

Funktionalisierung von Biomaterialien

Hartmut Worch

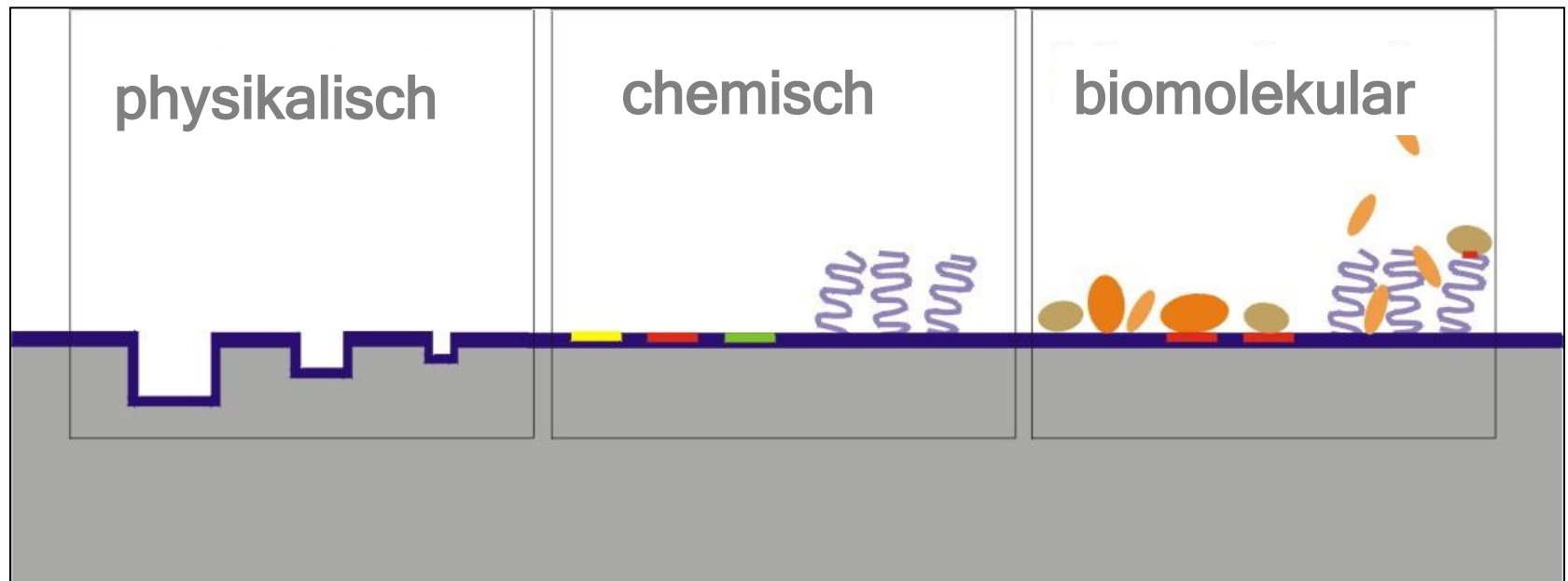
Bioaktive Materialien und das Zellwachstum stimulierende
physikalische Methoden

Hanau, 21. Januar 2010





Technologien für die Biofunktionalisierung von Metall- Polymer- und Keramikoberflächen



Biomolekulare Oberflächenmodifizierung

Extrazelluläre Matrices : Kollagene
Polynukleotide
Calciumphosphatphasen

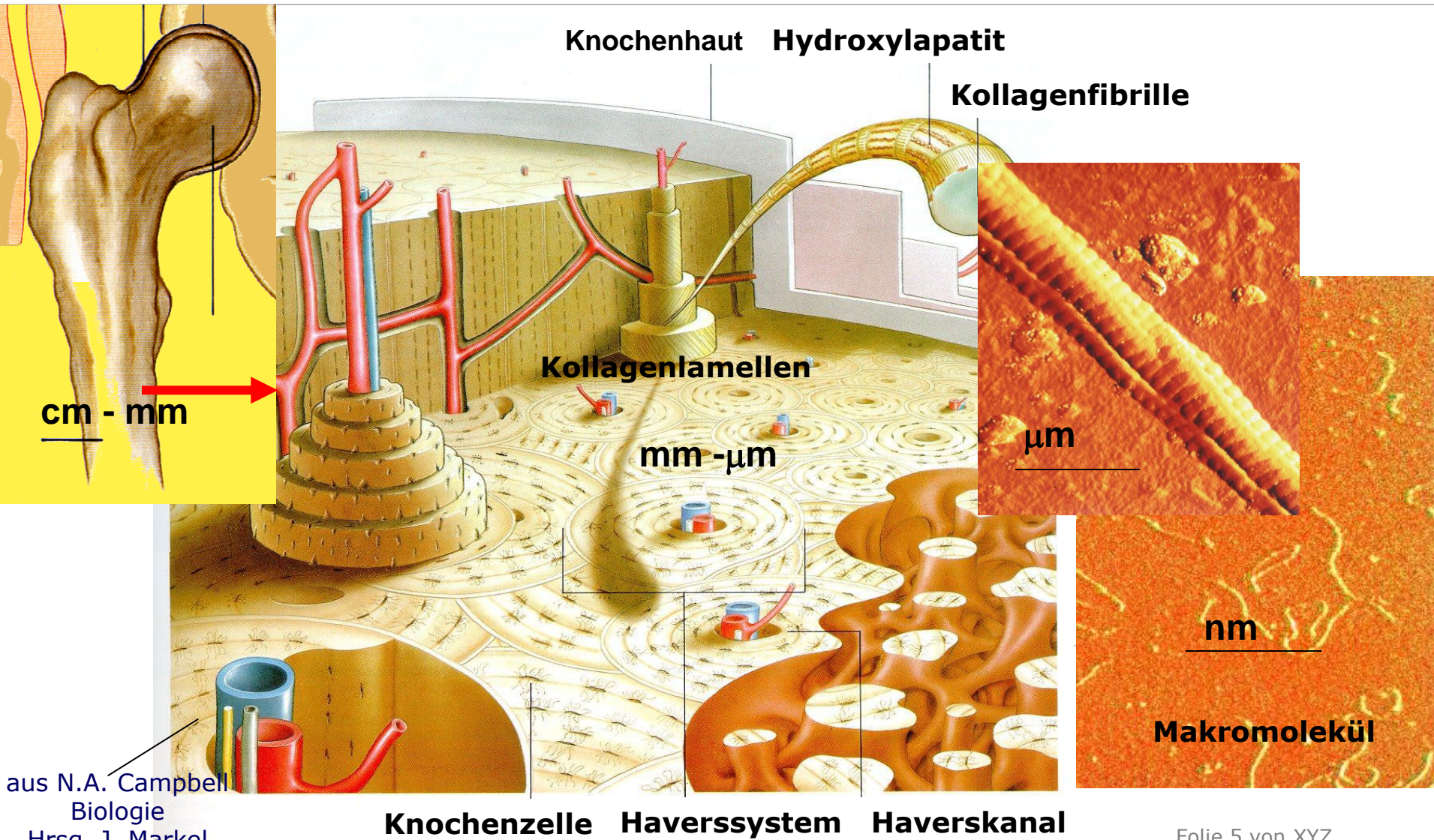
Biomolekulare Oberflächenmodifizierung

Extrazelluläre Matrices : Kollagene

Calciumphosphatphasen

Polynukleotide

Die hierarchische Struktur des Knochens

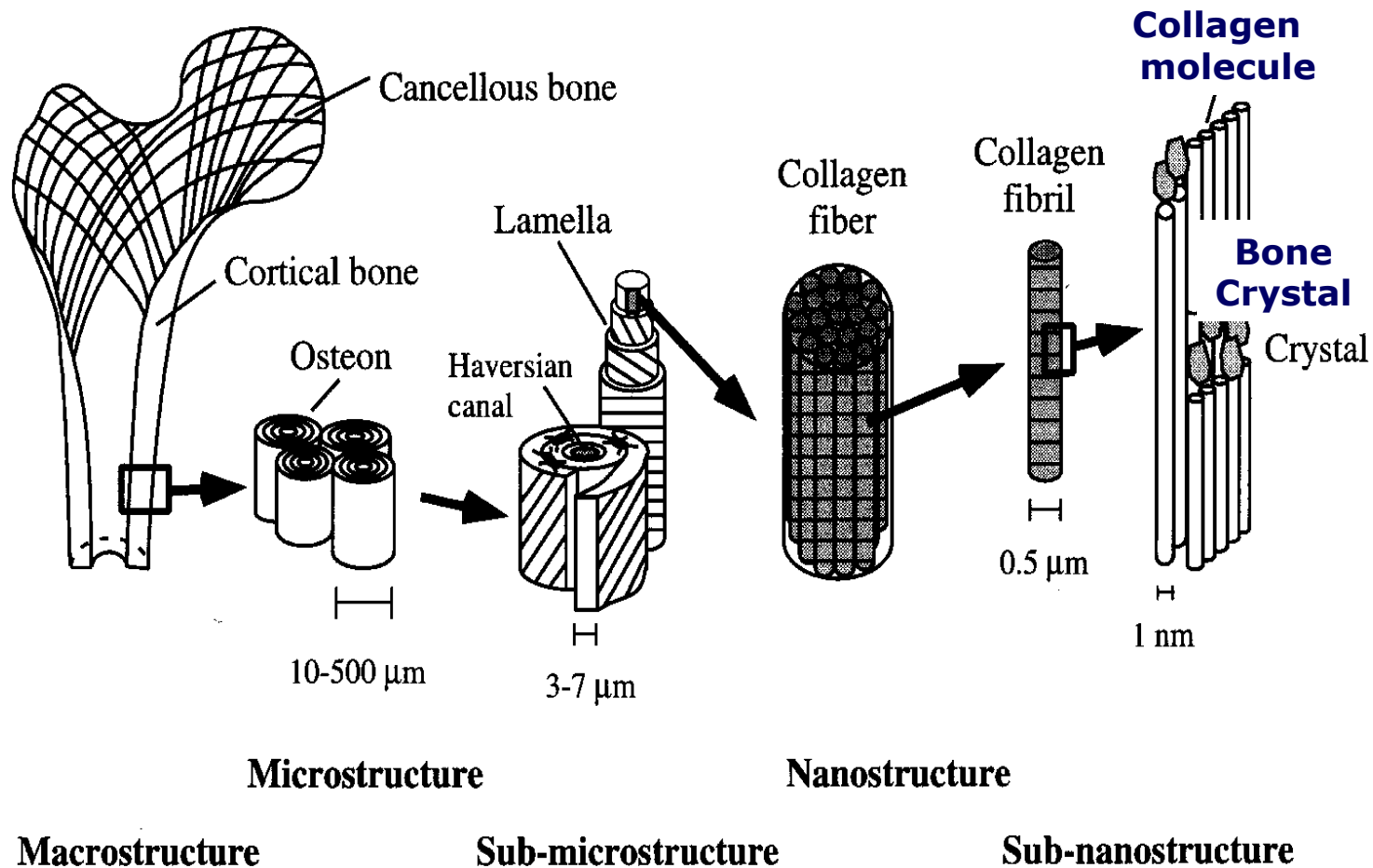


aus N.A. Campbell
Biologie
Hrsg. J. Markel
Spektrum 1997

Knochenzelle Haverssystem Haverskanal

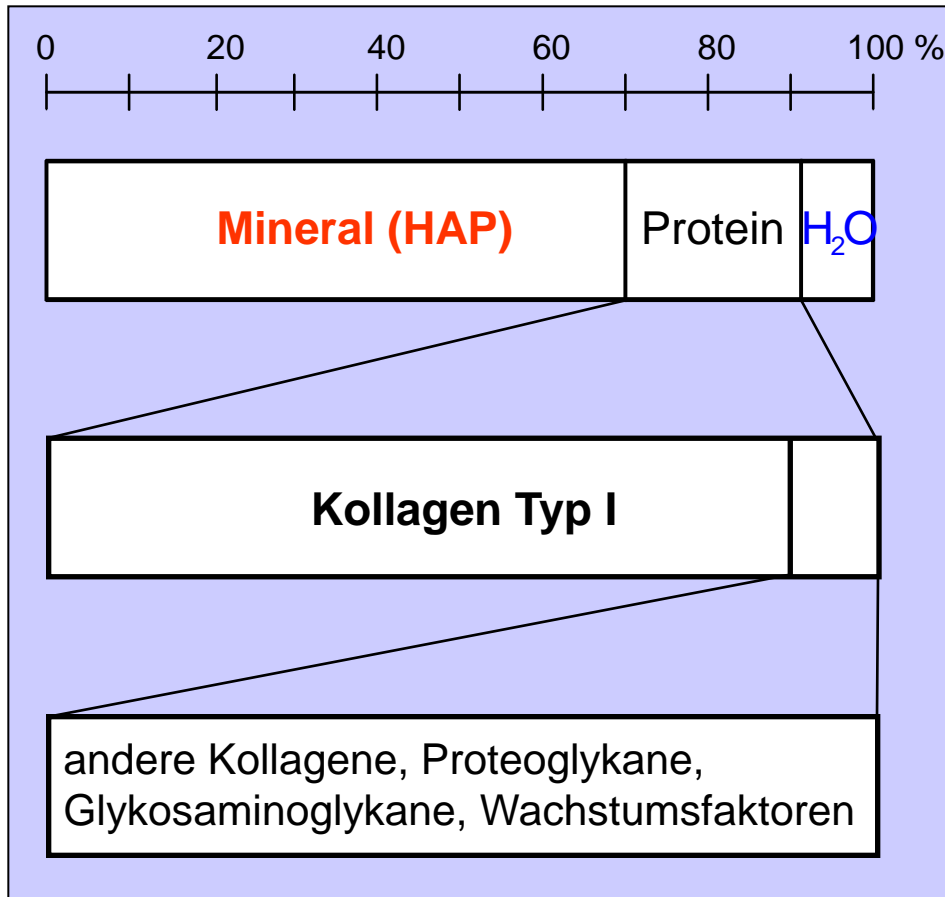
Die hierarchische Struktur des Knochens

Quelle: J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.* **1998**, 20, 92-102.

