. Dachs, *Cancer Gene Ther.* **2010**, *17*, 420–428.
- [21] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760.
- [22] W. B. Snyder, T. J. Silhavy, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 953–963.