



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Verhalten von Knochenzellen aus Mäusen und
Kaninchen auf Elastin-artigen Proteinpolymeren

Verfasserin

Corinna Nagelreiter

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, Juli 2011

Studienkennzahl (laut Studienblatt):	A449
Studienrichtung (laut Studienblatt):	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die Möglichkeit bedanken, an einem derart interessanten Thema zu arbeiten und ebenso für die umsichtige Betreuung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich vielmals bei Frau Barbara Berger, deren Umsicht und Aufmerksamkeit sowie tatkräftige Unterstützung so manches meiner Experimente vor dem Scheitern bewahrt haben.

Mein Dank gilt auch Herrn Peter Höflich, dessen Unterstützung und gute Laune selbst den anstrengendsten Tag noch mit Lachen füllen konnte.

Ich danke auch den Laborkolleginnen Barbara Stelzmüller, Astrid Rohrhofer, Marlene Illetschko und Birgit Krančan, deren Hilfe und Gesellschaft diese Arbeit um so vieles einfacher gemacht hat.

Vielen Dank an meine Eltern, die mein Studium ermöglicht haben und an meinen Bruder, der es mit dem seinen noch bereichert hat.

Ich bedanke mich bei meinen Freundinnen Catharina Neudorfer und Astrid Rohrhofer, ohne die mein Studium wesentlich weniger Spaß gemacht hätte, wenn ich es denn überhaupt geschafft hätte.

Und ich bedanke mich auch bei Gabriel Gnießer, dessen liebevolle Unterstützung mir so vieles ermöglicht hat.

Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen

1, 25(OH) ₂ D ₃	1, 25-Dihydroxy-Vitamin D ₃
BMCs	Knochenmarkszellen, bone marrow cells
BMP	Bone-morphogenetic-protein
BRU	Bone remodeling unit
BSA	Bovines Serum-Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOX	Doxorubicin
E. Coli	Escherichia Coli
ELP	Elastin-like Protein
EtOH 70% /abs	Ethylalkohol 70% oder absolut
FCS	Fetales Kälberserum
HA	Hydroxyl-Apatit
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL-1, IL-4, IL-6, IL-13	Interleukin-1, -4, -6, -13
LAF	Laminar Air Flow
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)]-2H-tetrazolium (inneres Salz)
NaOH	Natronlauge

P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Poly-(ethylenglykol)
PEGDA	Poly-(ethylenglykol)-diacrylat
PES	Phenazinethosulfat
PGE2	Prostaglandin E 2
PGs	Prostaglandine
PLGA	Poly-(milchsäure-glykolsäure)
PMMA-g-PEG	Polymethylmethacrylsäure kombiniert mit Polyethylenglykol
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RGD-Sequenz	Peptidsequenz Arginin-Glycin- Asparaginsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt related transcriptionfactor 2
TCP	Tri-Calcium-Phosphat
TFE	Trifluorethanol
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor β
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
UHMWPE	ultra-high molecularweight polyethylene
α -MEM	α -Minimum essential Medium

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Knochen und Knochenzellen	10
1.1.1	Zellen des Knochenstoffwechsels	11
1.1.1.1	<i>Osteoclasten</i>	<i>11</i>
1.1.1.2	<i>Osteoblasten</i>	<i>14</i>
1.1.1.3	<i>Osteocyten und bone-lining-cells</i>	<i>15</i>
1.1.2	Das menschliche Skelett.....	16
1.1.3	Knochenbrüche.....	19
1.1.3.1	<i>Heilung eines Bruches</i>	<i>20</i>
1.2	Biomaterialien	23
1.3	Knochenersatzmaterialien	24
1.3.1.1	<i>Unterschiede zwischen biostabilen und bioabbaubaren Materialien</i>	<i>25</i>
1.3.1.1.1	Biostabile Materialien	25
1.3.1.1.2	Bioabbaubare Materialien	28
1.3.1.2	<i>Unterschiede zwischen Materialien synthetischen und natürlichen Ursprungs.....</i>	<i>32</i>
1.3.1.2.1	Synthetische Materialien	32
1.3.1.2.2	Materialien natürlichen Ursprungs.....	33
1.3.2	Grundanforderungen an Knochenersatzmaterialien	34
1.3.2.1	<i>Osseointegration und Immunreaktionen</i>	<i>34</i>
1.3.2.1.1	<i>Ansätze zur Förderung der Osseointegration</i>	<i>38</i>