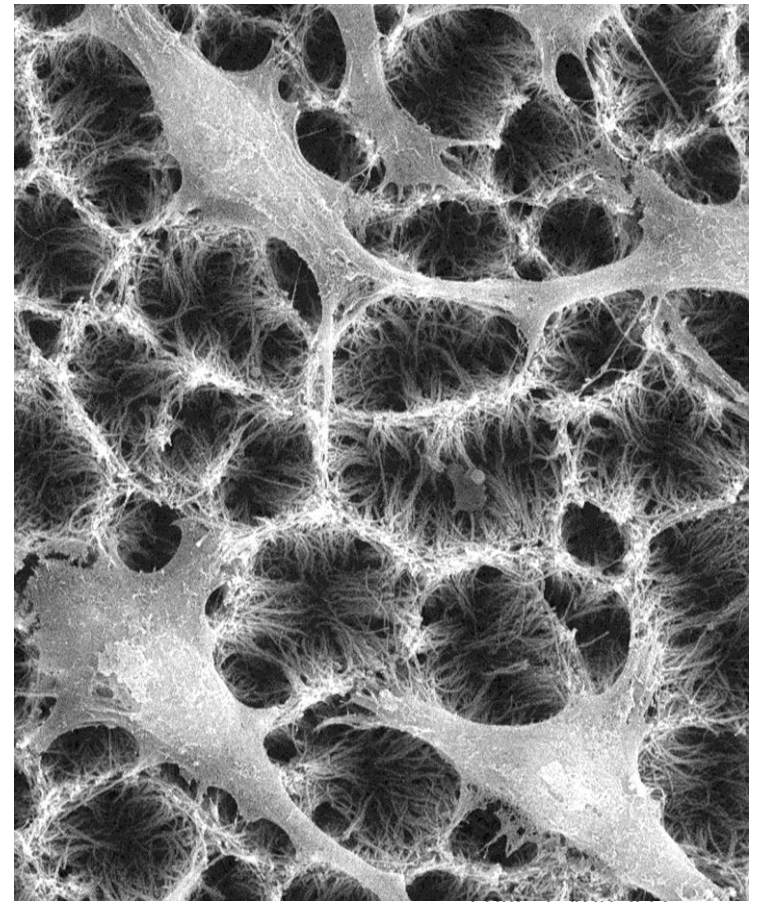


Der Aufbau des Knochens

Knochenmatrix
-ECM-



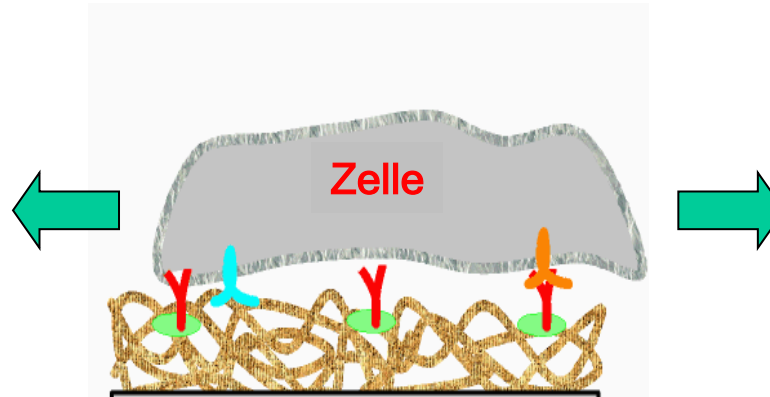
Knochenzellen
-Osteoblasten, Osteoklasten



Zell- Matrixkommunikation

-Wechselwirkungen zwischen ECM, Wachstumsfaktoren und Zellen

Direkt:
Struktur &
Stabilität,
Wirkung von
Adhäsions-
Rezeptoren

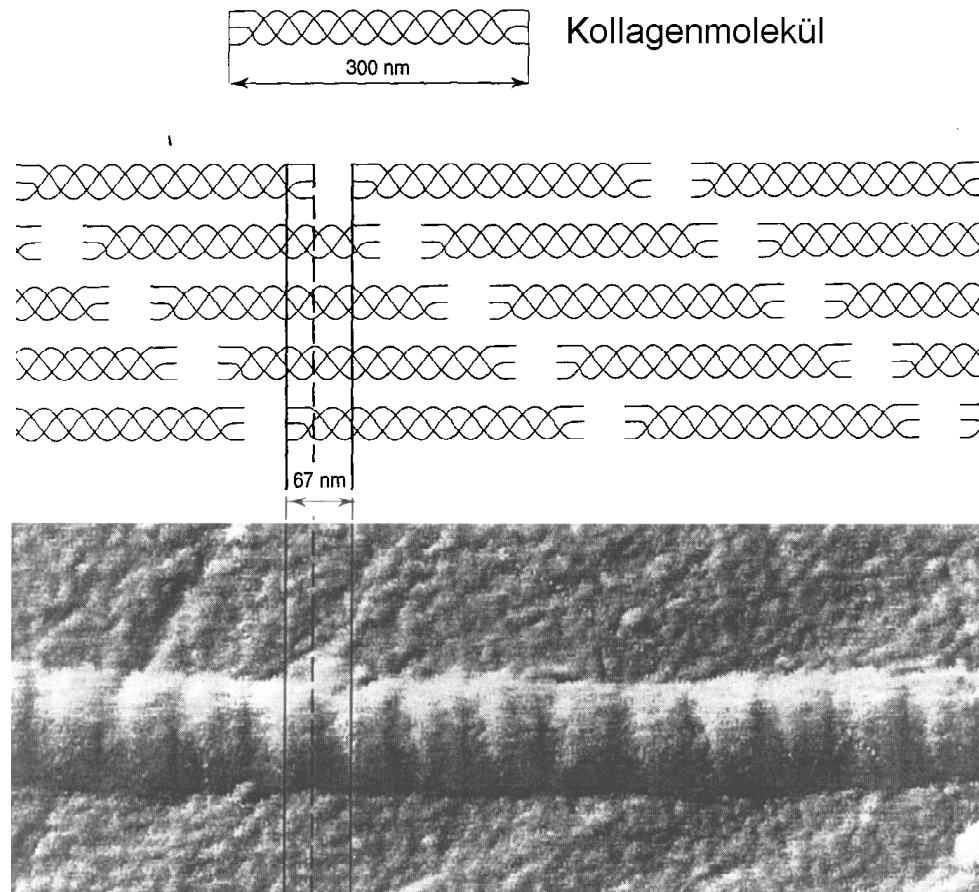


Indirekt:
Interaktionen von
Wachstumsfaktoren

↓

**Einlagerung
Akkumulation in spezifischen Flächen
Schutz vor proteolytischer Degradation
stabilisierende Wechselwirkungen mit
spezifischen Rezeptoren**

Kollagen I - Struktur



Selbstorganisierende Strukturbildung

Selbstorganisation von Molekülen basiert auf der Minimierung der freien Enthalpie

Molekulare Selbstorganisation

basiert auf molekulare Erkennung
durch strukturelle Kompatibilität und
komplementäre Kräfte

wie z.B.

elektrostatische Wechselwirkungen
hydrophile und hydrophobe WW

Meso-, Makroskopische Selbstorganisation

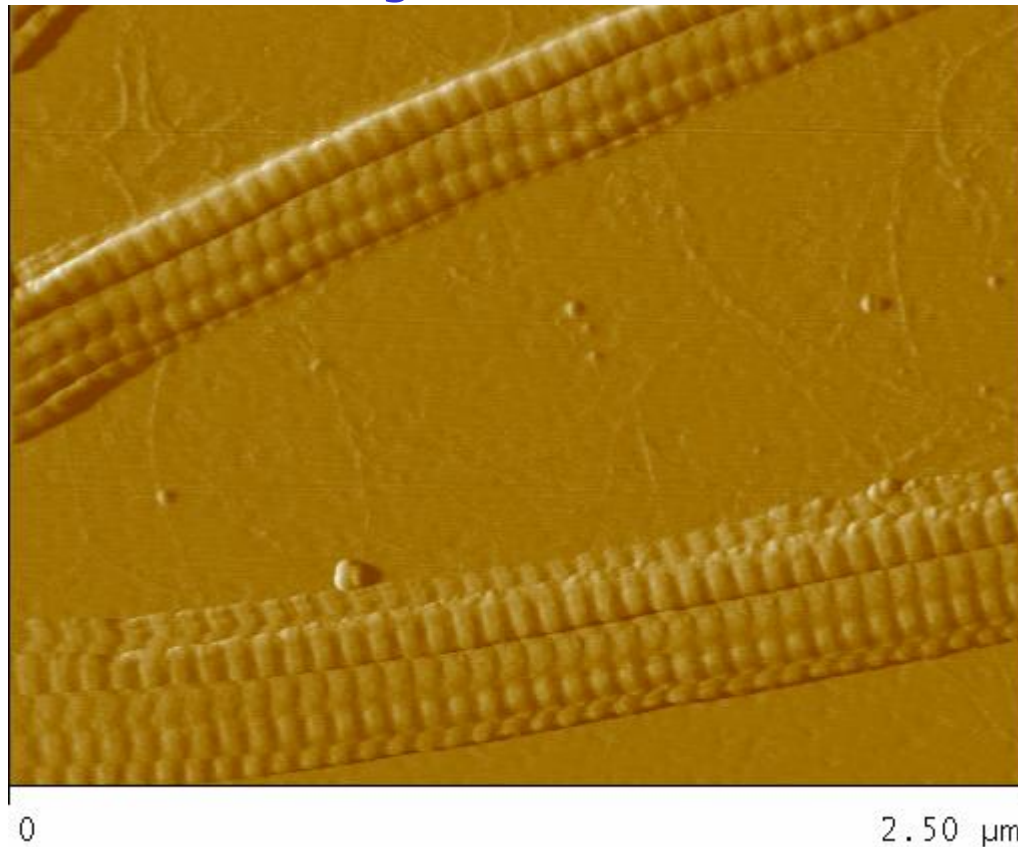
basiert auf dem Wirken von

Gravitation

Kapillarkräften

elektromagnetische WW

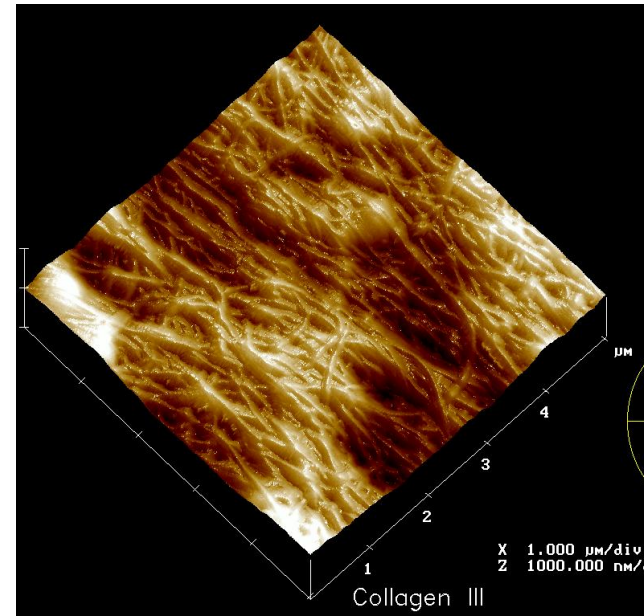
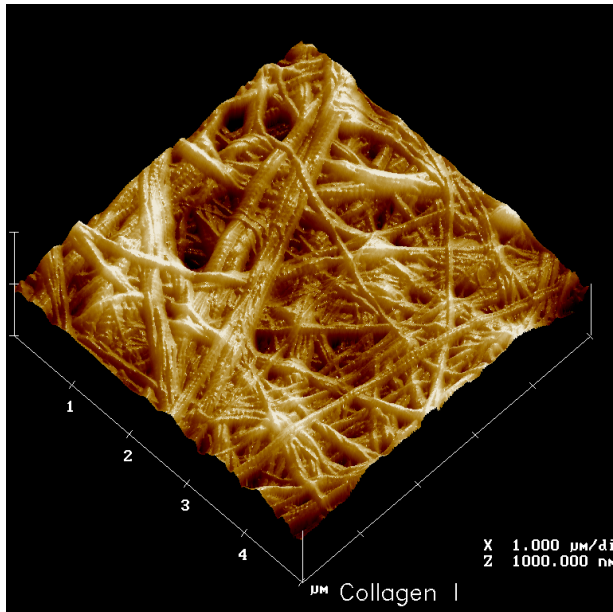
Kollagen I – Fibrille



