

Grenzflächendesign zur Steuerung physikochemischer und biologischer Prozesse

Ralf Zimmermann, Babette Lanfer, Uwe Freudenberg, Tilo Pompe, Lars Renner, Manuela Herklotz und Carsten Werner

Workshop:

Wechselwirkung Material/Zelle – Oberflächeneigenschaften beeinflussen die Zelldifferenzierung

Hanau, 24. Februar 2011



MAX BERGMANN
center of biomaterials dresden

Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DRESDEN



Leibniz
Gemeinschaft

Joint initiative of Technische Universität Dresden (TUD) and Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. (IPF) to strengthen interdisciplinary research on biomaterials.

Unifies researchers and facilities from the Institute of Material Science at the TUD and the IPF to work on biology-inspired materials.

MBC researchers actively contribute to the Center of Regenerative Therapies Dresden (CRTD) and the Innovation Center for Molecular Bioengineering (B CUBE).

Genius loci

Max Bergmann (1886–1944)

- Director of the Kaiser Wilhelm Institute of Leather Research (1920 to 1933), which was located in the place of today's IPF and MBC
- A pioneer of protein and peptide science, founder of a world-leading protein laboratory at Rockefeller University



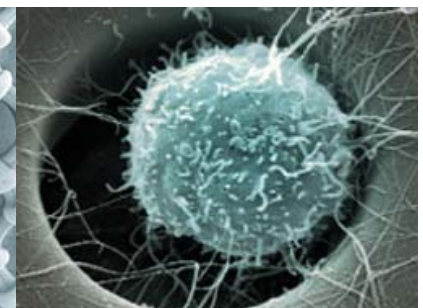
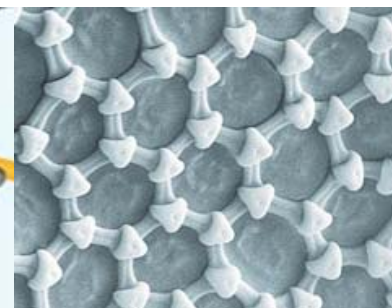
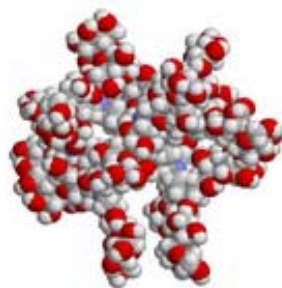
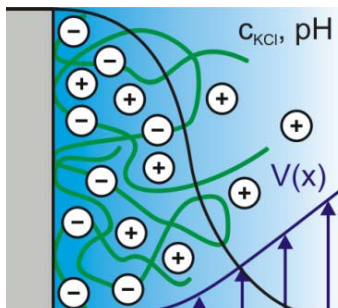


Mission and approach

Molecular Bioengineering: Towards Biology-Inspired Materials

Progress in molecular life sciences provokes ambitious strategies for new materials to enable demanding applications such as regenerative medicine and nanotechnology.

The resulting tasks link basic science with applied research and require interdisciplinary work beyond traditional structures.



Grenzflächendesign zur Steuerung physiko- chemischer und biologischer Prozesse

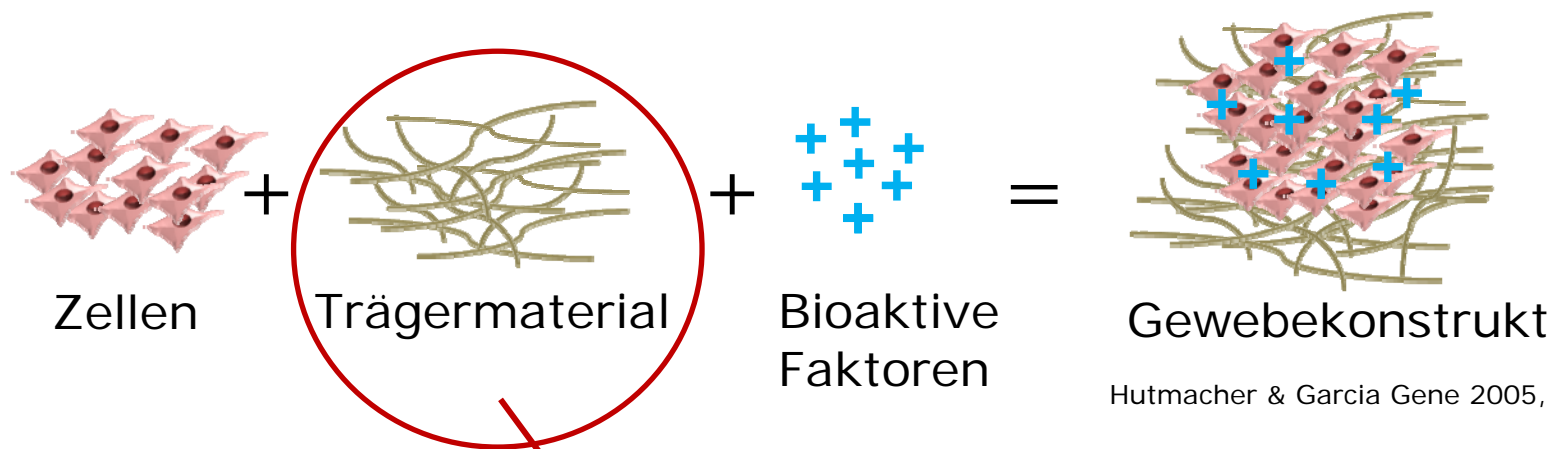
- (i) Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering**
- (ii) Oberflächeneigenschaften modulieren Zelladhäsion**

Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering

- **Einleitung**
- Erzeugung ausgerichteter Kollagenfibrillen
- Zelluläre Interaktionen mit ausgerichteten Kollagenfibrillen
- Ausgerichtete Kollagenfibrillen in Kapillarmembranen

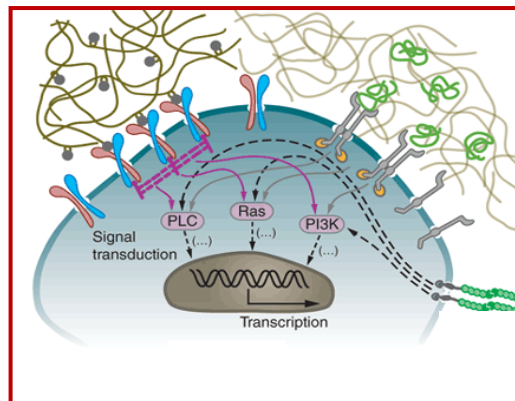
ZIELE TISSUE ENGINEERING

- Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen im Gewebe
- Entwicklung von biologischem Gewebeersatz



Hutmacher & Garcia Gene 2005, 347, 1

Vorbild: Extrazelluläre Matrix



Lutolf & Hubbell, Nature Biotechnology 2005, 23, 47

EXTRAZELLULÄRE MATRIX

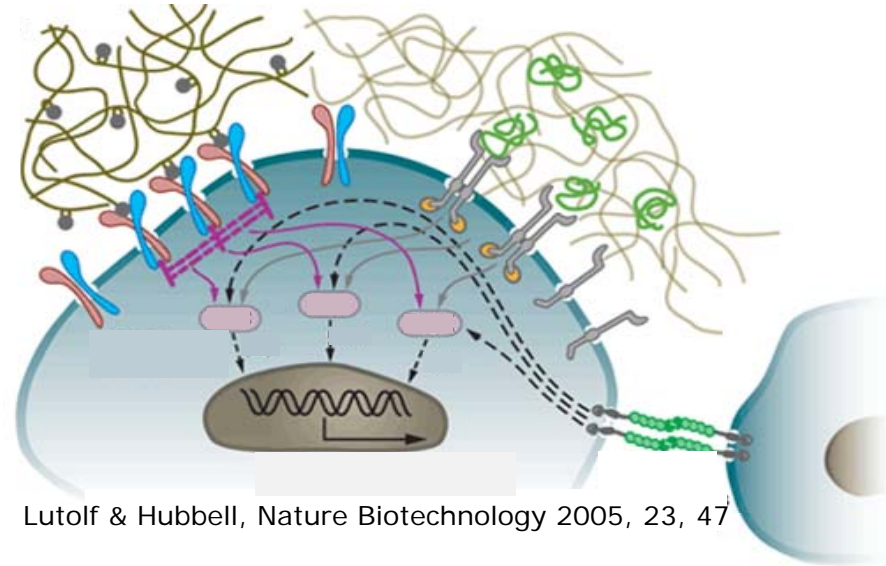
Überstrukturen bildende Proteine

z. B. Kollagene I, II, IV ...

+

Polysaccharide

z. B. Glykosaminoglykane
wie Heparansulfat



Lutolf & Hubbell, Nature Biotechnology 2005, 23, 47

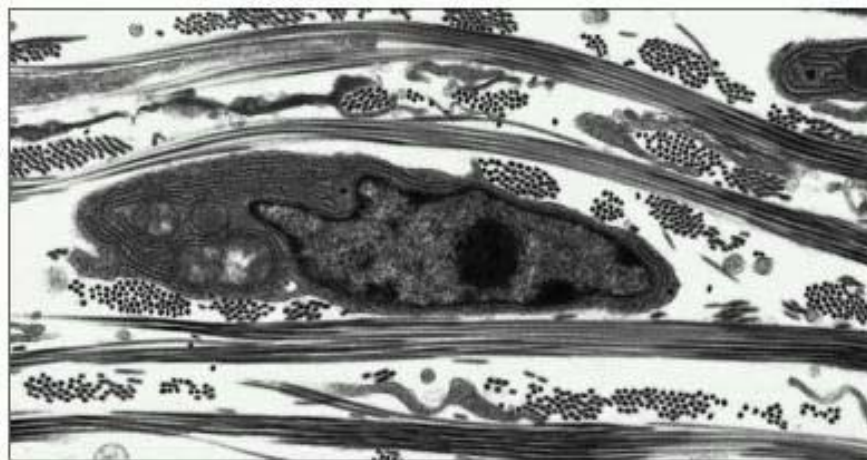
➔ Zelle sezerniert extrazelluläre Matrix und baut sie wieder ab →
wechselseitige Beeinflussung → Nachahmung durch Trägermaterial

➔ Strategien:

- Dezellularisiertes Gewebe
- Synthetische Materialien
- Rekonstitution von einzelnen Matrix-Biopolymerstrukturen
z. B. von fibrillärem Kollagen Typ I
- Biohybrid-Materialien

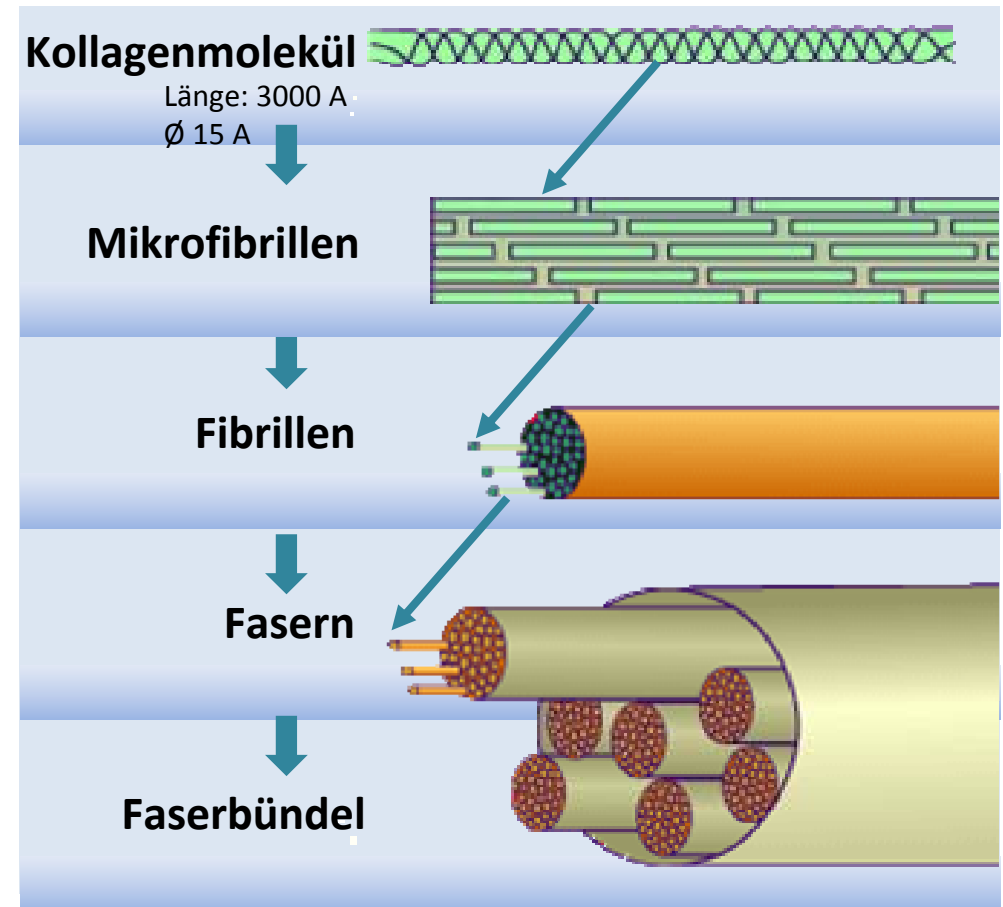
KOLLAGEN TYP I

- Häufigstes Kollagen der extrazellulären Matrix
- Fibrillen liegen in Sehnen, Muskeln, Haut und Knochen **ausgerichtet** vor