1.3.2.1.1.1	<i>Physikochemisch</i>	38
1.3.2.1.1.2	<i>Morphologisch</i>	40
1.3.2.1.1.3	<i>Biochemisch</i>	40
1.3.2.2	<i>Mechanische Stabilität</i>	42
1.3.2.2.1	Auswirkungen von einwirkenden Kräften auf Materialien.	42
1.3.2.2.2	Mechanische Eigenschaften des Knochens.....	43
1.3.2.2.2.1	<i>Mechanobiologie des Knochens</i>	44
1.3.2.2.3	Anforderungen an die Stabilität von Knochenersatzmaterialien.....	45
1.3.3	Elastin-ähnliche Polymere	48
1.3.3.1	<i>Besonderheiten der Polymere aus der Klasse der ELPs</i>	50
1.3.3.2	<i>Vorteile der ELPs</i>	51
1.3.3.2.1	Produktionsverfahren.....	51
1.3.3.2.2	Self-assembly.....	54
1.3.3.2.3	Möglichkeiten der Modifikation der Eigenschaften von ELPs	56
1.3.3.2.3.1	<i>pH-Wert</i>	57
1.3.3.2.3.2	<i>Licht</i>	58
1.3.3.2.3.3	<i>Ionenstärke</i>	60
1.3.3.2.3.4	<i>Lösungsmittel in der Verarbeitung</i>	60
1.3.3.2.3.5	<i>Spezifische Aminosäuresequenzen</i>	63
1.3.3.2.4	Biokompatibilität von ELPs.....	65
1.3.3.2.5	Mechanische Eigenschaften von ELPs.....	66
1.3.3.3	<i>Mögliche Anwendungen von Peptidpolymeren</i>	70
1.3.3.3.1	Anwendungen außerhalb des medizinischen Bereichs	70
1.3.3.3.2	Anwendungen im medizinischen Bereich	73

1.4 Ziele der Diplomarbeit	79
 2 Materialien und Methoden	 80
2.1 Materialien	80
2.1.1 Liste verwendeter Geräte	80
2.1.2 Liste verwendeter Lösungen und Substanzen.....	81
2.1.3 Kulturmedien.....	81
2.1.4 Verwendete Zellen	82
2.1.4.1 Osteoblasten	82
2.1.4.2 Knochenmarkszellen	82
2.1.4.3 Osteoclasten	82
2.2 Methoden.....	82
2.2.1 Osteoblastenisolierung	82
2.2.2 Vorbereitung der Präparate.....	83
2.2.2.1 Deckgläser.....	83
2.2.2.2 Knochenplättchen.....	83
2.2.2.3 ELP.....	84
2.2.2.3.1 Herstellen der ELP-Lösung	84
2.2.2.3.2 Herstellung von Beschichtungen auf Deckgläsern	84
2.2.3 Vorinkubation.....	85
2.2.4 Osteoblastenaussaat.....	85
2.2.5 Isolierung und Aussaat von Knochenmarkszellen	85
2.2.6 Isolierung und Aussaat von Osteoclasten aus Kaninchen	86
2.2.7 Zellfixierung.....	86