**Bisher sind
26
Kollagentypen
bekannt**

V. Hintze, S. Heinemann TU Dresden

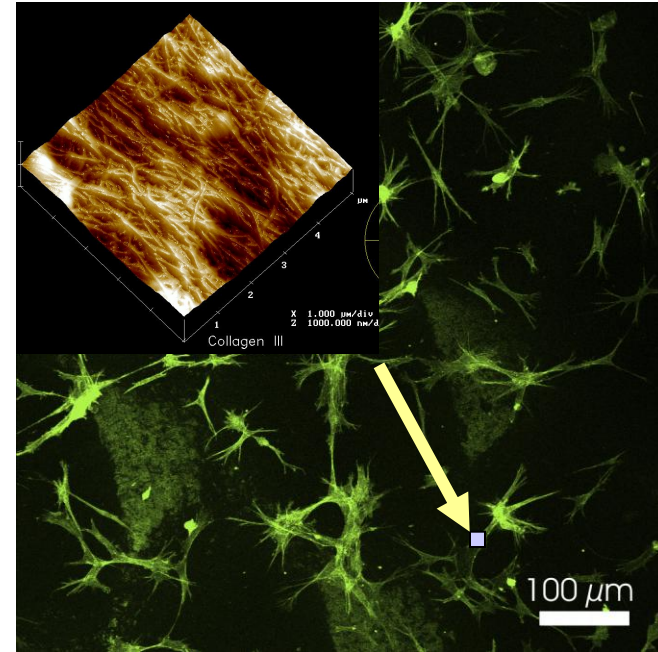
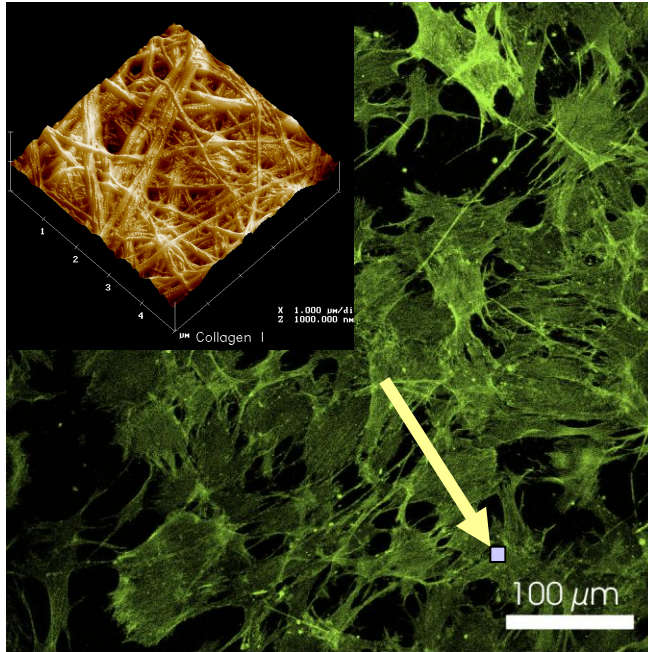
Fibrillogenese von Kollagen I und Kollagen III



Susanne Bierbaum, Thomas Hanke, TU Dresden

Kollagen Typ I (links) und Typ III (rechts)-Fibrillen in dreidimensionalen Kollagenschichten (Kollagen-Gel)

AFM-tapping mode-Bilder der feuchten Schichten



Susanne Bierbaum, Thomas Hanke, TU Dresden

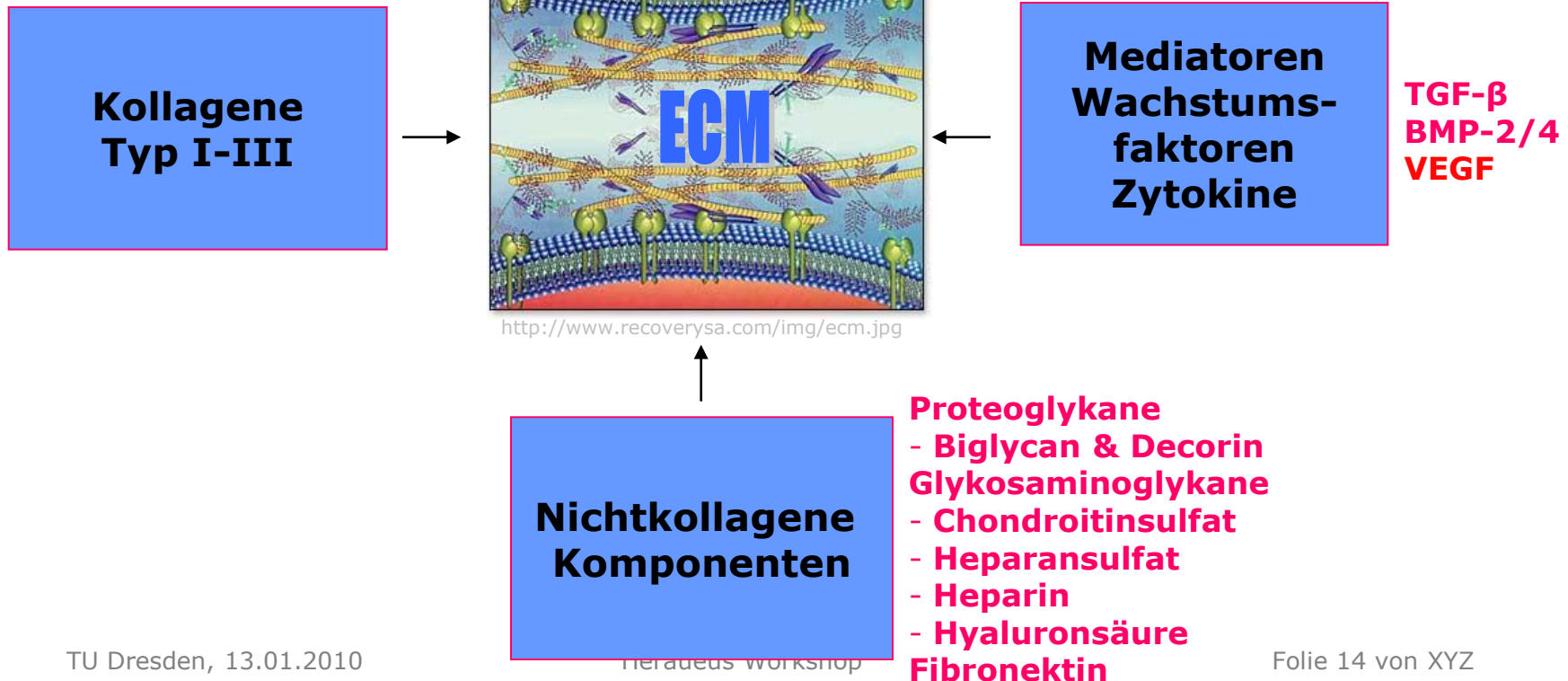
Primäre Osteoblasten nach 24 Stunden Kulturzeit auf (links) Kollagen-Typ I und (rechts) -Typ III-Schichten (Kollagen-Gel)

Die Art des Kollagens hat einen nachhaltigen Einfluss auf die Zelladhäsion

Weitere Einflussfaktoren

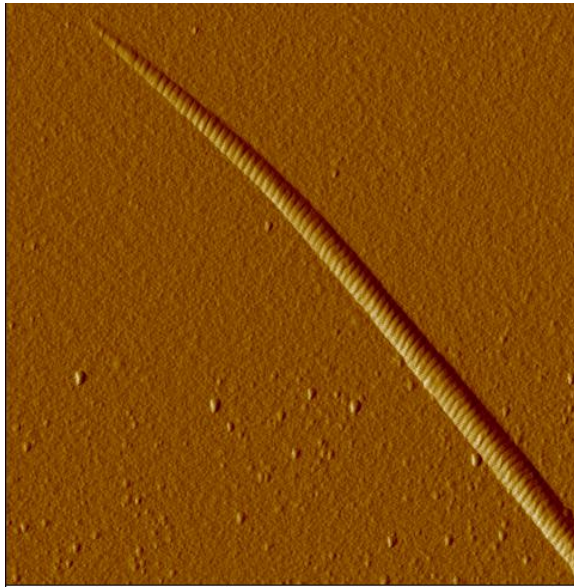
Die Extrazelluläre Matrix ist weitaus komplexer aufgebaut – aus dieser Kenntnis heraus lassen sich **artifizielle Extrazelluläre Matrices (aECM)** entwickeln mit spezifischen Funktionen und Eigenschaften

- Einfluss auf die Zellantwort über die Bindung und Freisetzung von Mediatoren (Wachstumsfaktoren und Zytokine)
- Verbesserung der Implantatintegration bei Patienten mit systemischen Erkrankungen



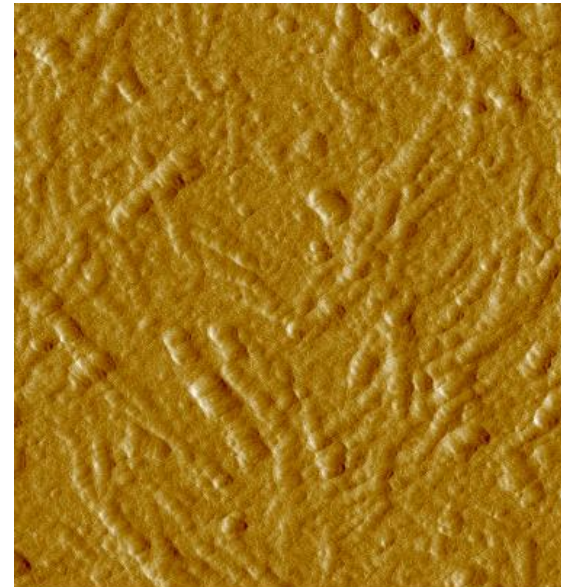
Einfluss von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen auf die Fibrillogenese Länge und Dicke der Fibrillen, Verzweigungen

Kollagenfibrille links ohne



0 5.00
Data type Amplitude
2 2000

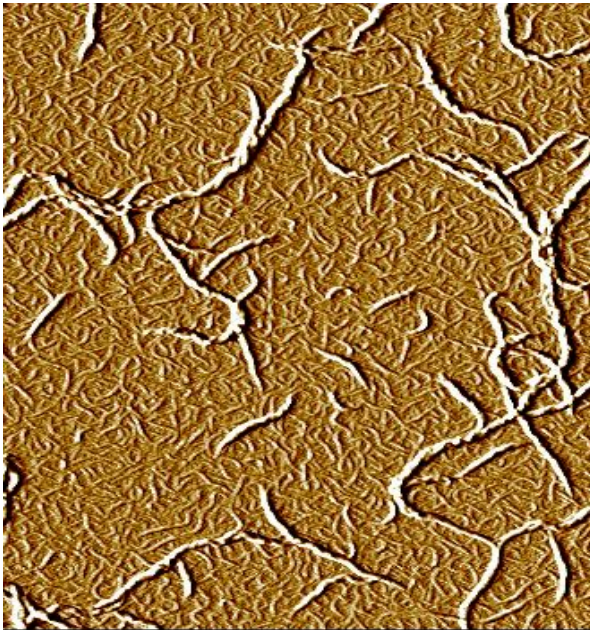
rechts mit Dekorin



2.50 μm

Einfluss der Konzentration von Glykosaminoglykanen auf die Fibrillogenese

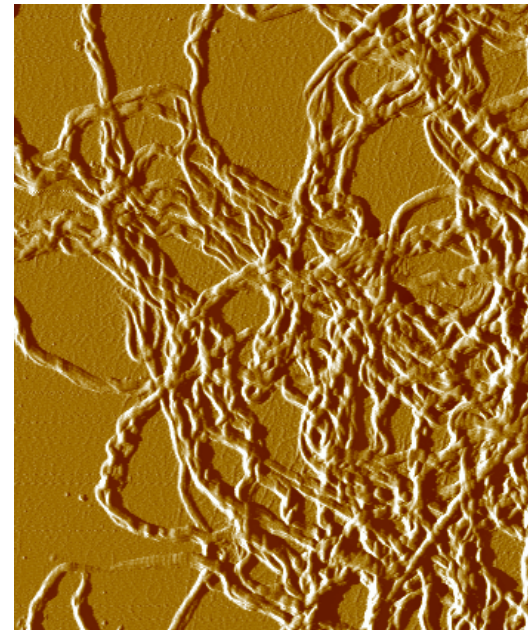
51 μg CS/ mg Fibrillen



20.0 μm

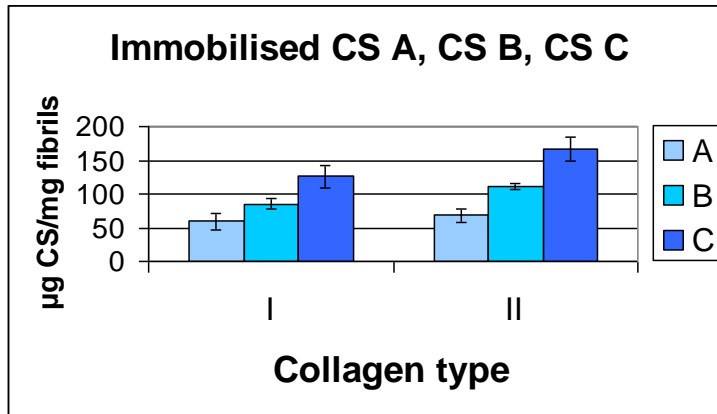
V.Hintze, S. Heinemann, TU Dresden

122 μg CS/ mg Fibrillen



10.0 μm

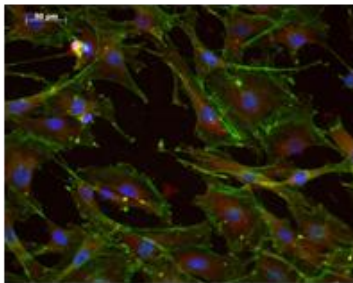
**Proteoglykane und Glykosaminoglykane beeinflussen nachhaltig die Konstitution
und die Konformation von Kollagenfibrillen**



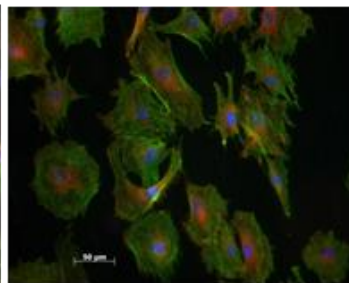
Chondroitinsulfate (CS) assoziiert mit Kollagen I, II and III während der *in vitro* Fibrillogenese
(T. Douglas et al. 2007, *Biomacromolecules*)