Ploetz et al., *J. Struct. Biol.* 1991, 106, 73

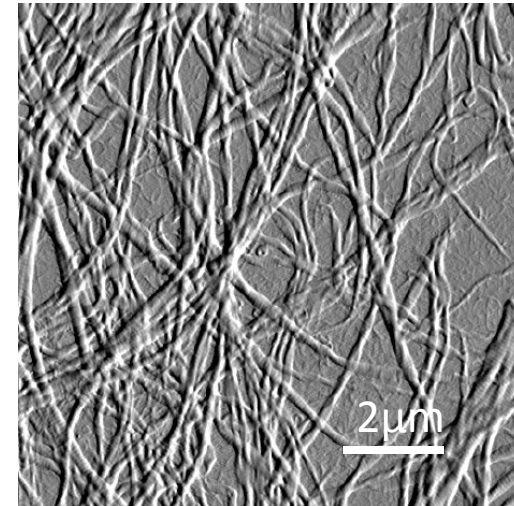
1µm



KOLLAGEN TYP I – *in vitro*

Kollagen Typ I Fibrillen können *in vitro* aus Lösung rekonstituiert werden (gesteuert durch Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke)

... **diese sind jedoch ungerichtet**



Fibrillenausrichtung: ändert die physikalischen Matrixeigenschaften und beeinflusst somit das Zellverhalten

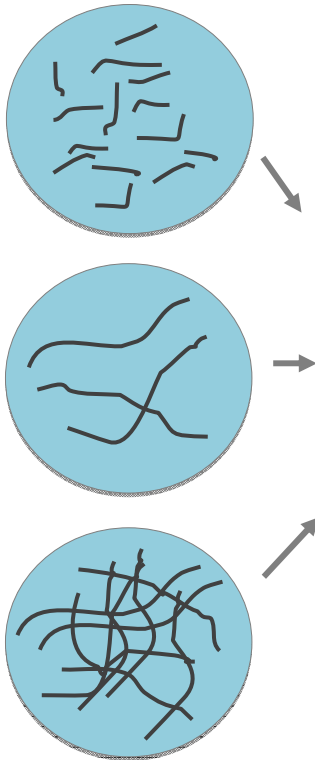
➡ Entwicklung von Methoden zur Bereitstellung orientierter Matrices

Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering

- Einleitung
- **Erzeugung ausgerichteter Kollagenfibrillen**
- Zelluläre Interaktionen mit ausgerichteten Kollagenfibrillen
- Ausgerichtete Kollagenfibrillen in Kapillarmembranen

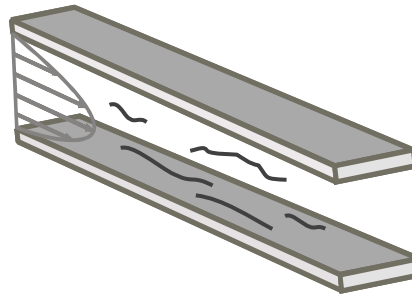
Erzeugung ausgerichteter Kollagenfibrillenmatrixes