2.2.8	Färbungen	86
2.2.8.1	<i>Rhodamin-Färbung mit Antikörper Alexa Fluor 488 oder 546 .</i>	86
2.2.8.2	<i>Färbung der DNA mit DAPI</i>	87
2.2.9	Einbettung der Präparate	87
2.2.10	viability-assay mittels MTS-Test.....	87
2.2.11	Protein-Bestimmung (Bio-Rad).....	87
2.2.11.1	<i>Zelllyse</i>	87
2.2.11.2	<i>Protein-Bestimmung</i>	88
3	Resultate/Ergebnisse.....	89
3.1	Hinweise zu den angewandten Methoden.....	89
3.1.1	Fluoreszenzmikroskopie	89
3.1.2	MTS-Test.....	89
3.1.3	Protein-Bestimmung Bio-Rad	89
3.2	Ergebnisse in Mäusezellen	90
3.2.1	Osteoblasten	90
3.2.1.1	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	90
3.2.1.2	<i>MTS-Test</i>	95
3.2.1.3	<i>Protein-Bestimmung Bio-Rad</i>	97
3.2.2	Osteoclasten	99
3.2.2.1	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	99
3.3	Ergebnisse in Kaninchenzellen.....	104
3.3.1	Osteoclasten	104
3.3.1.1	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	104

4 Zusammenfassung	108
5 Summary.....	111
6 Diskussion.....	113
6.1 Ergebnisse in Mäusezellen	114
6.1.1 Osteoblasten	114
6.1.2 Osteoclasten	117
6.2 Ergebnisse in Kaninchenzellen.....	119
6.2.1 Osteoclasten	119
7 Literaturverzeichnis	122
8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	126
9 Curriculum Vitae	127

1 Einleitung

1.1 Knochen und Knochenzellen

Dem menschlichen Skelett kommen mehrere wichtige Aufgaben zu, die je nach Art und Lokalisierung jedes einzelnen Knochens in ihrem Anteil Unterschiede aufweisen können. Diese Aufgaben sind vor allem die Funktion als Stütze und zur Bewegung der Gliedmaßen, der Schutz innerer Organe sowie die Homöostase des Mineralien- und des Säure-Basen-Haushalts, wobei diese letzte Funktion vor allem für die Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphor-Spiegel zuständig ist. Um diese Aufgaben durch die gesamte Lebenszeit eines Individuums hindurch erfüllen zu können, ist das Skelett ständiger Erneuerung und Umbau unterworfen, dem sogenannten „remodeling“. So wird ein Knochen bei Beanspruchung auf diesen Einfluss reagieren und bei Bedarf gestärkt oder repariert werden. Die Knochen eines aktiven Tennisspielers in etwa weisen bei der Hand, mit der er spielt, eine stärkere Hülle und einen größeren Durchmesser auf. Ebenso werden beanspruchte, bereits geschwächte Knochen erneuert, um einem tatsächlichen Bruch vorzubeugen, wenngleich die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht zur Gänze erforscht sind. Vorgänge, die das „remodeling“ ermöglichen, finden in ähnlicher Form auch bei der Heilung eines Knochenbruchs statt. Diese Vorgänge werden allerdings maßgeblich beeinflusst durch die Art des im Umbau begriffenen Knochens, wie auch von Alter und Krankheiten. Demnach bietet gute Kenntnis der Reparaturmechanismen die Möglichkeit, in die essentiellen Vorgänge regulierend einzugreifen und somit Heilungschancen und Verlauf der Wundheilung nach einem Knochenbruch oder bei tumorbedingten Knochenläsionen positiv zu beeinflussen. Im Folgenden seien einige Fakten über die Vorgänge des „remodeling“ sowie die daran beteiligten Zellen genannt. (Dempster 2006)