-Cell culture-

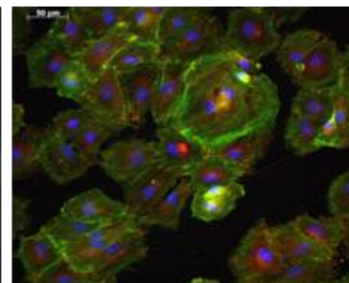
Titanium



Collagen II

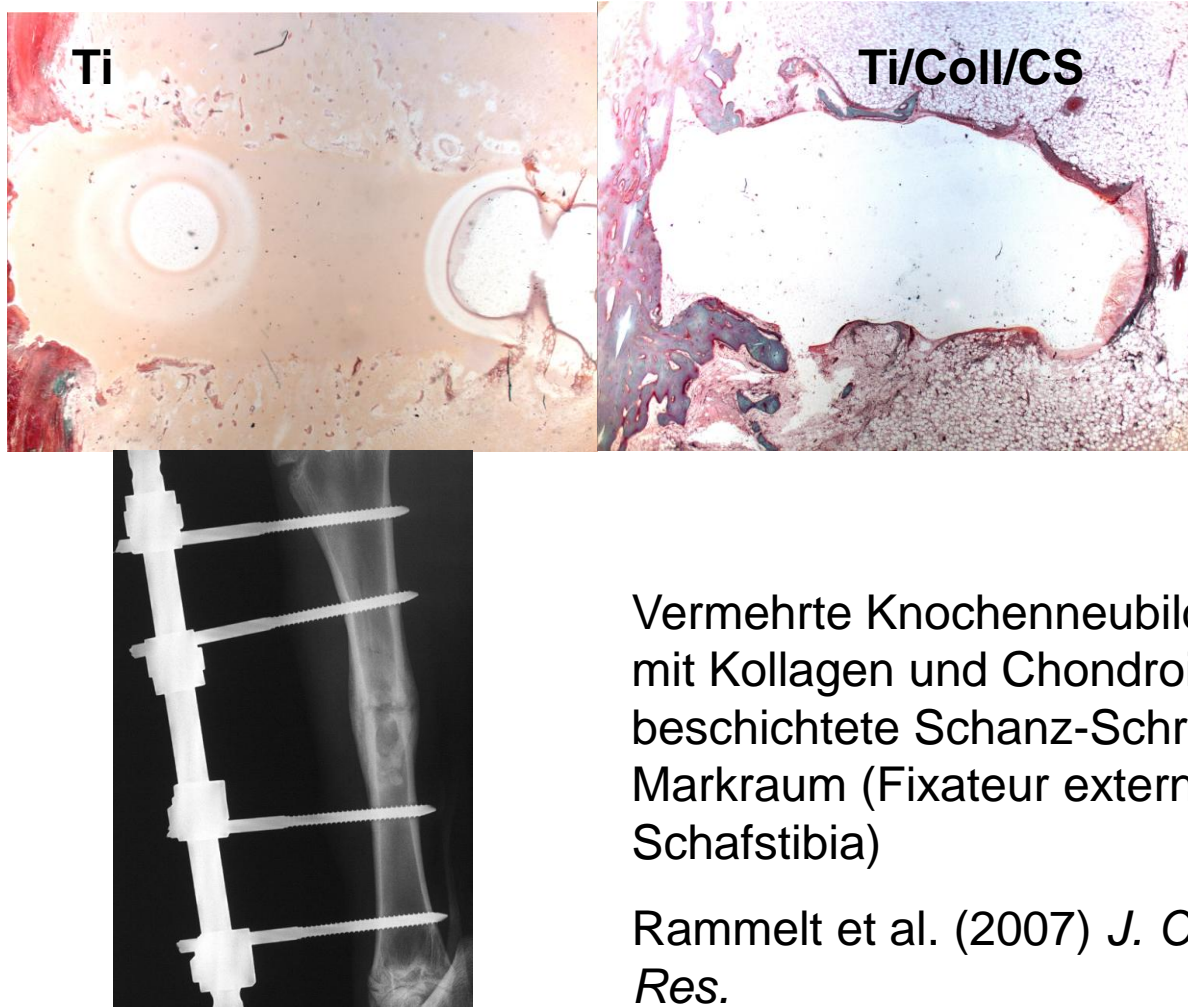


Collagen II CS-A



CS-A verbessert die Spreitung und die Bildung von fokalen Adhäsionen.
(T. Douglas et al., 2007, *Biomacromolecules*)

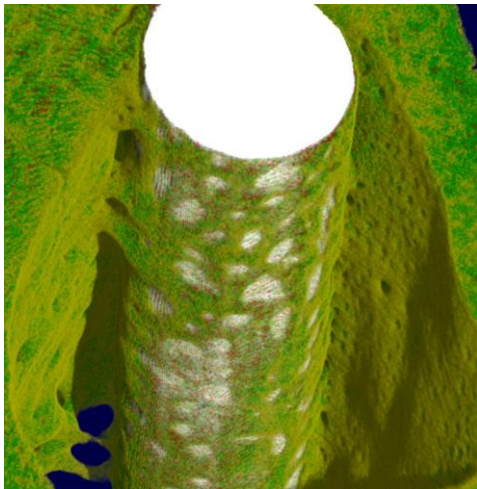
Actin – Vinculin – Kerne



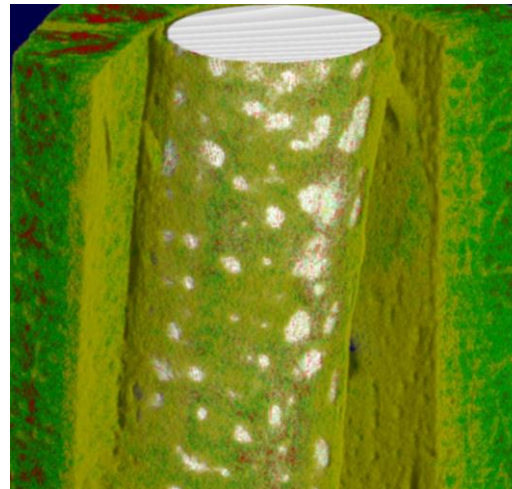
Vermehrte Knochenneubildung um mit Kollagen und Chondroitin-Sulfat beschichtete Schanz-Schrauben im Markraum (Fixateur externe in der Schafstibia)

Rammelt et al. (2007) *J. Orthop. Res.*

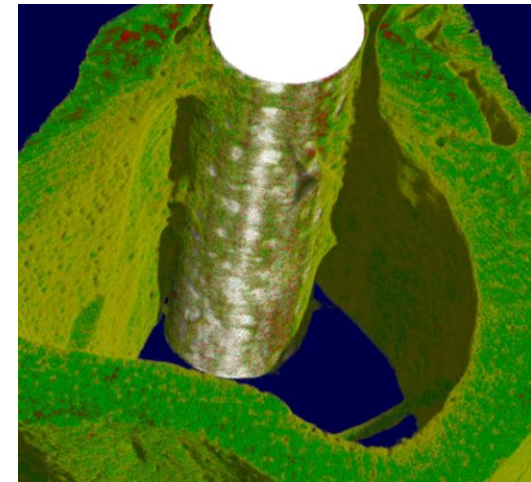
SR μ CT Abbildung von neu gebildetem Knochen



Ti-blank



Ti+Coll/CS

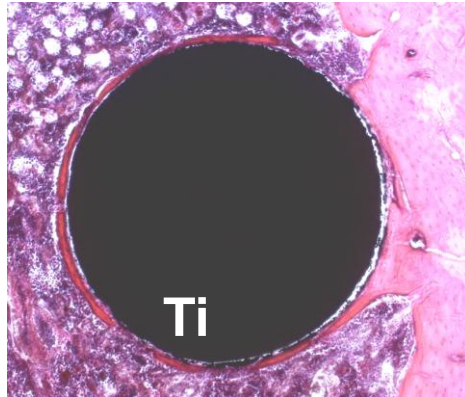


Ti+Coll/BMP-4

Die Wirkung von Glykosaminoglykanen auf die Knochenneubildung ist nachhaltiger als die von immobilisierten Wachstumsfaktoren

direkter Knochenkontakt nach 28 Tagen

62 %



75%



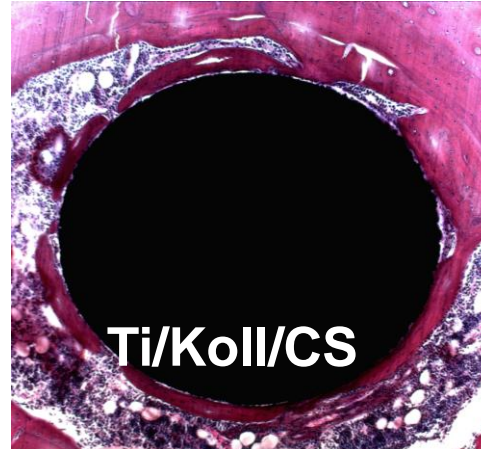
84%

RGD-Peptid:

kräftige
Knochen-
manschette

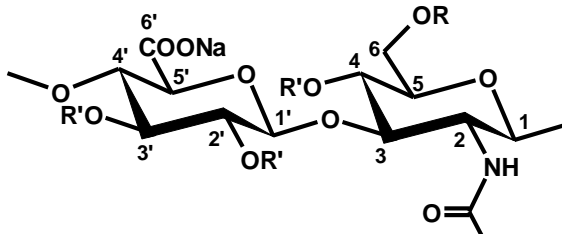


90%



Chondroitinsulfat:

höchster direkter
Knochenkontakt im
Markraum der
Ratte

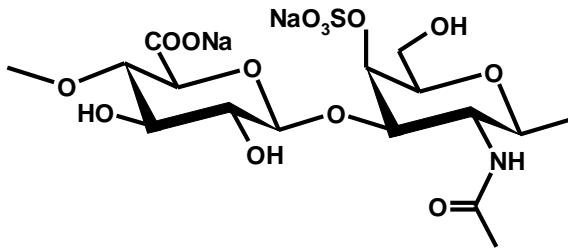


hyaluronic acid, Na-salt (Hya): R, R' = H

low-sulfated Hya (sHya1.0): R = SO₃Na, R' = H

high-sulfated Hya (sHya2.8): R = SO₃Na, R' = H or SO₃Na

-sulfatiertes Hyaluronan-



chondroitin-4-sulfate, Na-salt (CS-A)

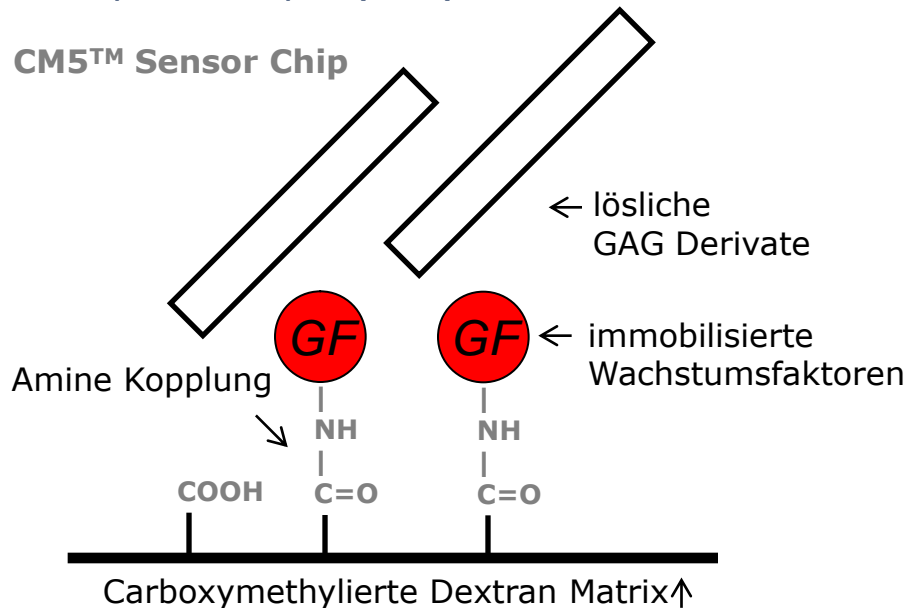
GAG Derivate	Zahl von eingeführten Gruppen pro Disaccharid	% Sulfat
sHya2.8*	DS _S ~2.8	13.1
sHya1.2*	DS _S ~1.2	6.6
Chondroitin-sulfate-4 (CS-A)	DS _S ~0.9	4.9