Kollagenhaltiges
Medium



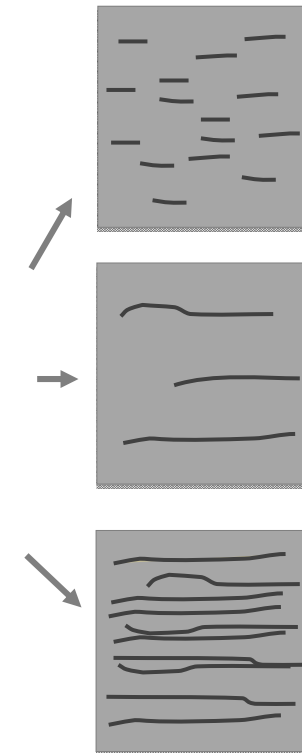
Mikroflusssystem

Ausrichtung durch
Scherwirkung der
laminaren Strömung

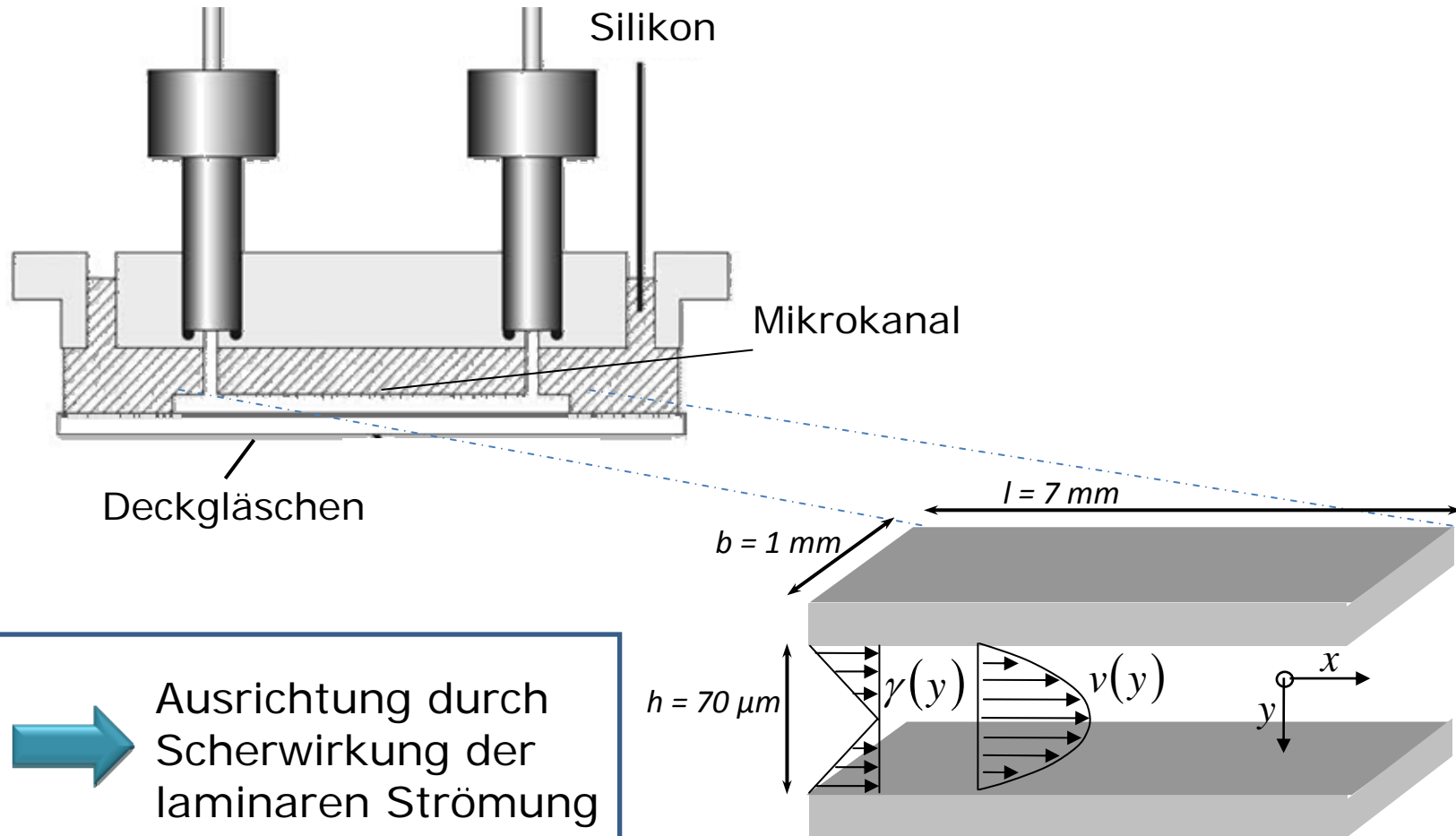


$$\gamma(y) = \frac{dv_x(y)}{dy}$$

Oberflächengebundene
Matrixes



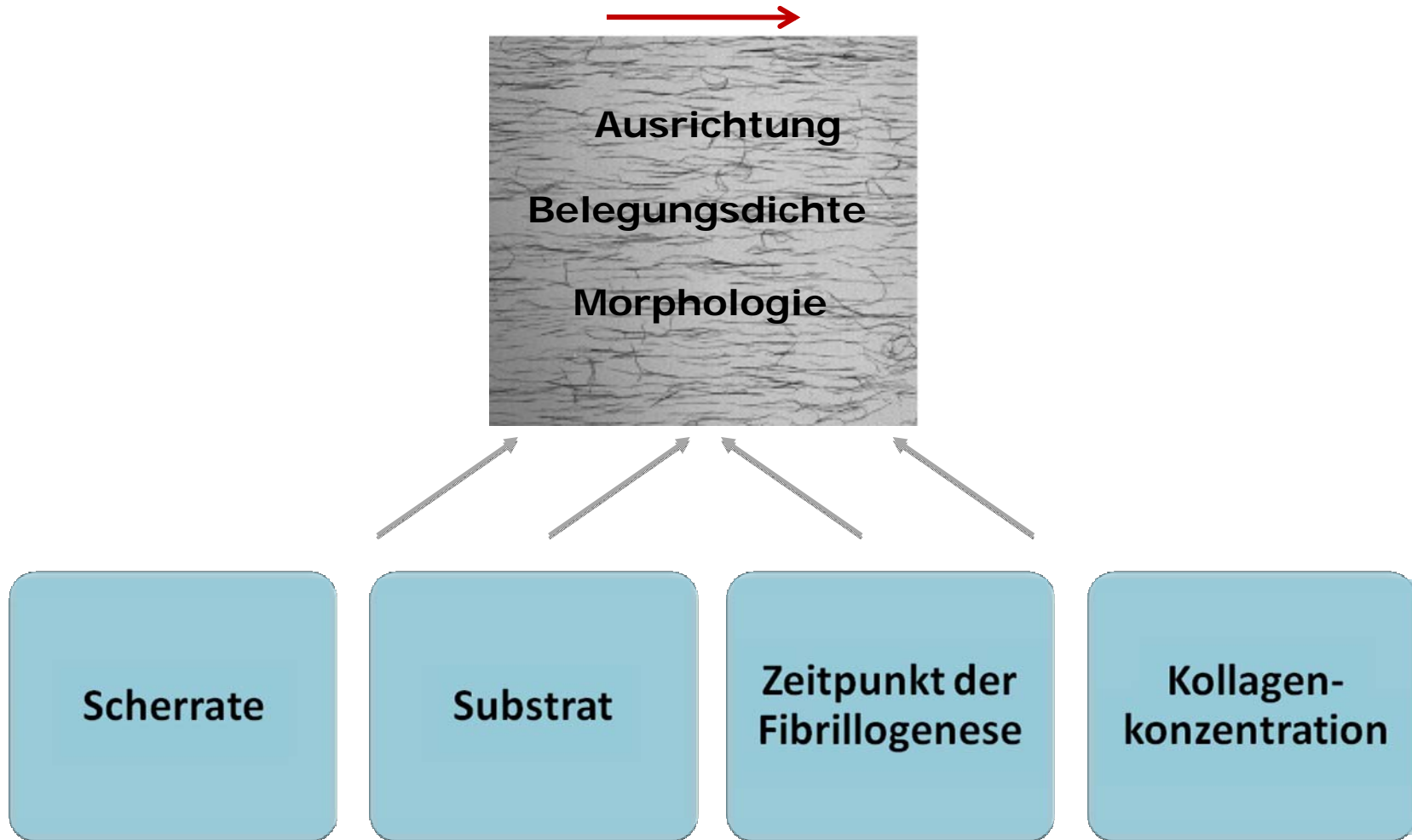
MIKROFLUSSSYSTEM



➔ Ausrichtung durch Scherwirkung der laminaren Strömung

$$\text{Scherrate: } \gamma(y) = \frac{dv_x(y)}{dy}$$

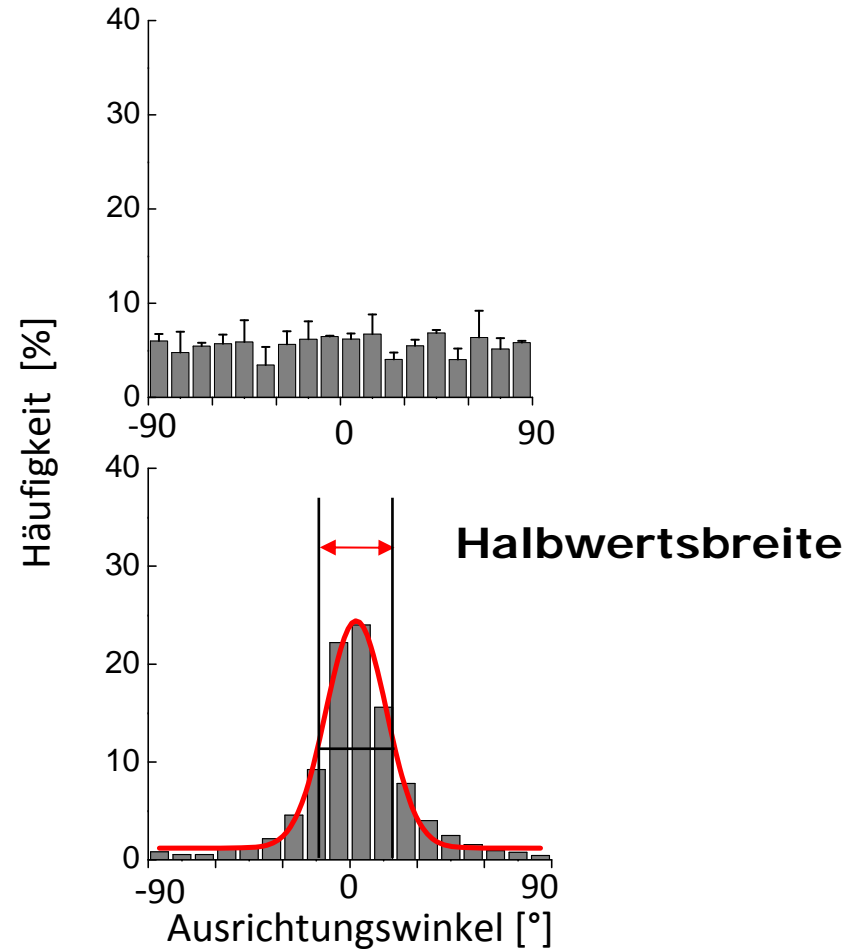
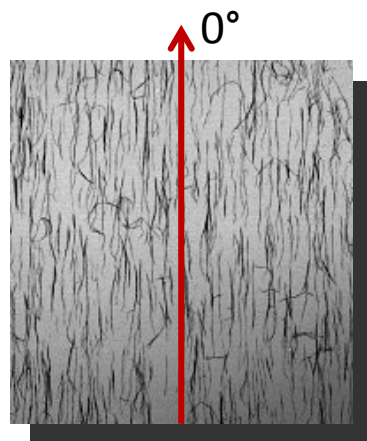
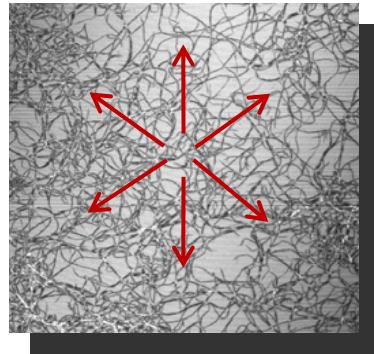
Einflussparameter



Charakterisierung ausgerichteter Kollagenfibrillenmatrices

Belegungsdichte: prozentualer Flächenanteil Kollagenfibrillen

Ausrichtung:

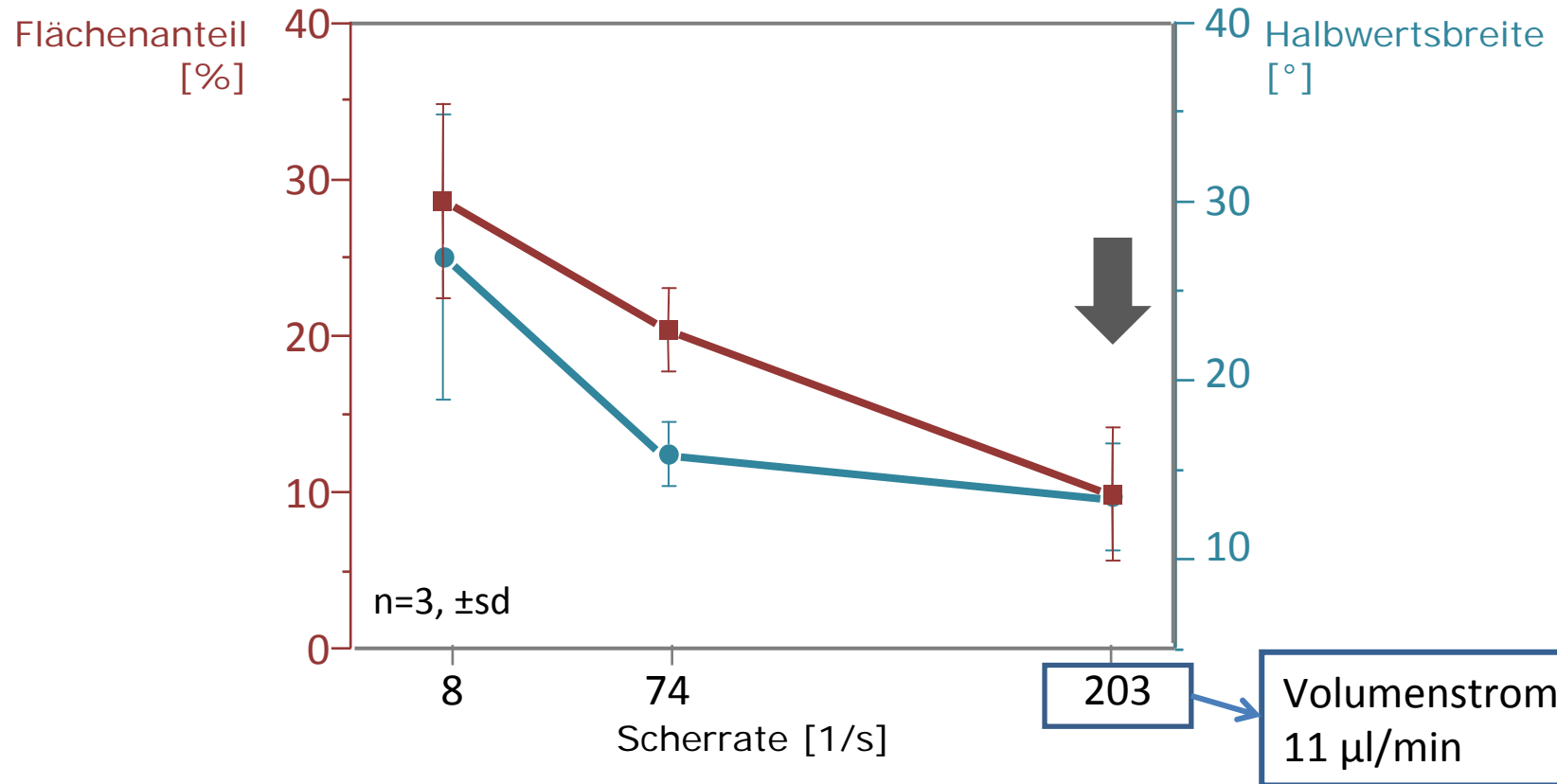


→ je kleiner die Halbwertsbreite um so besser ist die Ausrichtung in Flussrichtung

EINFLUSS SCHERRATE

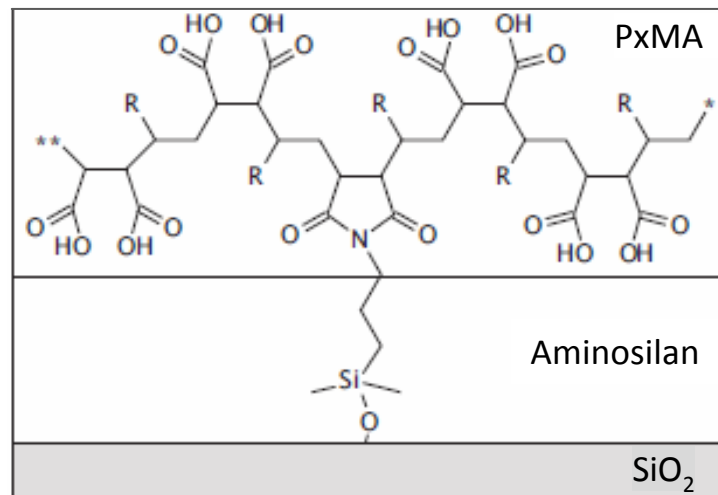
Belegungsdichte

Ausrichtung



⇒ Erhöhung der Scherrate resultiert in höherer Ausrichtung und geringerer Belegungsdichte

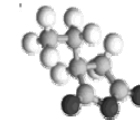
EINFLUSS SUBSTRAT



Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)
– (POMA)

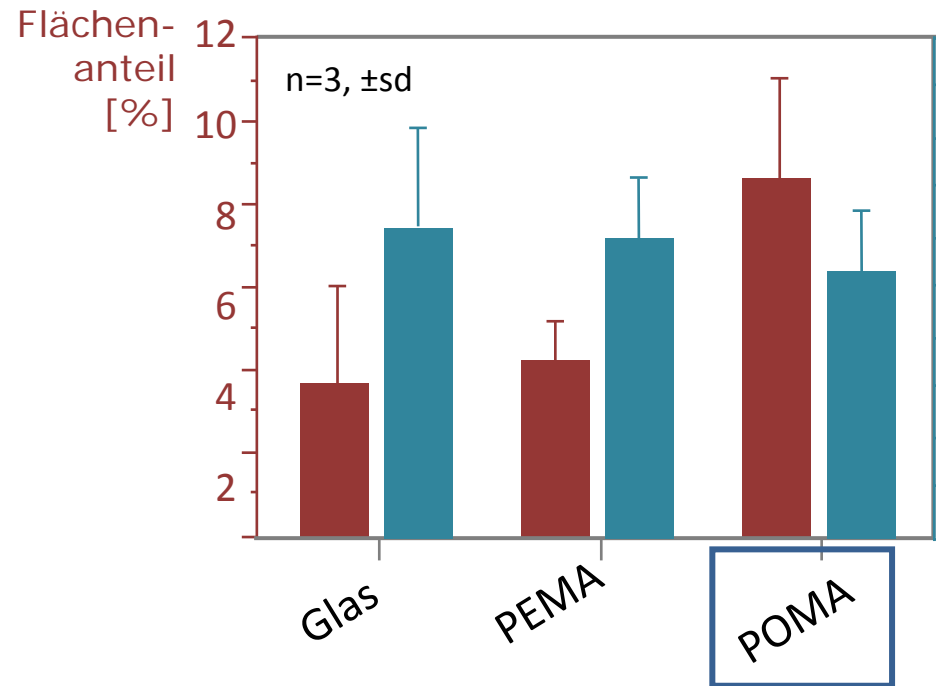


Poly(ethylen-alt-maleinsäureanhydrid)
– (PEMA)