1.1.1 Zellen des Knochenstoffwechsels

1.1.1.1 Osteoclasten

Osteoclasten sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind, Knochen abzubauen. Reife Osteoclasten entwickeln sich aus mononukleären Vorläuferzellen, die aus der Monocyten-Makrophagen-Zelllinie stammen und sowohl in der Blutbahn als auch dem Knochenmark zirkulieren, wobei in vivo vor allem die Knochenmarksmakrophagen als Vorläuferzellen der Osteoclasten angesehen werden. (Oursler und Bellido 2003) Durch ihre Abstammung aus der hämatopoietischen Zelllinie sind Osteoclasten auch mit Kupffer'schen Sternzellen, wie sie in der Leber vorkommen, und dendritischen Zellen verwandt, unterscheiden sich jedoch deutlich von diesen Verwandten, vor allem durch ihre Fähigkeit, die mineralische und die organische Komponente des Knochens auflösen zu können. (Vaananen und Laitala-Leinonen 2008) Osteoclasten können sowohl aus Vorläuferzellen, als auch aus bereits ausdifferenzierten Makrophagen entstehen, wodurch die knochenresorbierenden Osteoclasten die letzte Differenzierungsstufe der Makrophagen-Linie darstellen, denn eine Rückbildung zu Makrophagen ist nicht bekannt. Jedoch ist nicht jede Zelle aus der Monocyten-Makrophagen-Linie in der Lage, zu einem Osteoclasten zu werden, der Grund hierfür ist allerdings noch nicht bekannt. Die Verwandtschaft zwischen Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen sowie Osteoclasten, die alle von denselben Stammzellen herrühren, eröffnete das Forschungsgebiet der sogenannten Osteoimmunologie, das in Zukunft mitunter wichtige Erkenntnisse liefern könnte, was Entwicklung und Aktivität, sowie Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen diesen Zellen betrifft. (Ross 2006) Sobald einige der Vorläuferzellen sich zusammengeschlossen und multinukleäre Prä-Osteoclasten gebildet haben, wobei allerdings noch nicht restlos geklärt ist, wie diese Fusion koordiniert wird, heften sich die Prä-Osteoclasten mithilfe von in ihrer Membran eingelagerten Integrin-Rezeptoren an die Oberfläche des zu resorbierenden Knochens. Für die Aktivität und Entwicklung reifer Osteoclasten spielt eine Reihe an

lokalen wie auch systemischen Faktoren eine Rolle. Zu den lokalen Faktoren gehören Zytokine wie IL-1 und IL-6, sowie M-CSF und RANKL. Die beiden letzteren Faktoren, M-CSF und RANKL, existieren sowohl in membrangebundener wie auch in löslicher Form und werden von Stromazellen oder von ihnen abstammenden Osteoblasten produziert. Dadurch wird die Funktion der Osteoclasten direkt von den knochenaufbauenden Osteoblasten reguliert, welche nicht aus der hämatopoietischen Zelllinie stammen. Von den systemischen Faktoren haben vor allem PTH und $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Einfluss auf die reifenden Osteoclasten.

Die Anheftung der Osteoclasten an den Knochen wird dadurch ermöglicht, dass die in der Membran vorkommenden Integrine Proteine erkennen, die in die Knochenmatrix eingelagert sind. (Ross 2006) Integrine sind Heterodimere mit jeweils einer α - und einer β -Kette und obwohl alle Integrine, welche die α -Kette beinhalten, die Peptidsequenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) erkennen, ergibt sich durch verschiedene Kombinationen mit unterschiedlichen β -Ketten möglicherweise eine gewisse Spezifität einzelner Integrine. (Vaananen und Laitala-Leinonen 2008) Vor allem $\alpha\beta 3$ -Integrine sind für die Knochenresorption verantwortlich. Dieser spezielle Heterodimer ist in Osteoclasten-Vorläuferzellen noch nicht nachweisbar, doch durch die Auswirkung von RANKL auf diese Vorläuferzellen und die Ausdifferenzierung zu reifen Osteoclasten wird in Folge wesentlich mehr des $\alpha\beta 3$ -Integrins produziert, was es den nun gereiften Osteoclasten erlaubt, sich auf Knochen festzusetzen und mit der Resorption zu beginnen. (Ross 2006) Dabei wird die Adhäsion mithilfe von Integrinen durch RGD-enthaltende Proteine vermittelt, die in der Knochenmatrix zu finden sind, wie etwa Osteopontin oder Knochen-Sialoprotein. Durch dieses Festsetzen der Osteoclasten bilden sich aus Integrinen zunächst sogenannte focal adhesions, welche es dem Osteoclast erlauben, auf der Knochenoberfläche zu wandern. Erst, wenn ein Osteoclast aktiv Knochen resorbiert, zeigen sich eindeutige morphologische Unterschiede. An den Stellen der Membran, welche dem Knochen zugewandt sind, bilden sich aus den „focal adhesions“