INNOVENT e.V., Jena

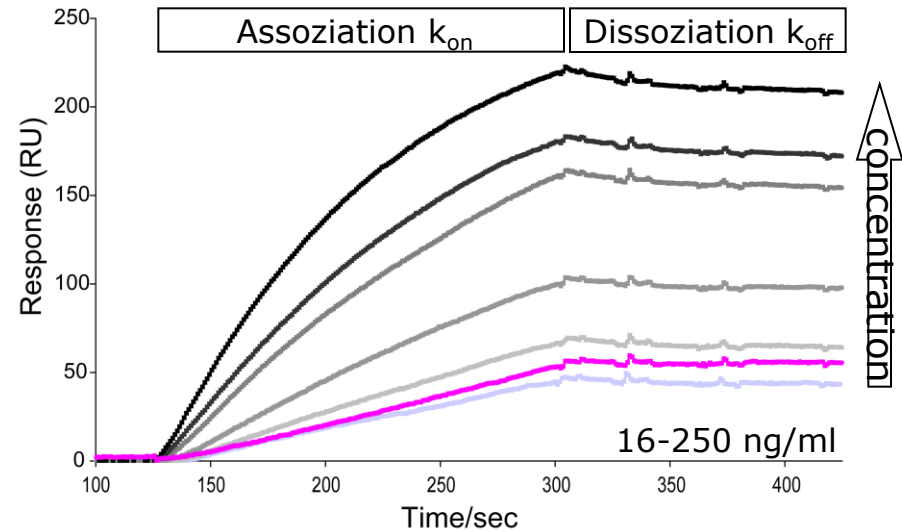


-Surface Plasmonen Resonanz
Spektroskopie (SPR)-

CM5™ Sensor Chip

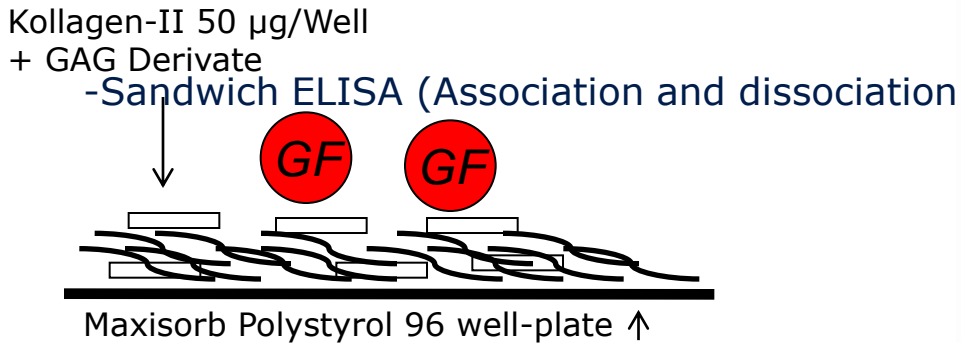


sHya2.8 Bindung von rhBMP-4

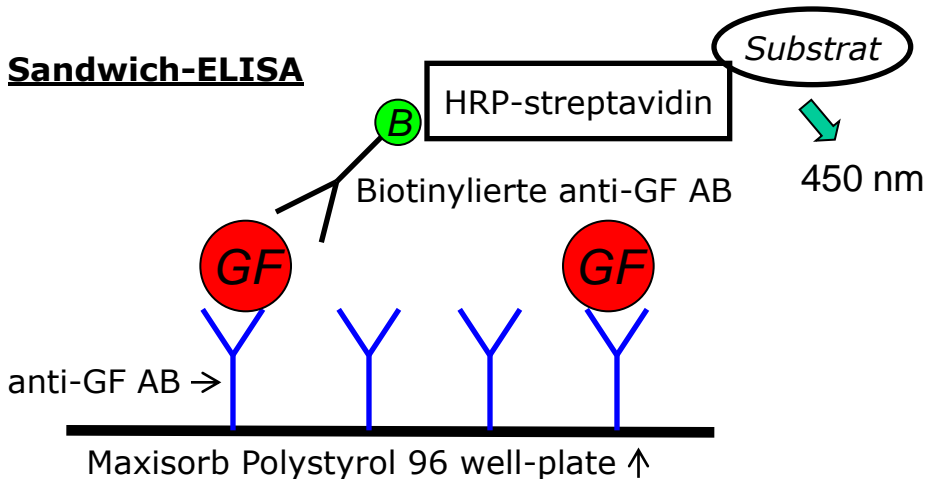


GAG Derivate	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	Chi ²
sHya2.8	$2.26 \cdot 10^7$	$4.58 \cdot 10^{-4}$	0.020	7.78
	$2.25 \cdot 10^7$	$2.94 \cdot 10^{-4}$	0.013	7,04
sHya1.0	$3.91 \cdot 10^4$	$4.47 \cdot 10^{-4}$	11.4	12.5
	$4.42 \cdot 10^4$	$3.24 \cdot 10^{-4}$	7.3	7.78

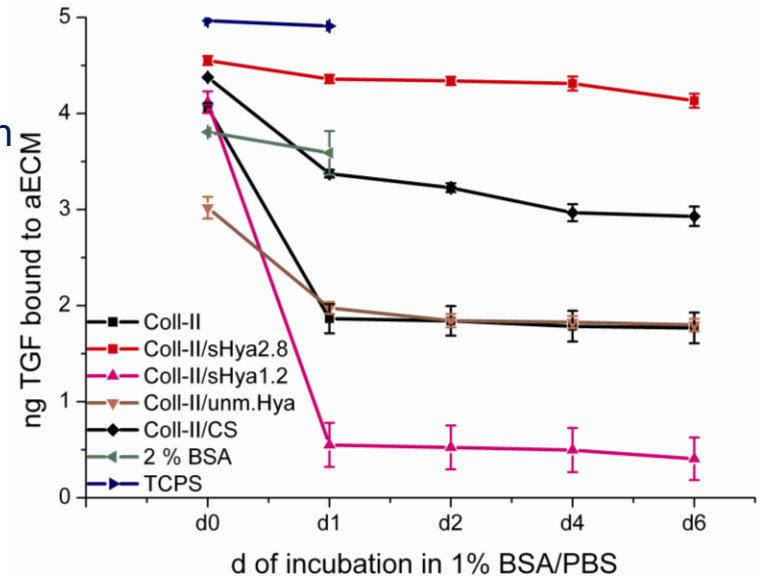
aECM-Beschichtung auf einer Polymeroberfläche



Sandwich-ELISA



TGF-β1 Bindung an aECM



Biomolekulare Oberflächenmodifizierung

Extrazelluläre Matrices : Kollagene

Calciumphosphatphasen

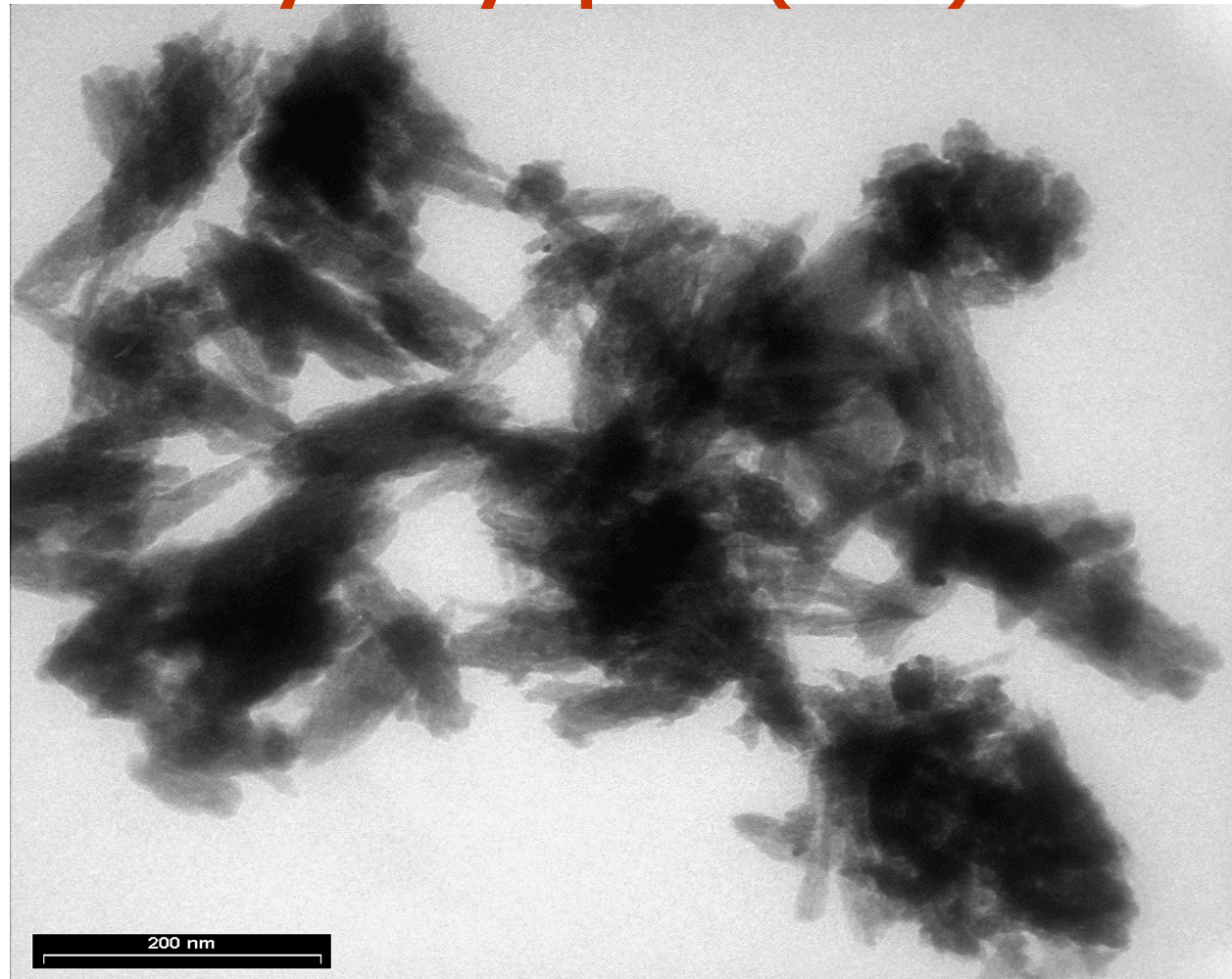
Polynukleotide

Die anorganisch nichtmetallische Komponente des Knochens Hydroxylapatit (HAP)