EINFLUSS SUBSTRAT

Belegungsdichte

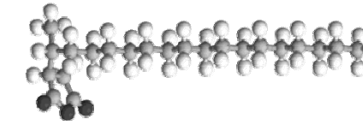


Ausrichtung

25 Halbwertsbreite
[°]

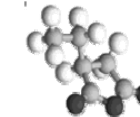
Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)

– (POMA)



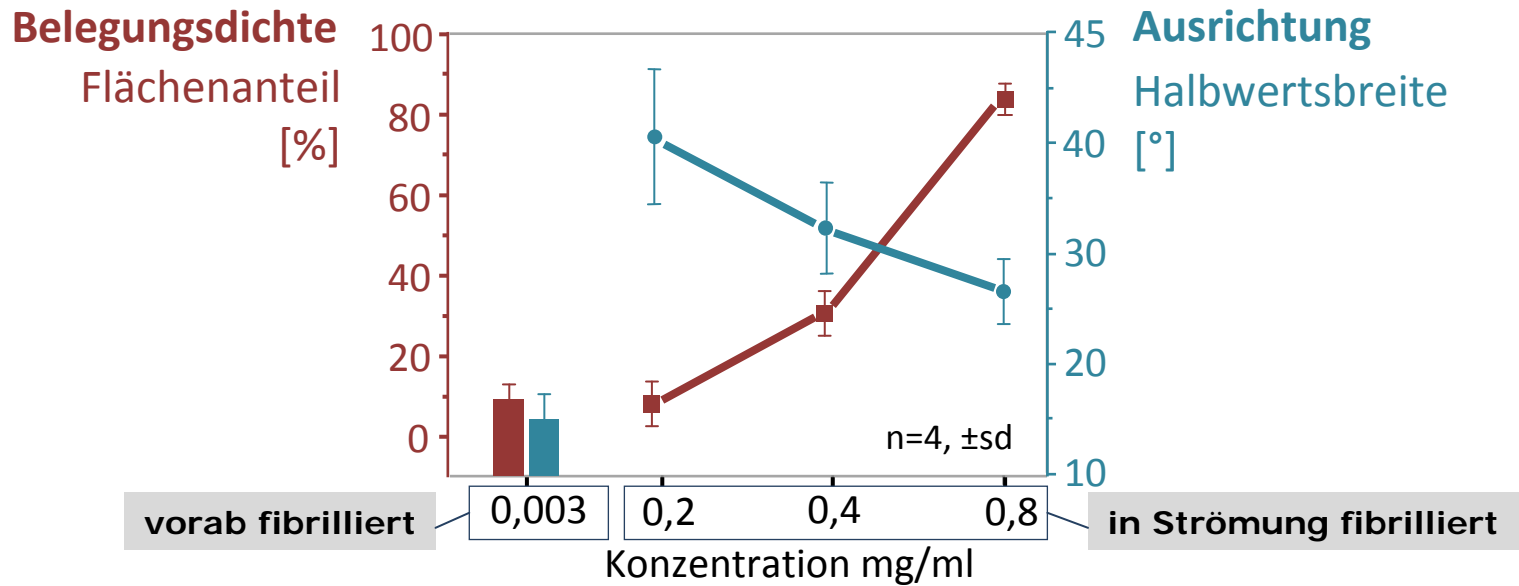
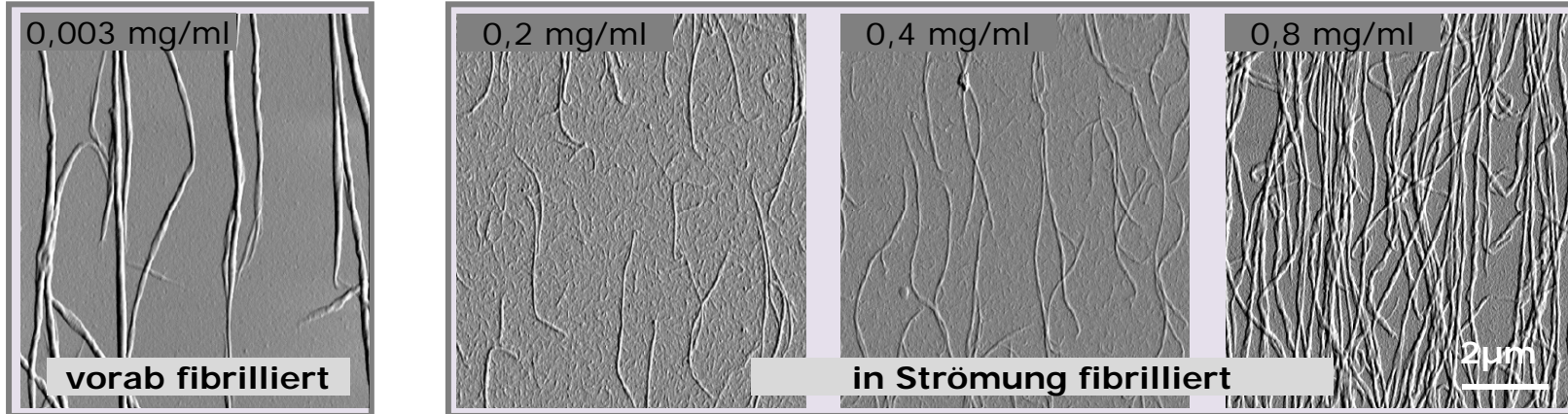
Poly(ethylen-alt-maleinsäureanhydrid)

– (PEMA)



⇒ Hydrophobizität des Substrats erhöht die Belegungsdichte bei gleichbleibend hoher Ausrichtung

EINFLUSS FIBRILLOGENESE/KONZENTRATION



⇒ Zeitpunkt der Fibrillogenese und Kollagenkonzentration beeinflussen Ausrichtung, Belegungsdichte und Morphologie

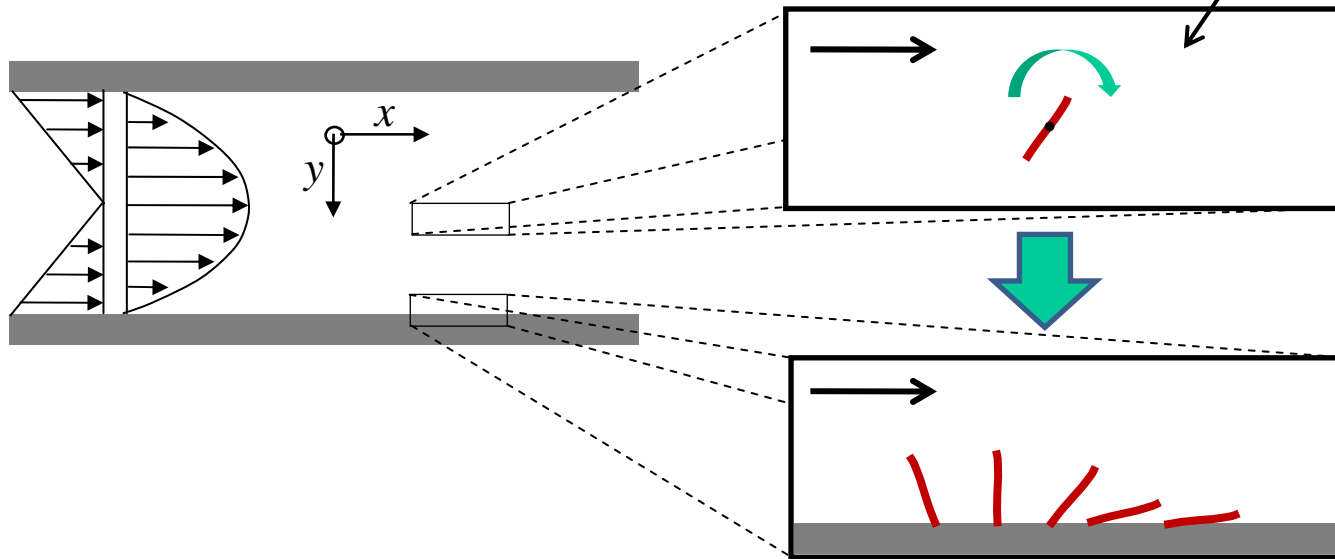
Anlagerungsmechanismus

Zunahme von Scherrate (vorfibrilliertes System) und Fibrillenlänge erhöht die Ausrichtung



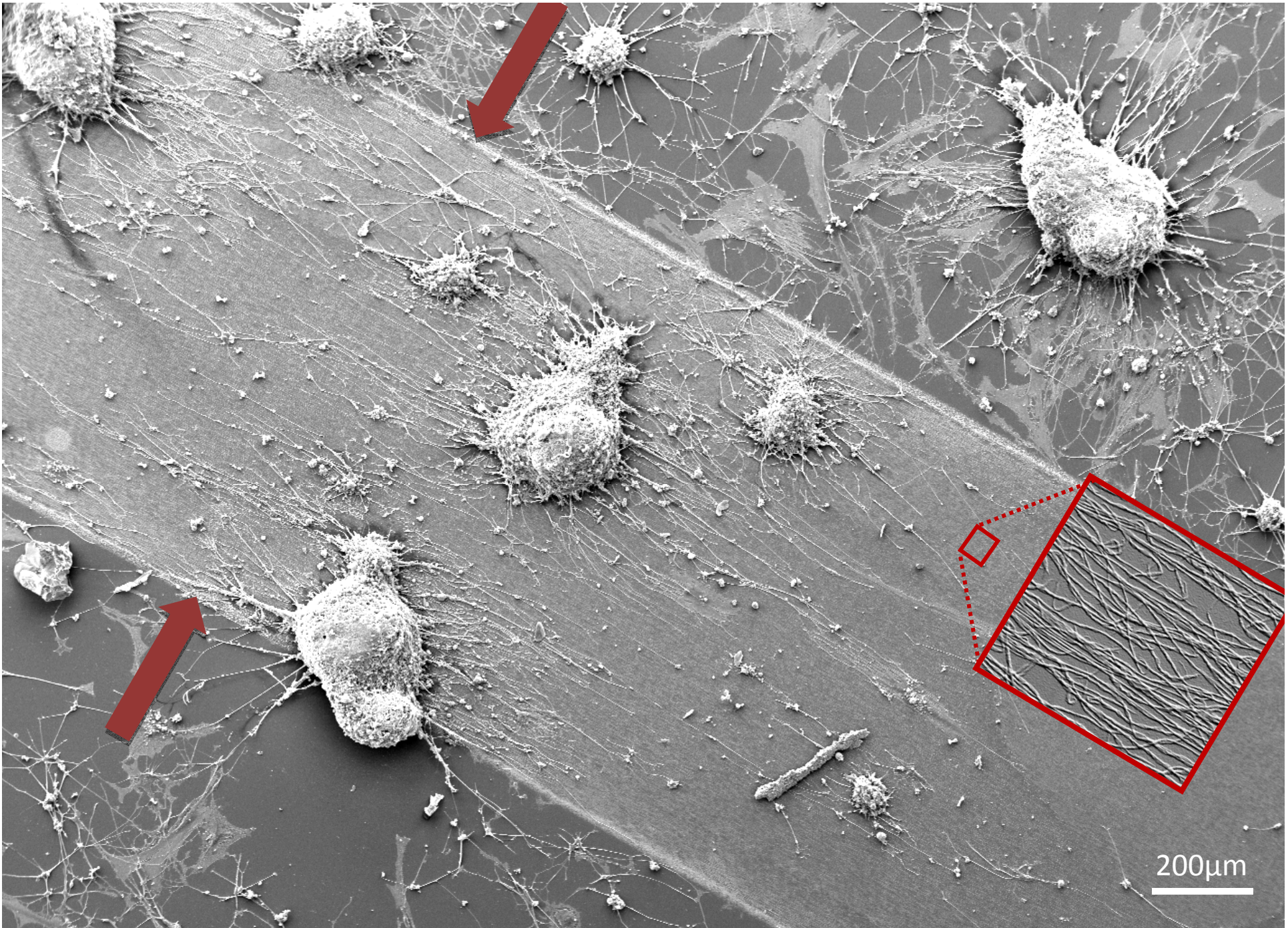
Zusammenspiel mehrerer Effekte:
Flipbewegung (Jefferey, 1920)