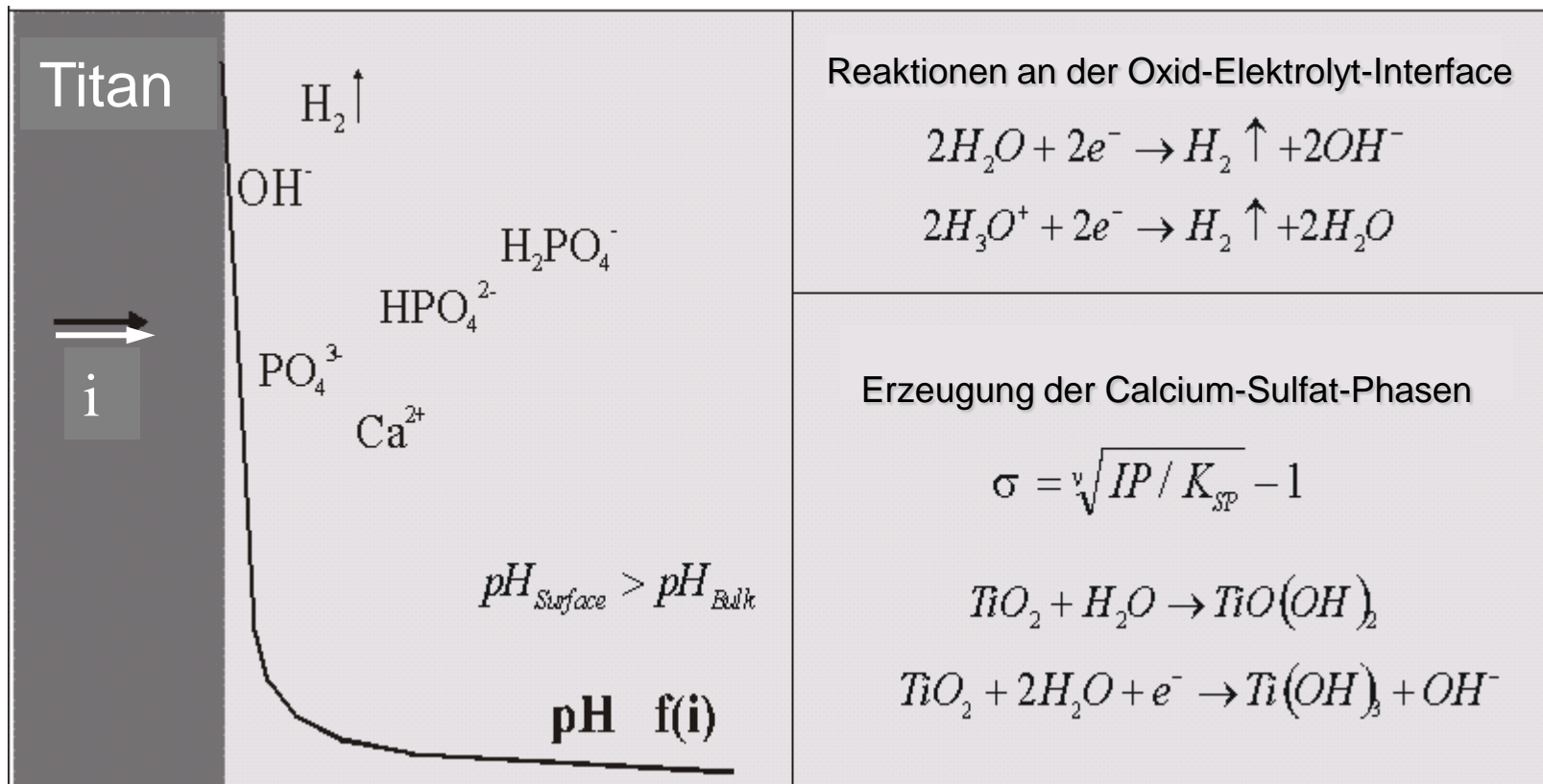


TEM-Image: HAP

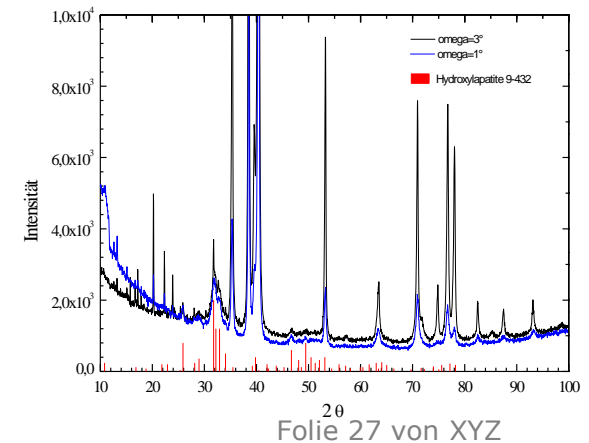
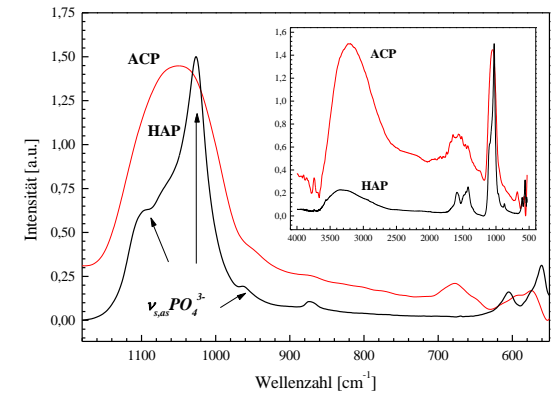
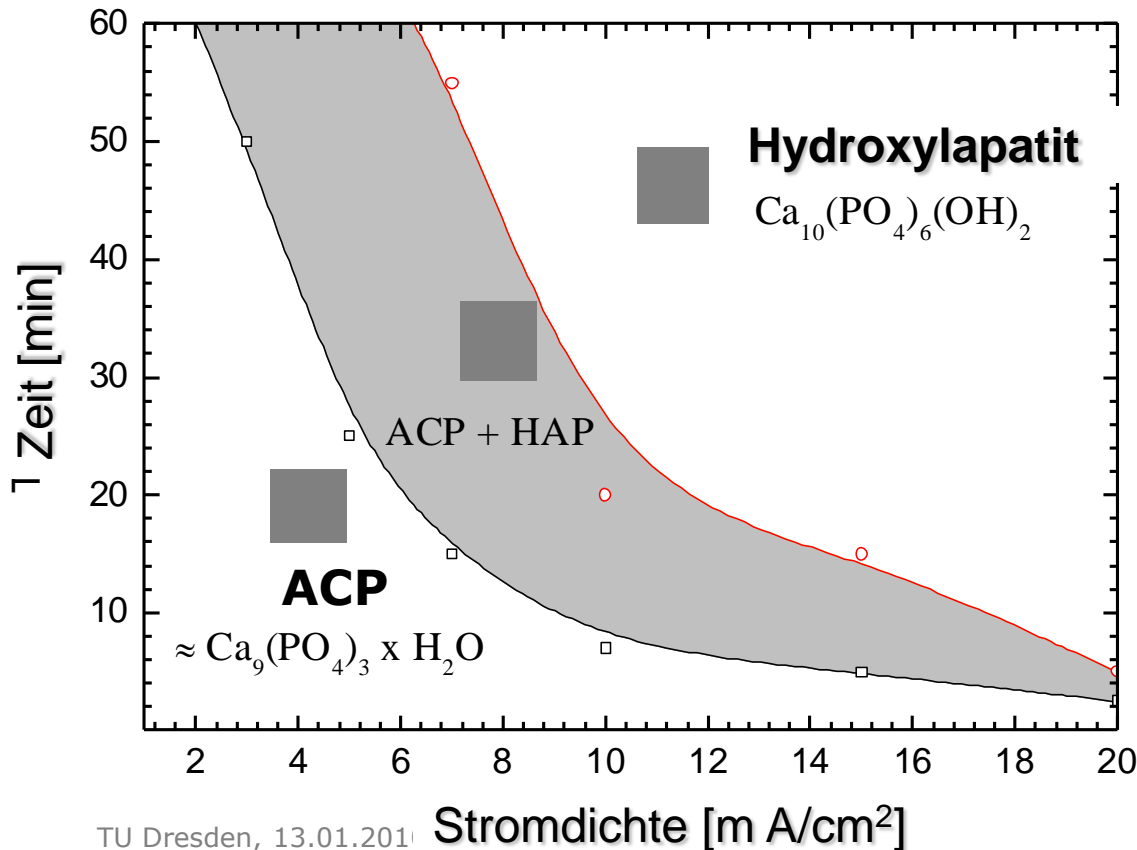
Kristalle: Dicke \approx 20-40 nm,
Länge \approx 300-500 nm



Erzeugung von Calciumphosphatphasen nach katodischer Polarisation



Kinetik der Transformation von amorphen (ACP) zu kristallinen Calcium-Phosphat-Phasen

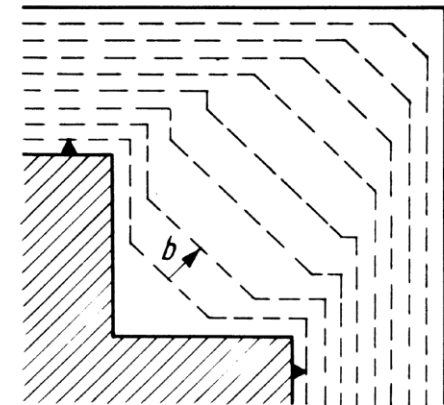
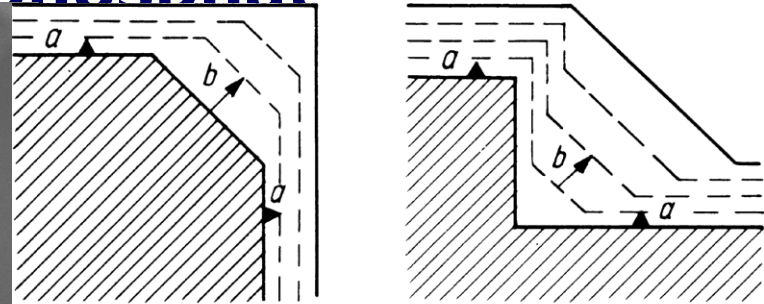


pH-Wert abhängige Bildung von Brushit und Octacalciumphosphat



Asp, 08.11.06, 1,0kV, 5mm, 500x

40 μ m



W.Schatt, H. Worch Hrsg.
Werkstoffwissenschaft
WILEY-VCH 2003

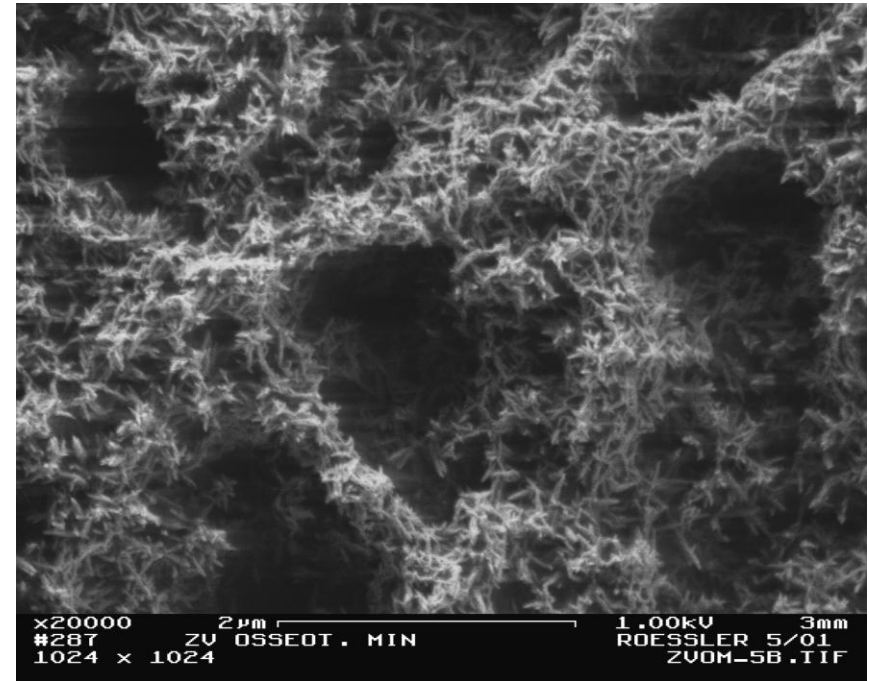
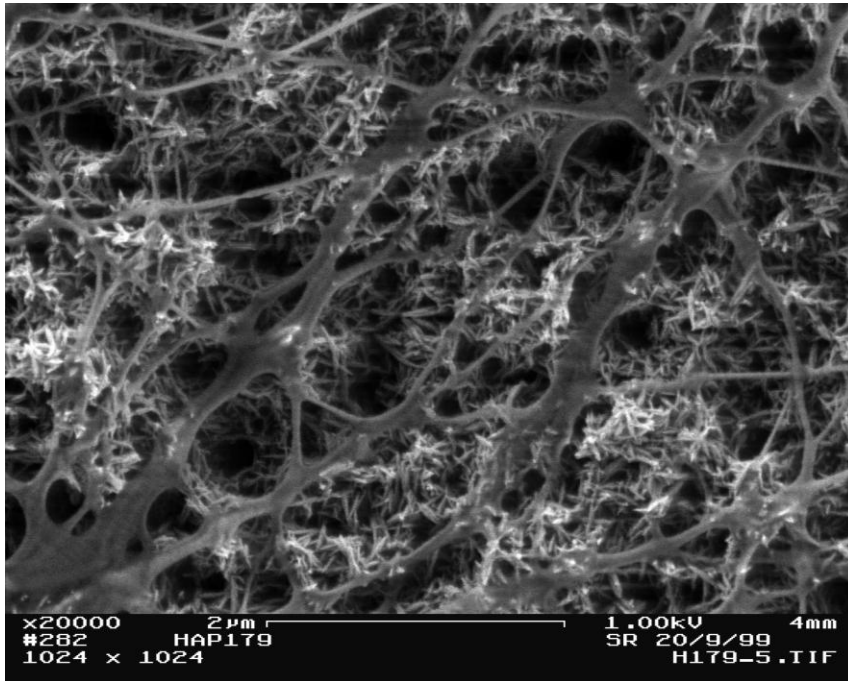
Hydroxylapatitbildung auf Kollagen I - Fibrillen

Mineralisationszeit

1 min

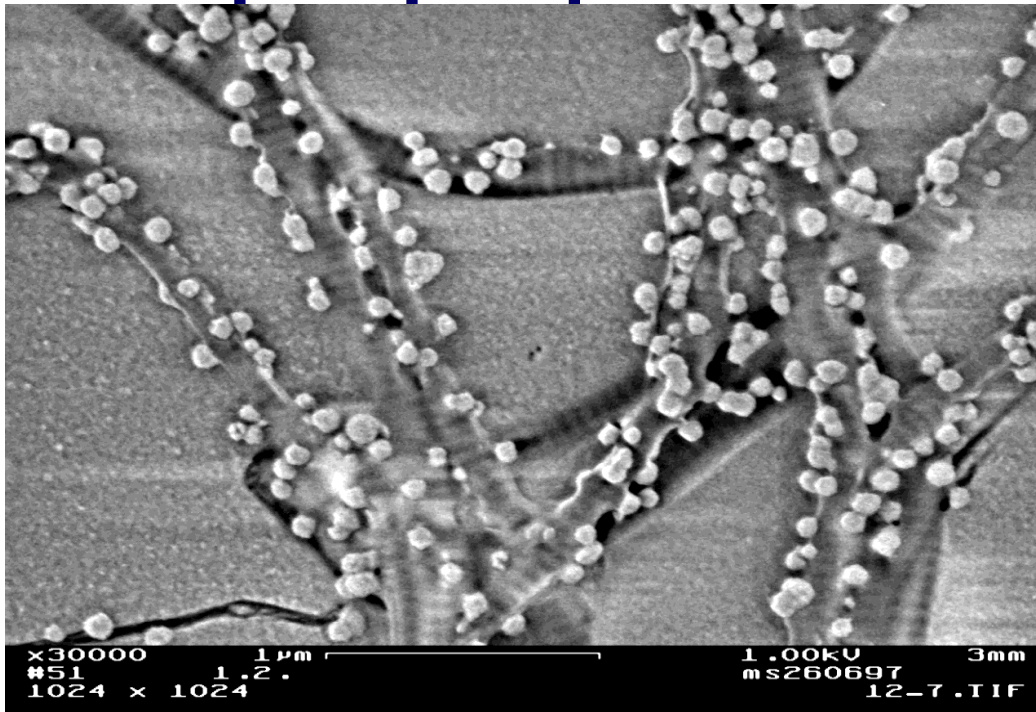


20 min



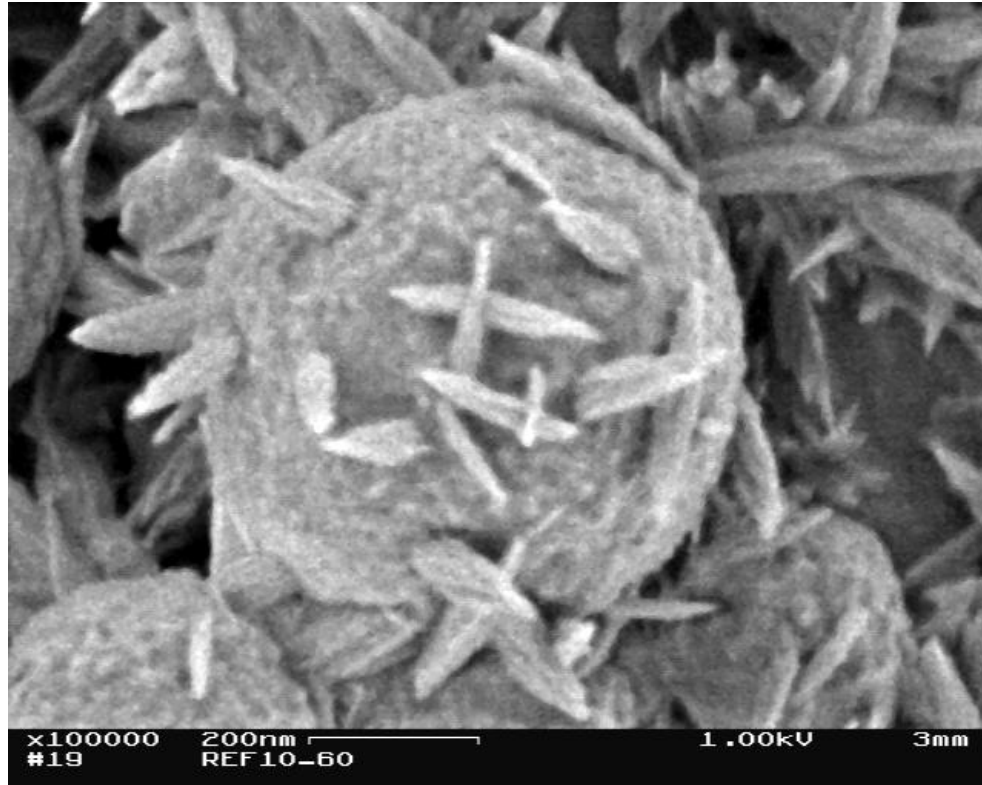
→ Maschenweite steuert Porengröße und -verteilung **Kollagenkonzentration: 0,5 mg/ml**