Steifigkeit Fibrille: 5,5GPa



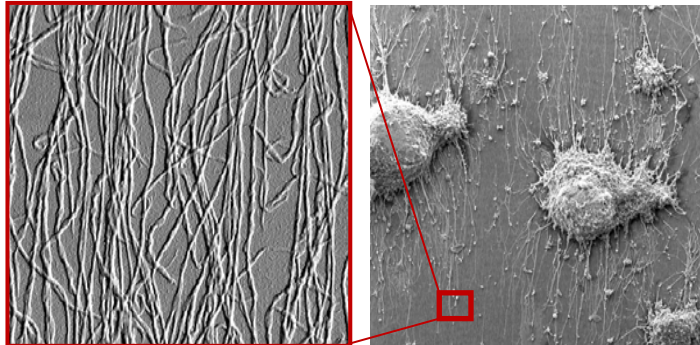
Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering

- Einleitung
- Erzeugung ausgerichteter Kollagenfibrillen
- **Zelluläre Interaktionen mit ausgerichteten Kollagenfibrillen**
 - a) Neuronale Stammzellen
- Ausgerichtete Kollagenfibrillen in Kapillarmembranen

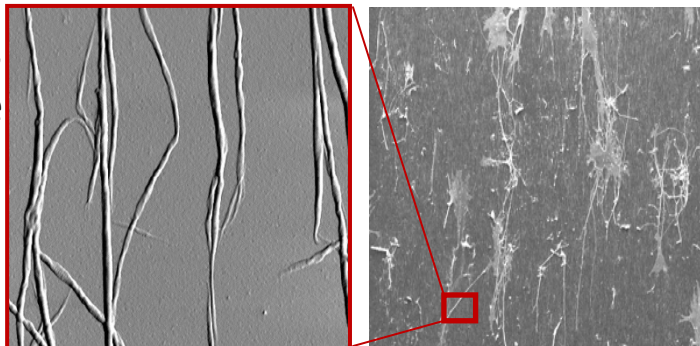


NEURONALE STAMMZELLEN

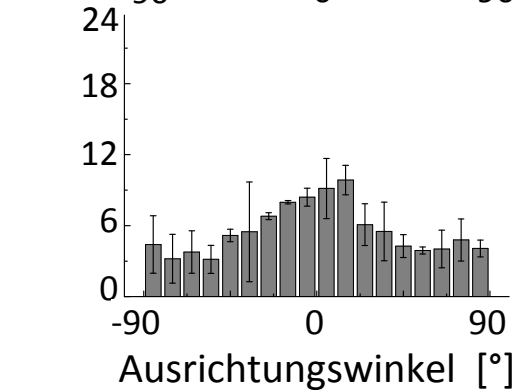
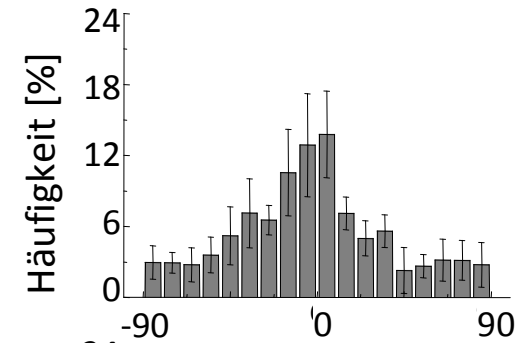
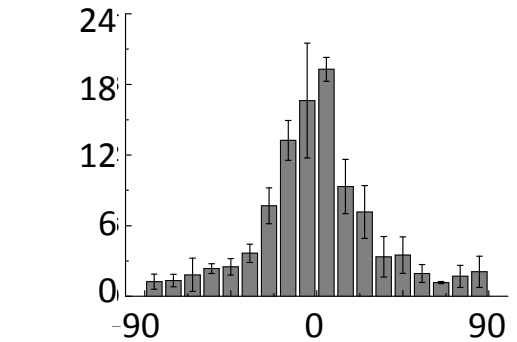
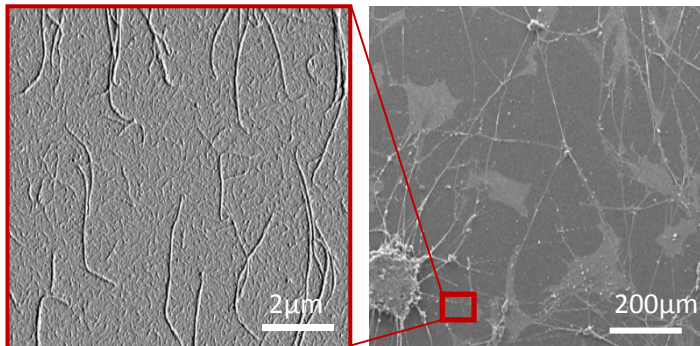
Lange Fibrillen,
hohe Dichte



Lange Fibrillen,
niedrige Dichte



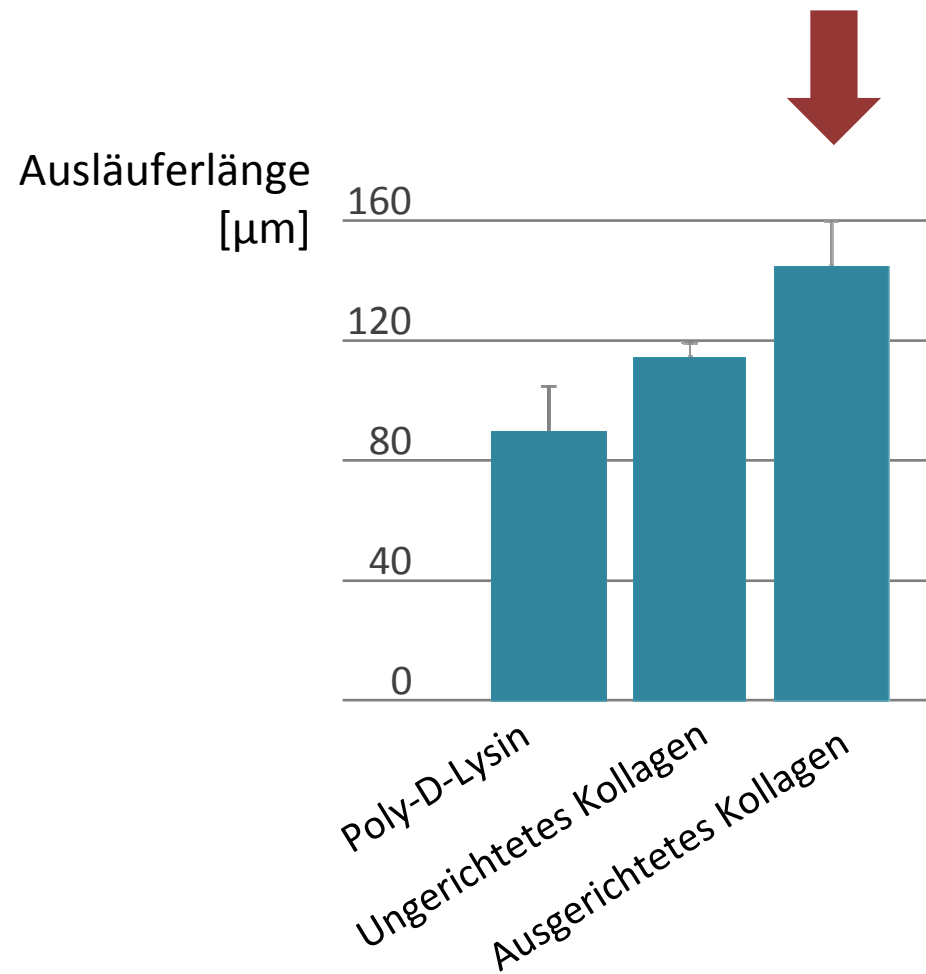
Kurze Fibrillen,
niedrige Dichte



Ausrichtung der Ausläufer

⇒ Ausrichtung der Ausläufer hängt von Ausrichtung, Belegungsdichte und Länge der Fibrillen ab

Ausläuferlänge

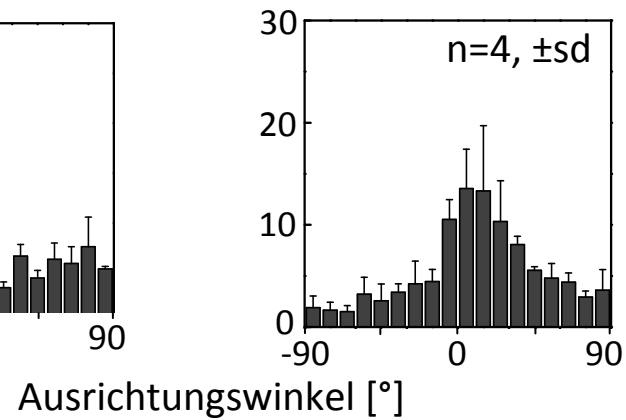
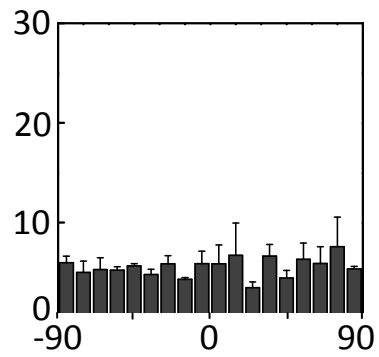
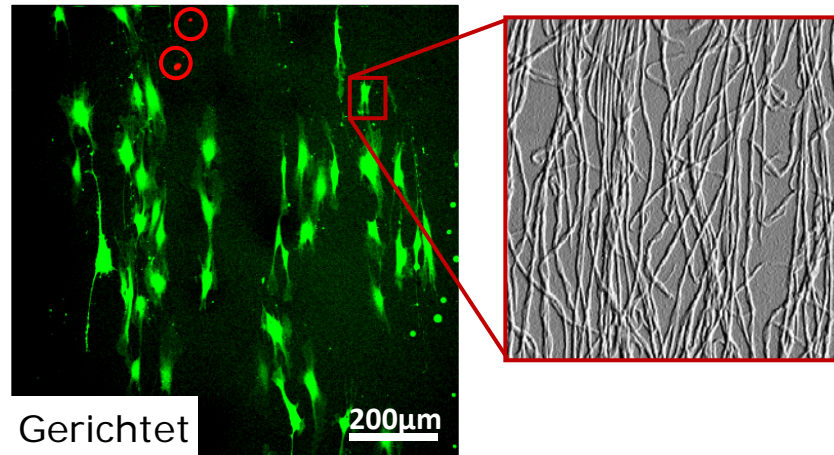
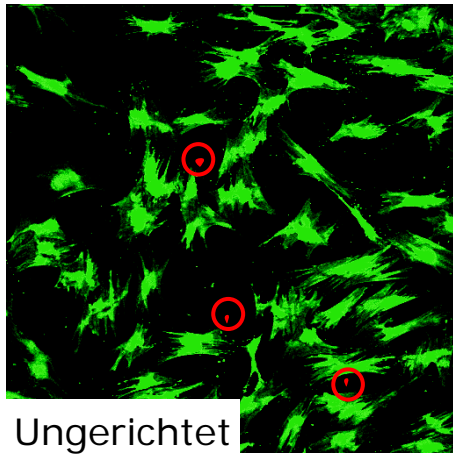


⇒ Ausrichtung der Fibrillen wirkt sich unterstützend auf das Wachstum der Ausläufer aus

Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering

- Einleitung
- Erzeugung ausgerichteter Kollagenfibrillen
- **Zelluläre Interaktionen mit ausgerichteten Kollagenfibrillen**
 - a) Neuronale Stammzellen
 - b) Mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen
- Ausgerichtete Kollagenfibrillen in Kapillarmembranen

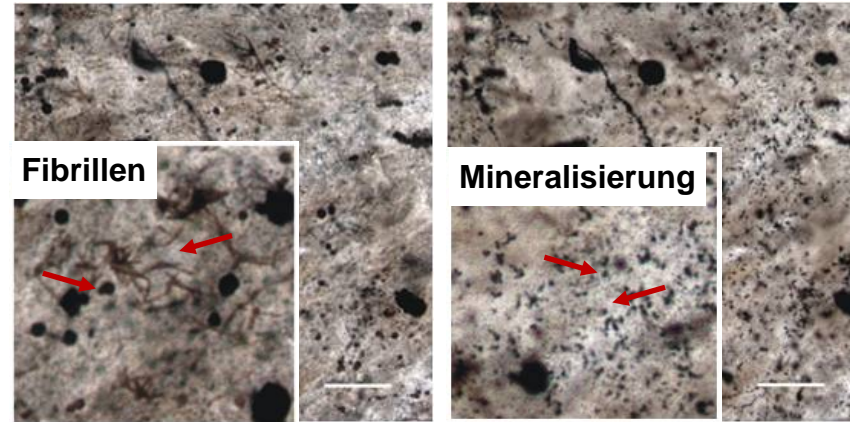
MESENCHYMALE STAMMZELLEN



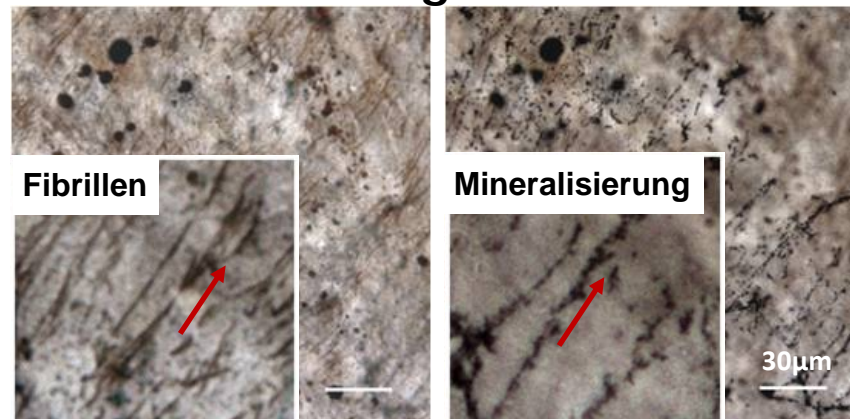
OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

Von Kossa
Färbung

Ungerichtetes Kollagen



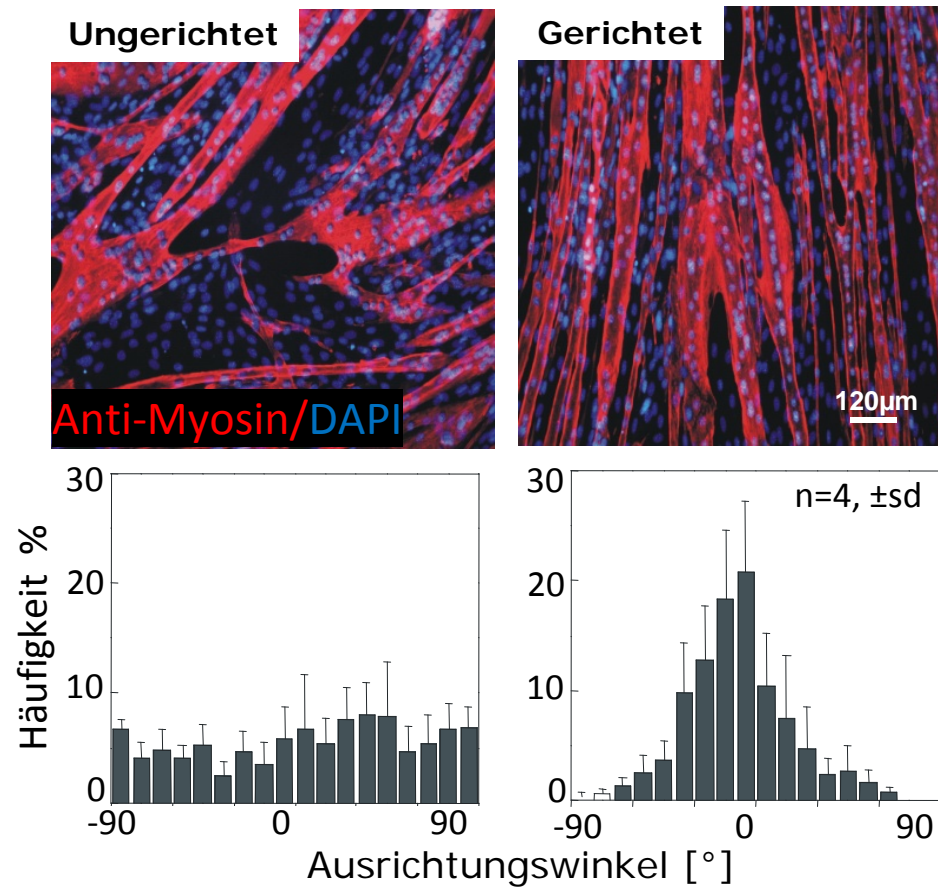
Gerichtetes Kollagen



⇒ gerichtete Fibrillen steuern die Richtung der Mineralisierung

MYOGENE DIFFERENZIERUNG

- C2C12 Zellen
- Myoblasten fusionieren zu Myotuben



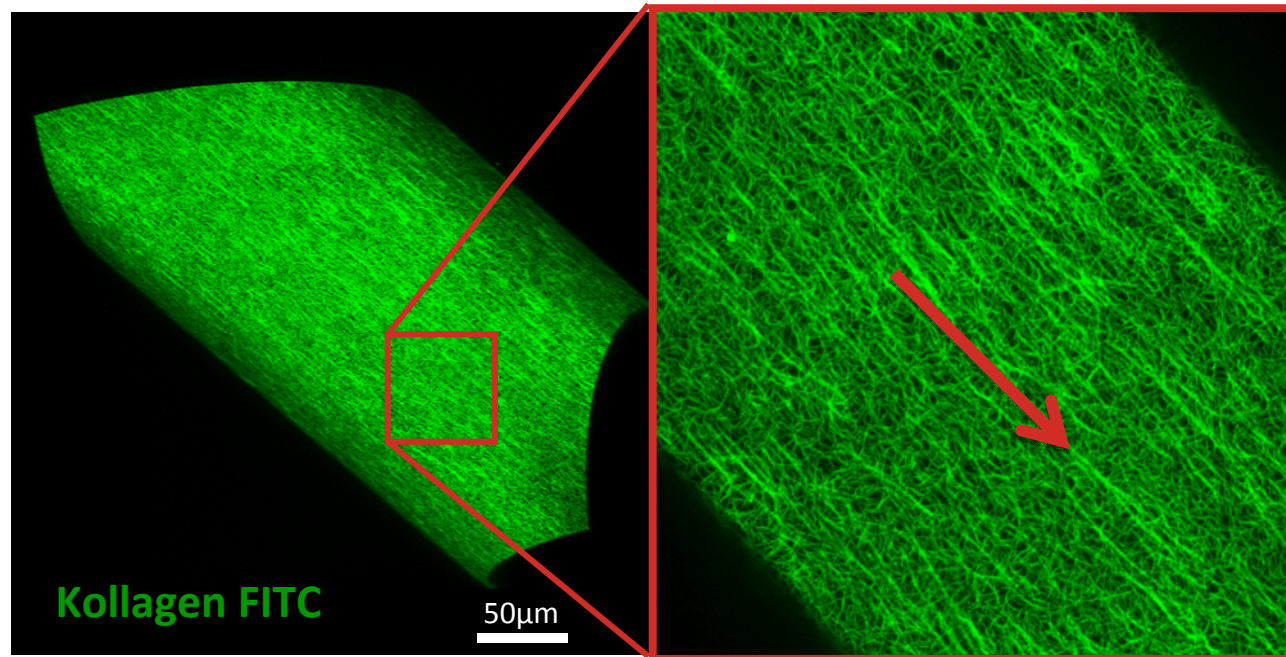
⇒ gerichtete Fibrillen steuern gerichtete Fusion der Myoblasten

Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering

- Einleitung
- Erzeugung ausgerichteter Kollagenfibrillen
- Zelluläre Interaktionen mit ausgerichteten Kollagenfibrillen
- **Ausgerichtete Kollagenfibrillen in Kapillarmembranen**

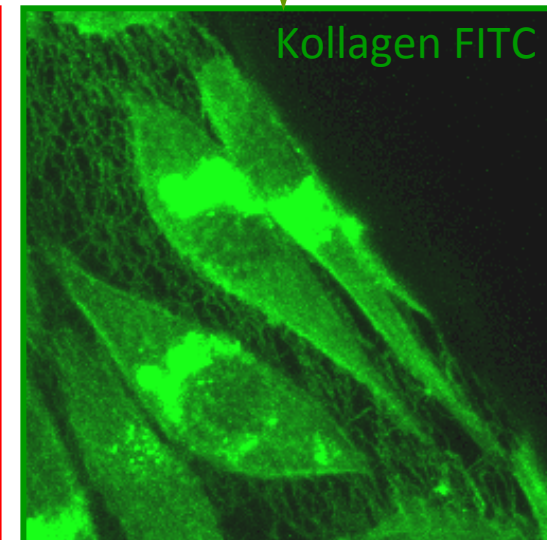
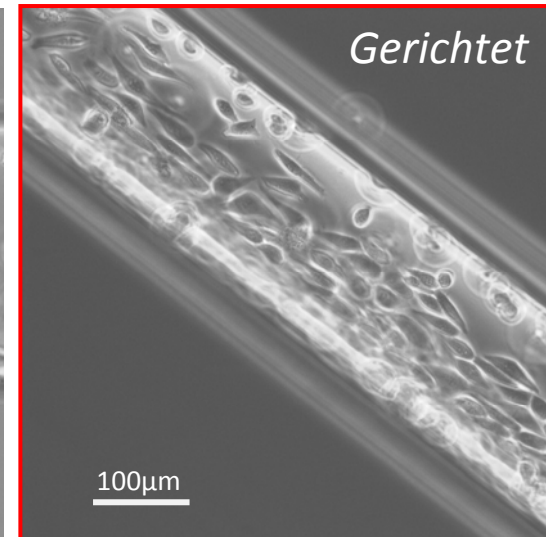
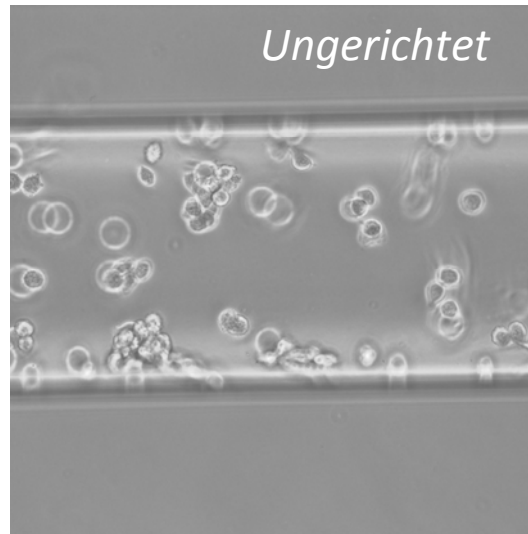
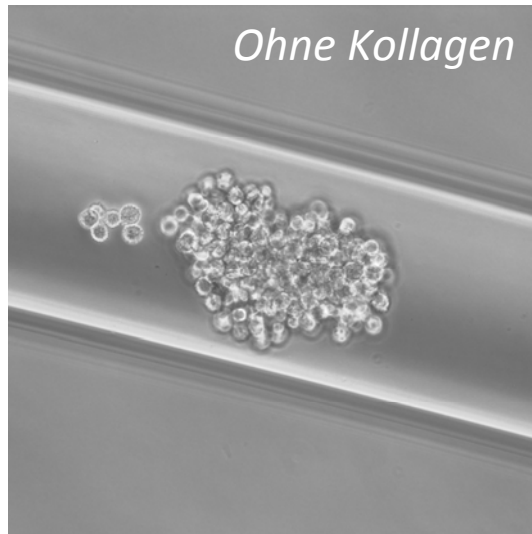
FIBRILLEN AUSRICHTUNG IN KAPILLARMEMBRANEN

Vorbehandlung der Zellulose: Carboxylgruppen werden in aktive Ester verwandelt \Rightarrow kovalente Anbindung des Kollagens



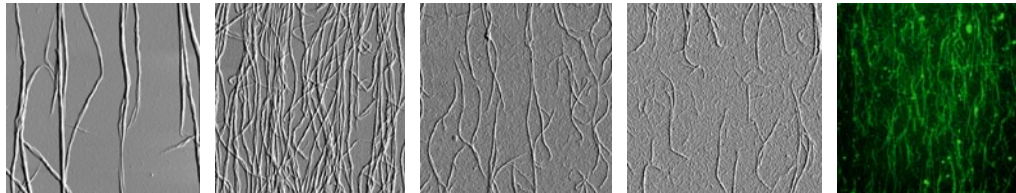
\Rightarrow Methode auf Zellulosehohlfasern übertragbar