Mineralisation von amorphen Calciumphosphatphasen auf Kollagen I

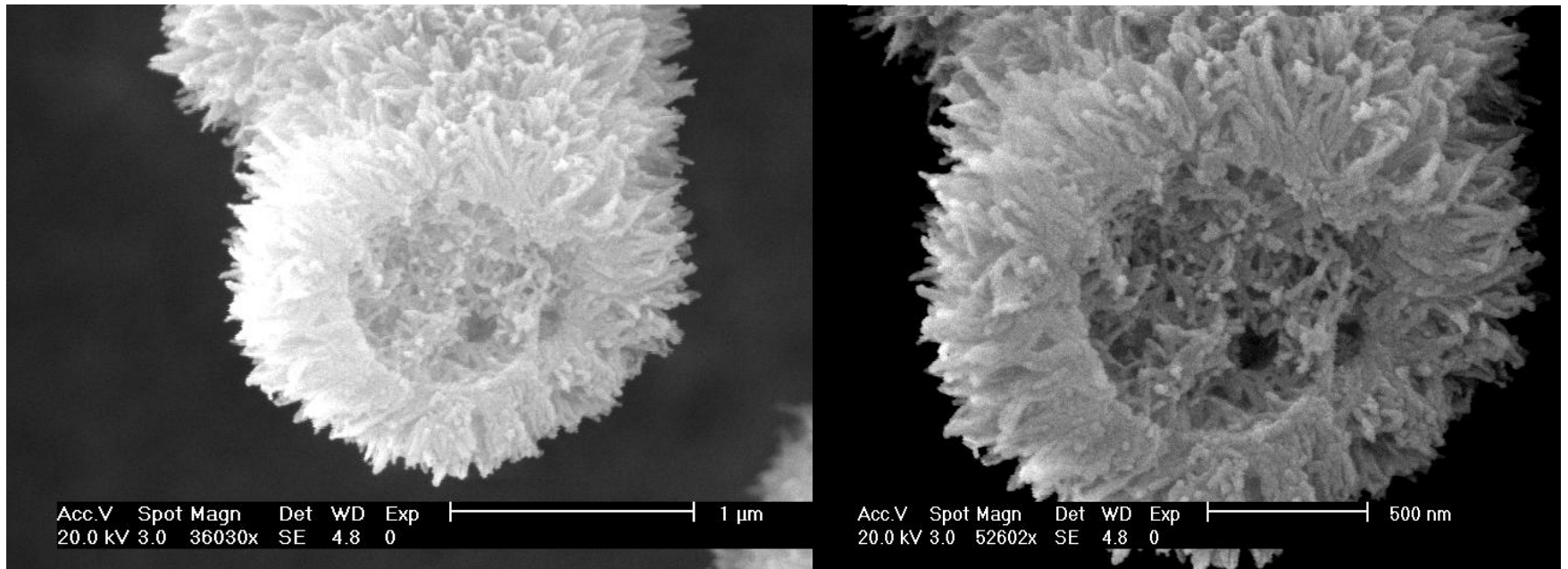


D. Scharnweber et.al. in BIOMATERIALS, 25(2004) 12, 2371-80.

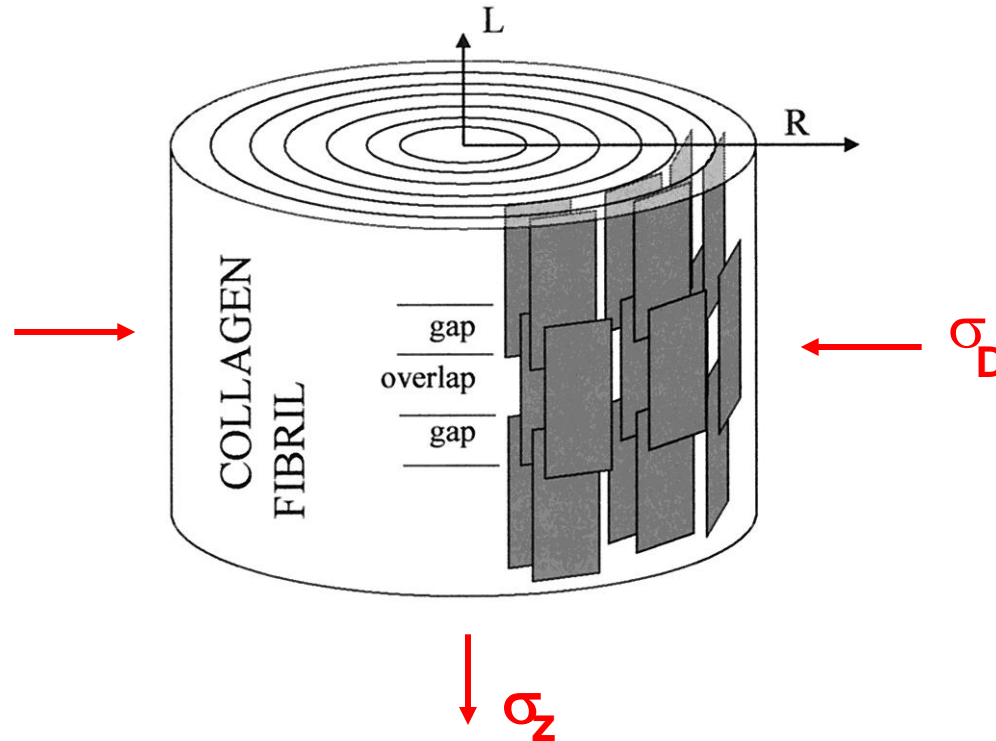
Kristallisation von HAP aus amorpher Calciumphosphatphase



Mineralisierte Kollagenfibrille



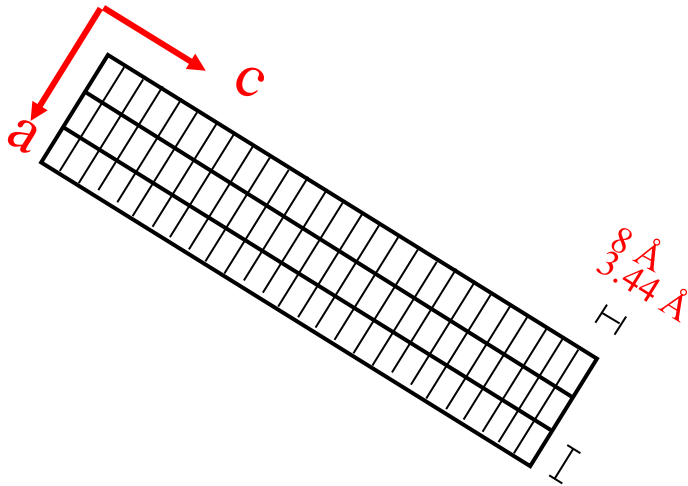
Schematische Darstellung zum mineralisierten Knochen*



*

I.Jäger und P. Fratzl: Mineralized Collagen Fibrils: A Mechanical Model with a Staggered Arrangement of Mineral Particles, Biophys.J, 2000, p.1737 - 1746 Vol.79, No.4

Netzebenenabbildung von Hydroxylapatitkristallen in Kollagen I



$$d = 8 \text{ \AA} \perp 3.44 \text{ \AA}$$

$$(100) \perp (002) \text{ \AA}$$

TU Dresden, 13.01.2010

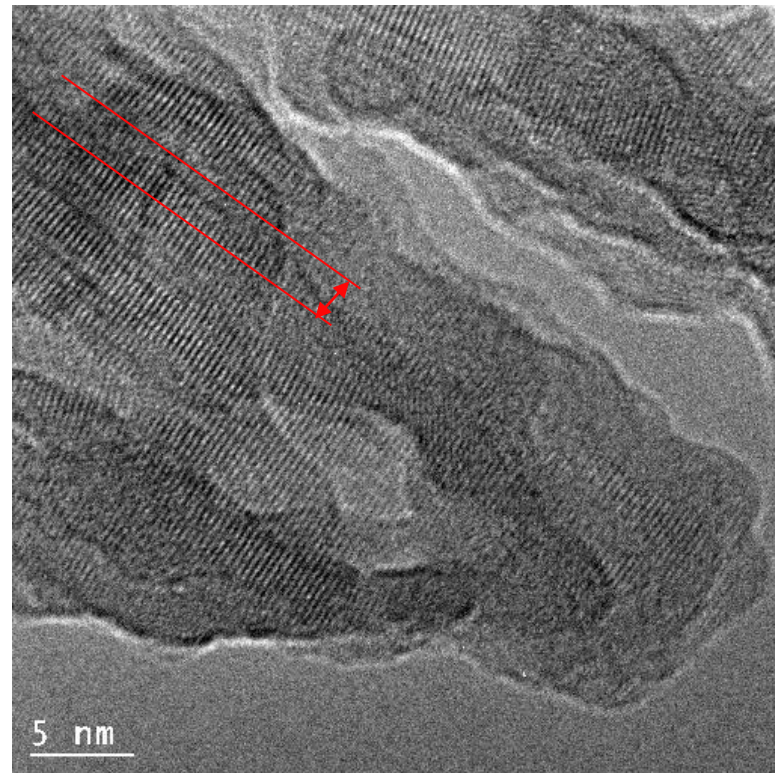
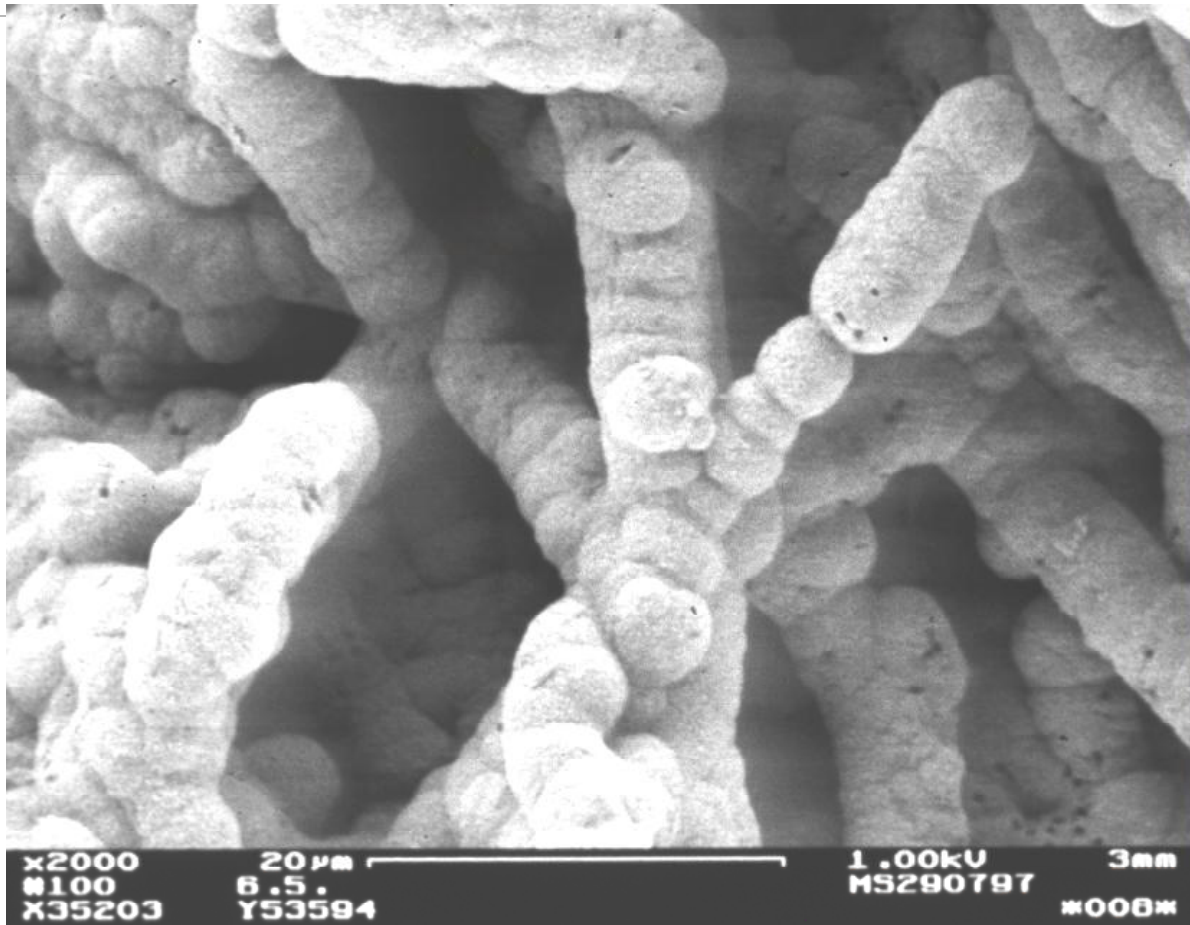
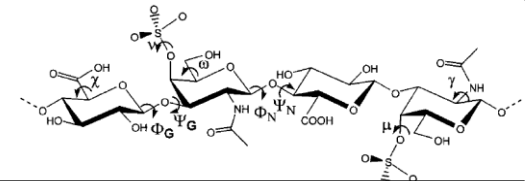
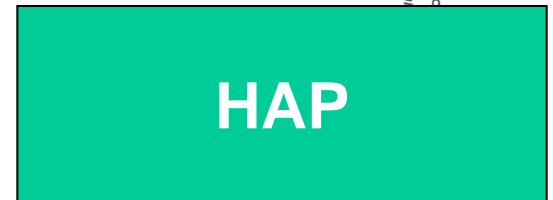
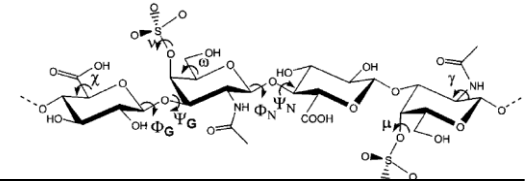
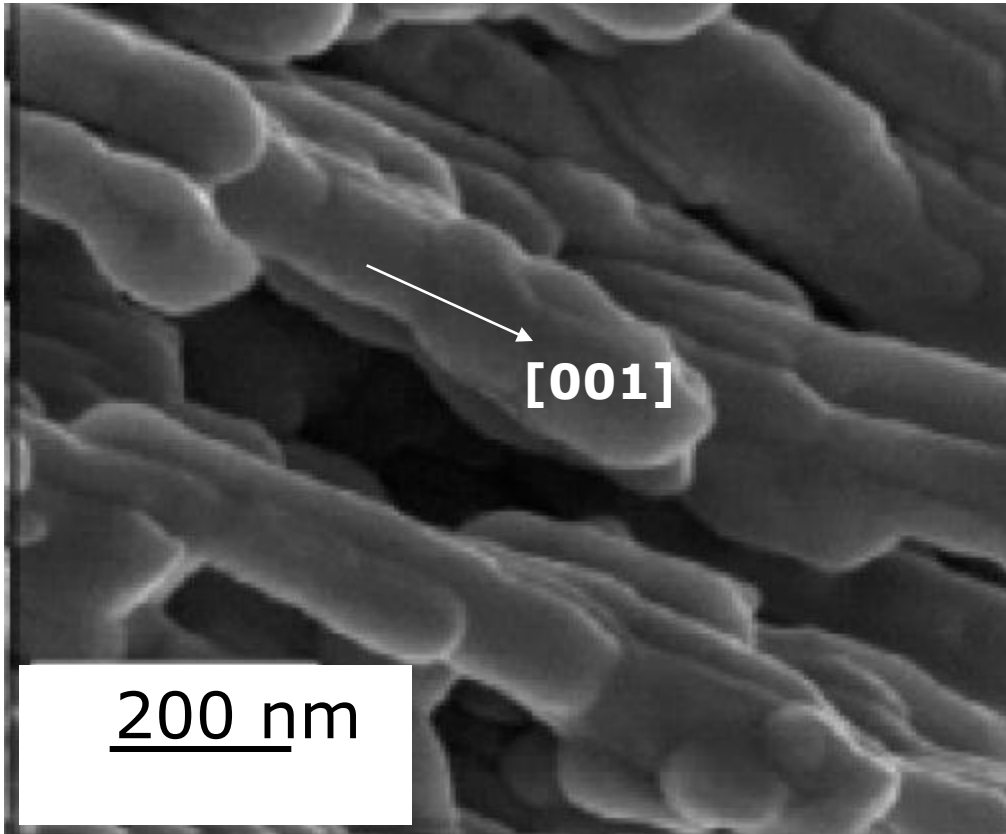


Abbildung: Dr. Seifert MPI Chemische Physik
fester Stoffe Dresden Z4



HAP- Kristallisation in Gegenwart von Chondroitinsulfat / Mesokristallbildung in Anlehnung an Untersuchungen von R.Kniep*

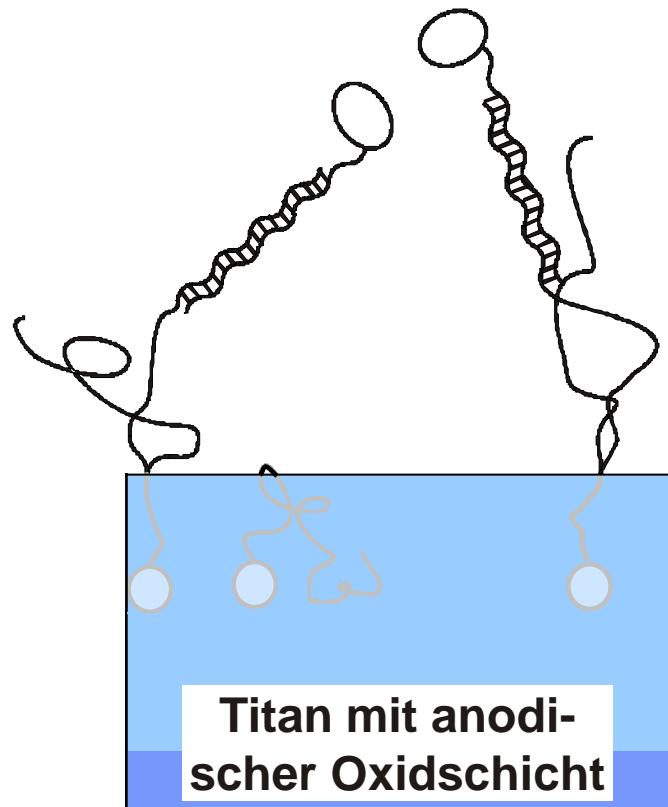


Biomolekulare Oberflächenmodifizierung

Extrazelluläre Matrices : Kollagene

Calciumphosphatphasen

Polynukleotide



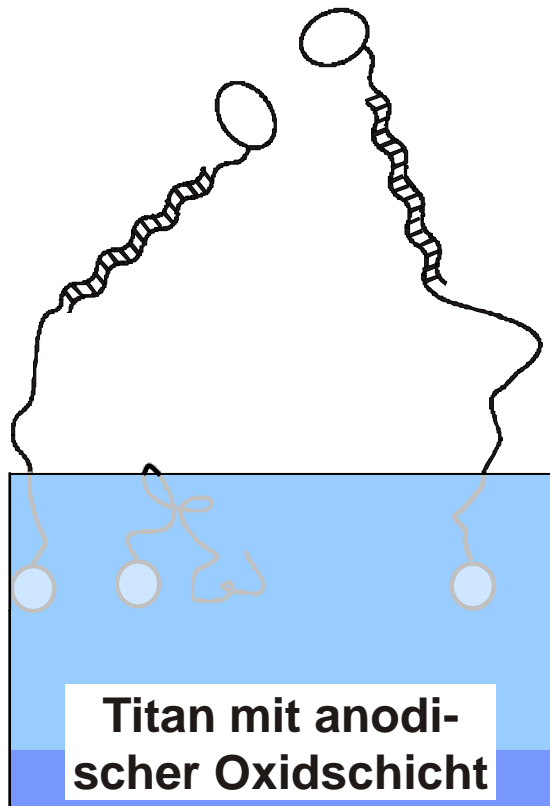
Immobilisierung

- Adsorption Nukleinsäure-einzelstränge als Ankerstränge (AS)
- Anodische Polarisation
⇒ Fixierung durch partiellen Einbau in anodische Oxidschicht

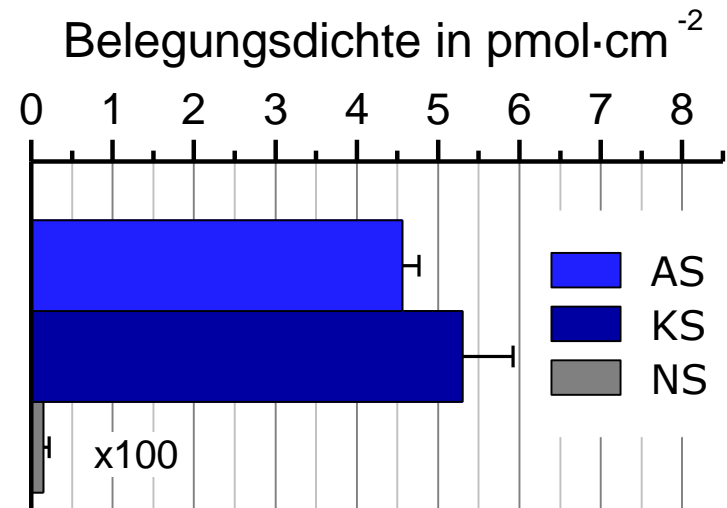
Hybridisierung

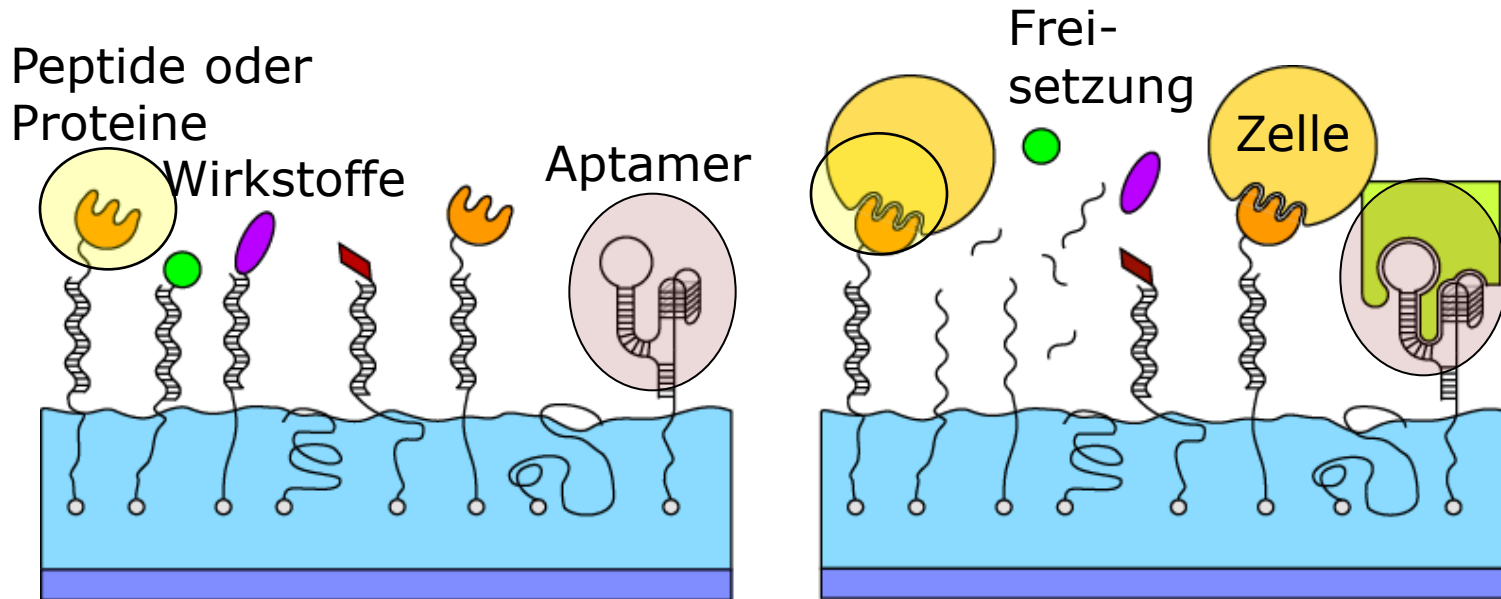
- Konjugate aus Komplementärsträngen (KS) und bioaktiven Molekülen

Modulares Immobilisierungssystem



Beutner, R. et al. 2009
Biomaterials, **30**, 2774-2781.





Michael et al. 2009, *Bioconjug Chem*, **20**, 710-718.

Guo et al. 2007, *Biomaterials*, **28**, 468-474.

Ausblick

Artifizielle Extrazelluläre Matrizes

bestehend aus Matrixproteinen und Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen haben ein großes Potenzial für eine positive Einflussnahme auf den Wundheilungsprozess

Die Wechselwirkungen mit Zellen des umgebenden Gewebes sind Gegenstand künftiger Untersuchungen

Danksagung

Wir danken der
Deutschen Forschungsgemeinschaft
für die Förderung des Transregio 67
und hoffentlich
Transregio 79 (Sprecher Prof.Dr. Schnettler)

Danksagung

eigene Arbeitsgruppe

Dr.rer.nat. Thomas Hanke

Dipl.-Ing. Sascha Heinemann

Dipl.-Ing. Christiane Heinemann

Dipl.-Ing. Rene Beutner

Prof. Dr. Dieter Scharnweber

Dr.rer.nat. Vera Hintze

Dr.-Ing. Ricardo Bernhard