FIBROBLASTEN IN KAPILLARMEMBRANEN

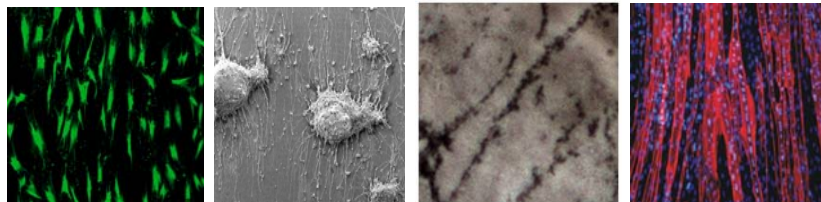


Zusammenfassung

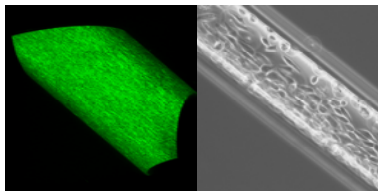
- Kollagenfibrillen können definiert an der Oberfläche ausgerichtet werden



- Stammzellen werden durch gerichtete Fibrillen morphologisch und funktionell beeinflusst



- Fibrillenausrichtung kann auf Kapillarmembranen übertragen werden



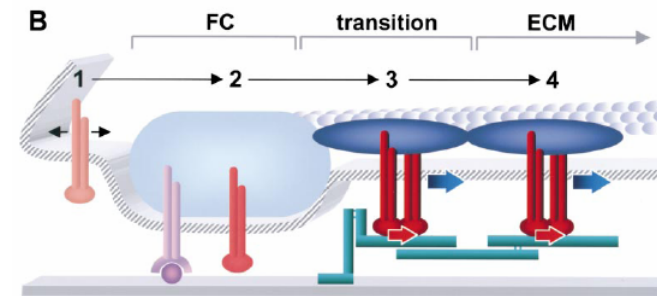
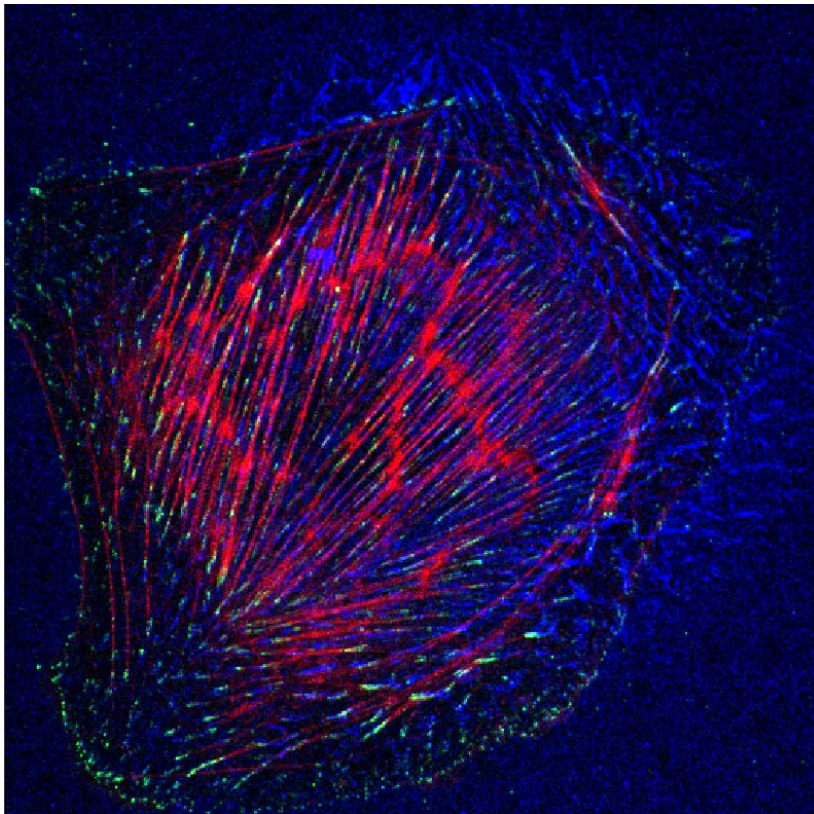
Grenzflächendesign zur Steuerung physiko-chemischer und biologischer Prozesse

(i) Ausgerichtete Kollagenfibrillenmatrices für das Tissue Engineering

(ii) Oberflächeneigenschaften modulieren Zelladhäsion

Fibronektin

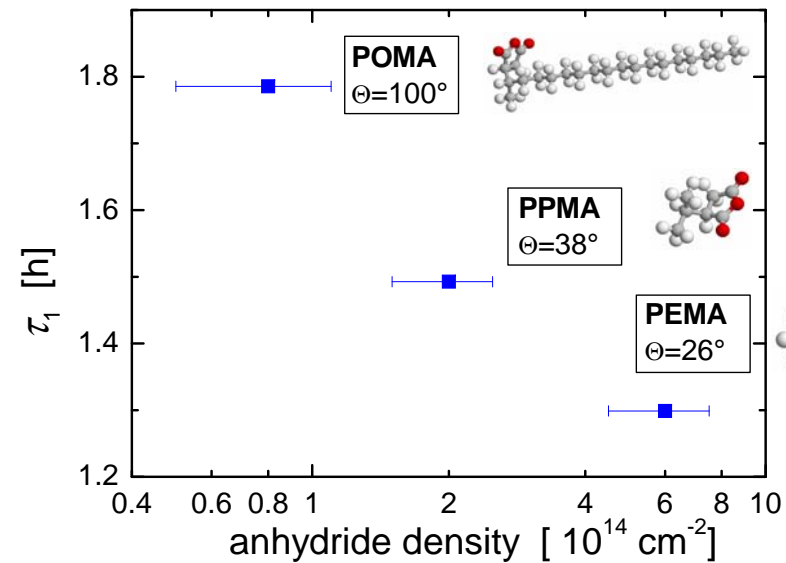
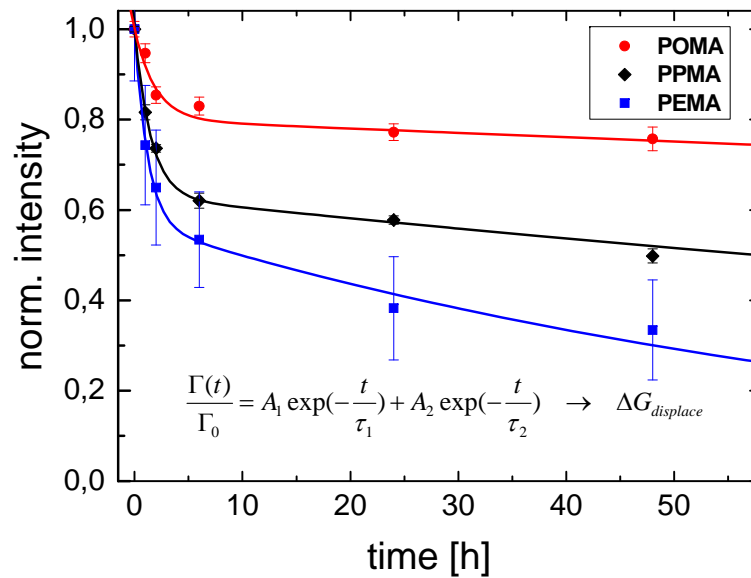
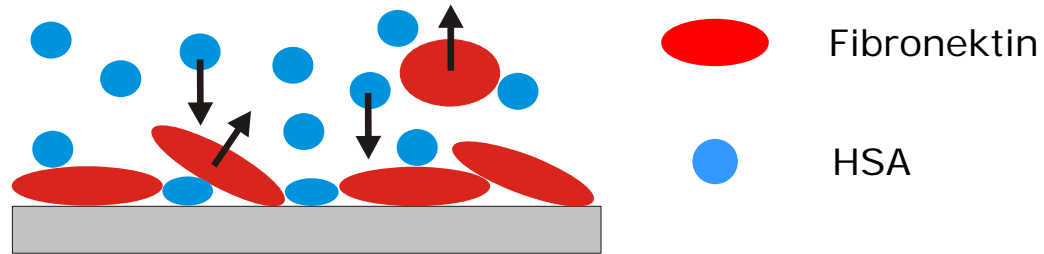
- Glykoprotein der ECM (Adhäsionsmolekül)
- Expression und Umordnung durch Zellen



Pankov et. al. **JCB** 2000

Protein-Substrat-Verankerung

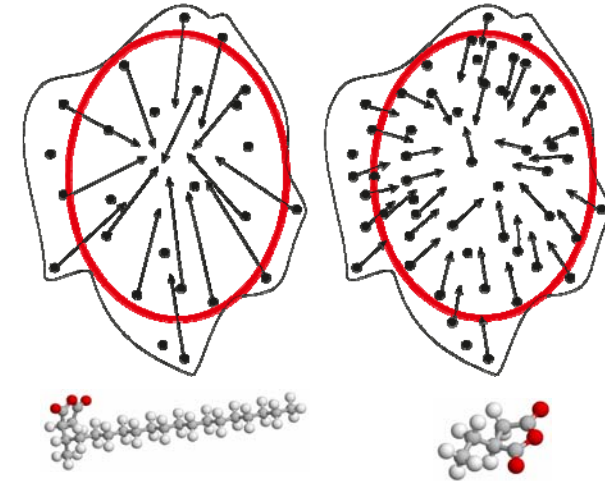
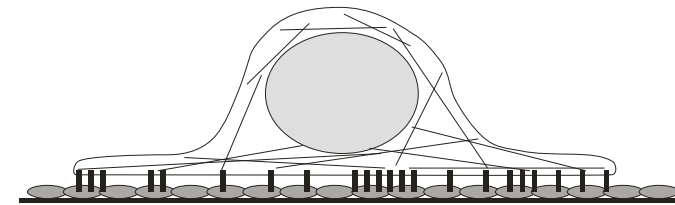
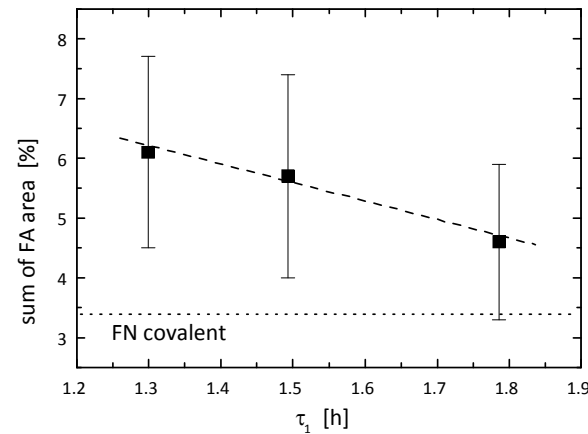
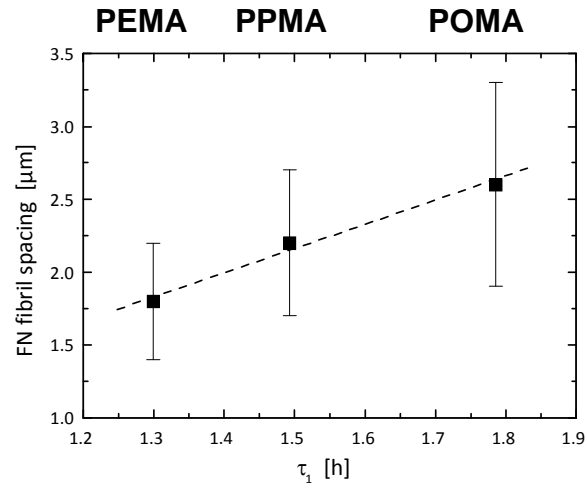
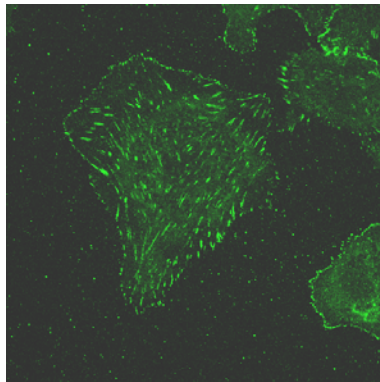
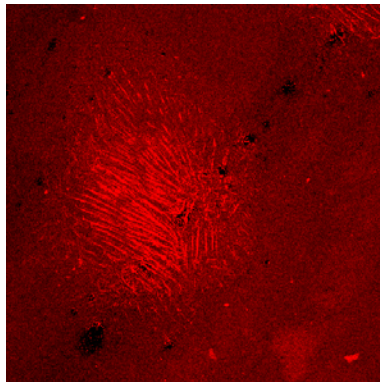
Kinetik der Protein-Verdrängung



⇒ Verdrängungskinetik korreliert mit physiko-chemischen Substrateigenschaften

Matrix-Reorganisation: Microscale

Muster der Fibronectinfibrillen und Adhäsionspunkte (nach Kultivierung von Endothelzellen)



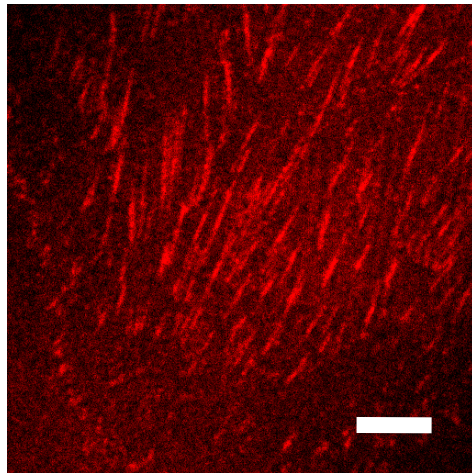
POMA

PEMA

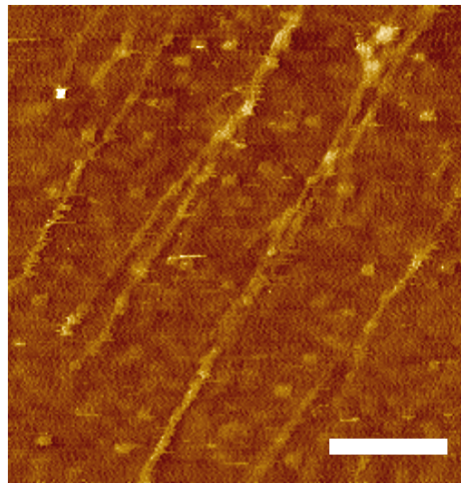
⇒ Fibronectinverankerung ↔ Adhäsionspunkte ↔ Zytoskelett

Matrix Reorganisation - Nanoscale

Muster der Fibronektion-Nanofibrillen (cLSM/SFM)

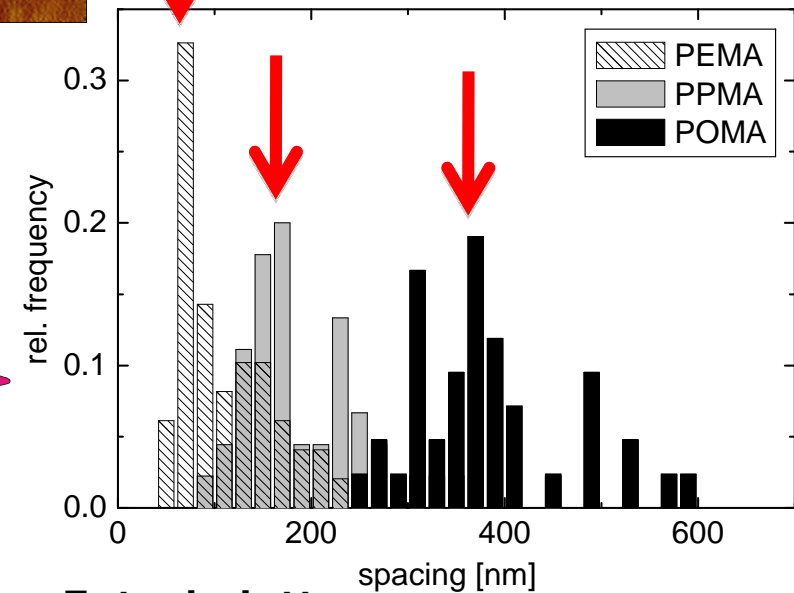
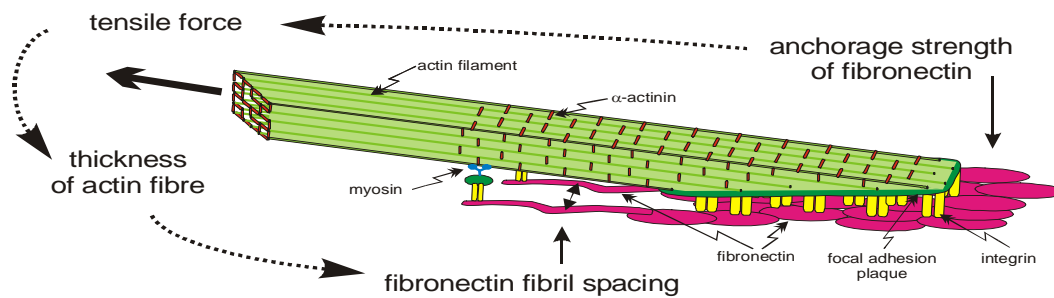


fluorescence (bar: 5µm)



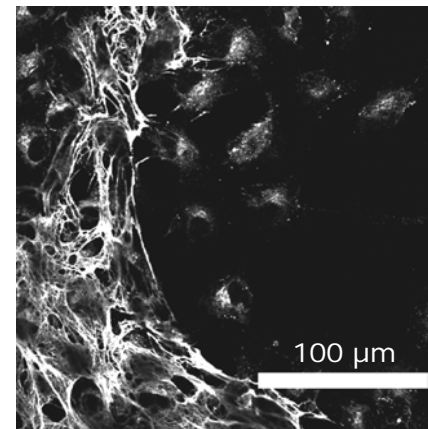
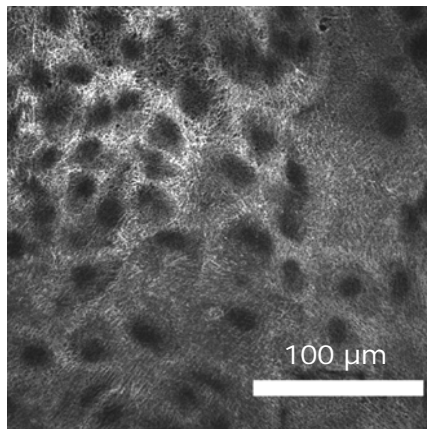
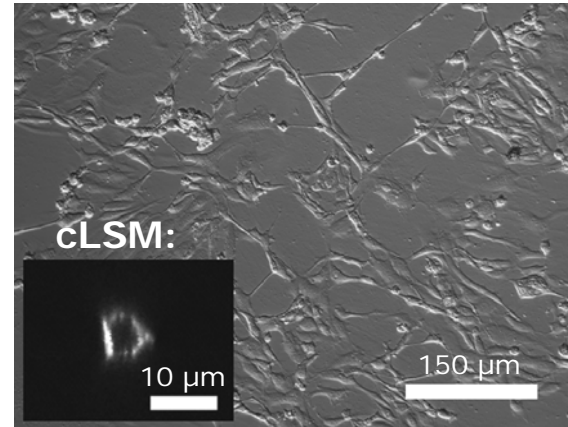
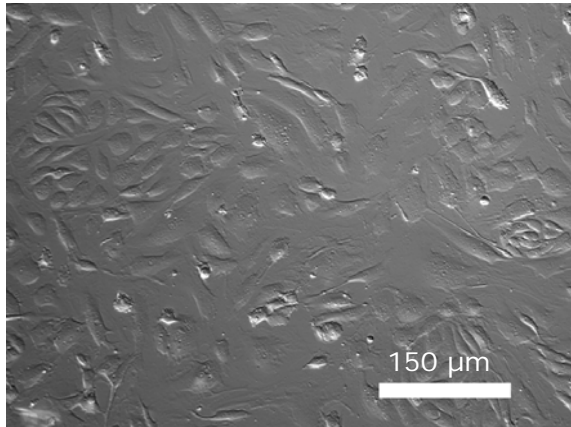
SFM (bar: 500nm)

Pompe et al. Biophys. J. 2005, 88, 527.

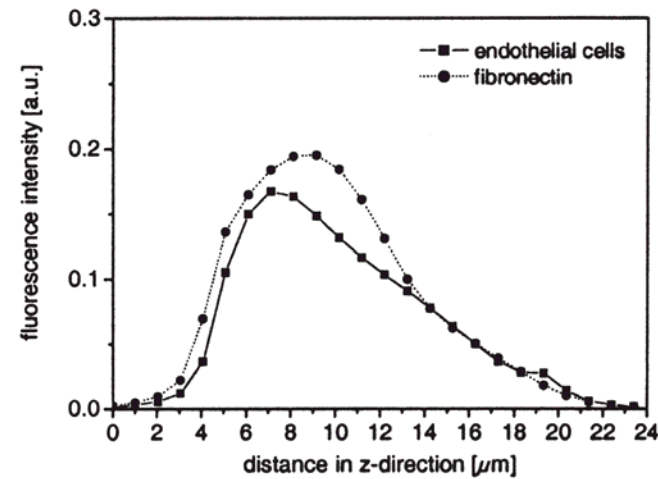
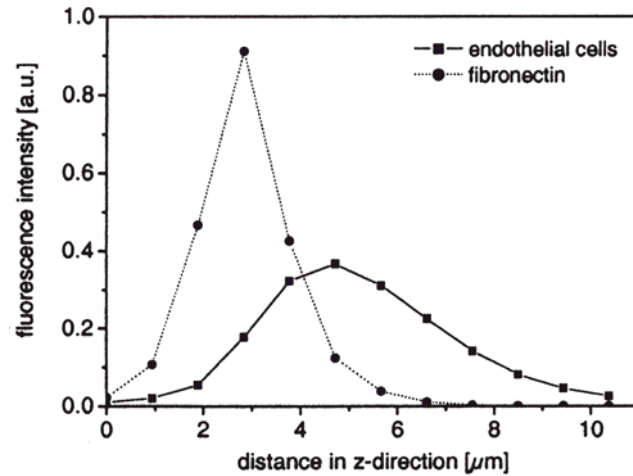
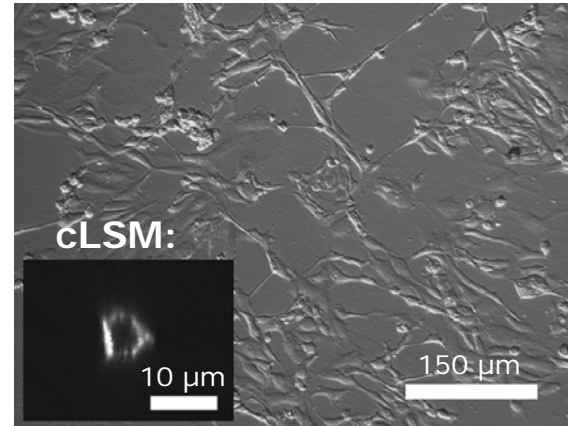
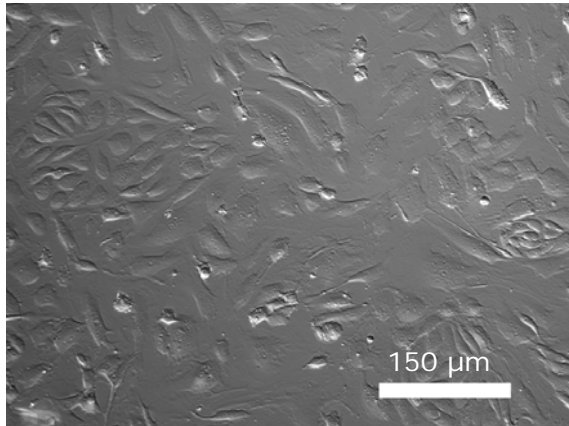


⇒ Fibronektinverankerung ↔ Adhäsionspunkte ↔ Zytoskelett

Endothelzellen/Angiogenese



Endothelzellen/Angiogenese



⇒ Fibronektinverankerung ↔ Matrixbildung-/struktur ↔ Zytoskelett



MAX BERGMANN
center of biomaterials dresden



<http://www.ipfdd.de/mbc>