Podosomen, welche dann die sogenannte „sealing zone“ aufbauen, die eine weitere morphologische Besonderheit der Osteoclasten abschließt. Diese als „ruffled border“ bezeichnete Ausbildung der Membran ist die eigentliche Stelle, an der die Resorption des Knochens stattfindet. Auch an der basolateralen Membran zeigen sich Veränderungen der Morphologie, denn hier wird die sogenannte „functional secretory membrane“ gebildet, welche, nach bisherigen Erkenntnissen, dafür verantwortlich ist, die aus dem Knochen gelösten Bestandteile in das Blut abzugeben und so zum weiteren Verbrauch zur Verfügung zu stellen oder ihre Ausscheidung zu ermöglichen. (Vaananen und Laitala-Leinonen 2008) Die Ausbildung von „sealing zone“ und „ruffled border“ ist deshalb von großer Bedeutung, da durch eine in den Osteoclasten vorhandene Protonenpumpe der pH-Wert in der gebildeten Lakune drastisch gesenkt wird, sodass er Bereiche bis zu 4-4,5 erreichen kann, wodurch die mineralische Komponente des Knochens mobilisiert wird. In dieses saure Milieu werden durch die Osteoclasten im Anschluss aus Vesikeln lysosomale Enzyme entlassen, welche die nunmehr freigelegte organische Matrix des Knochens auflösen können. Dazu gehören unter anderem Cathepsin K und MMP-9, die ihr Aktivitätsmaximum in sauren pH-Werten entfalten. Auch das als TRAP bezeichnete Enzym „tartrate-resistant acid phosphatase“ unterstützt die Resorption von Knochen und wird gleichzeitig als Labormarker für die Resorption genutzt, da sein Auftreten und die Auflösung von Knochen korrelieren. TRAP fungiert als Phosphatase und produziert ROS, welche die Zersetzung von Collagen 1, das den Hauptbestandteil der organischen Matrix stellt, eventuell unterstützen. Diese Auflösung von sowohl dem mineralisierten Anteil wie auch der extrazellulären, organischen Matrix des Knochens hinterlässt näpfchen-förmige Aushöhlungen, die Howship's Lakunen genannt werden. Haben die Osteoclasten ihre Aufgabe erfüllt und ausreichend Knochen resorbiert, wobei noch nicht zur Gänze geklärt ist, wie dieses Ende der Resorption den Zellen signalisiert wird, beenden die Osteoclasten ihre Arbeit und gehen in Apoptose.

1.1.1.2 Osteoblasten

Osteoblasten entwickeln sich aus Prä-Osteoblasten, die bereits nahe an der Oberfläche des Knochens zu finden sind. Diese zeichnen sich durch eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphate aus, ein Enzym, das einer der frühesten Marker für eine Entwicklung zu einer Zelle der Osteoblasten Linie darstellt. Osteoblasten und Adipocyten haben eine gemeinsame Vorläuferzelle, die, je nach Einwirkung bestimmter Faktoren den Weg eines Osteoblasten oder eines Adipocyten einschlagen kann. Einer der wichtigsten Faktoren für die jeweilige Festlegung auf eine dieser Möglichkeiten sind RUNX2 für die Osteoblasten beziehungsweise PPAR γ für die Adipocyten. (Oursler und Bellido 2003) Weiters sind diese beiden Zellarten unter bestimmten Umständen in der Lage zur Transdifferenzierung. Dies bedeutet, dass diese beiden Zellarten selbst nachdem sie bereits einen der beiden Wege eingeschlagen haben, immer noch auf den anderen wechseln können, aus einem Osteoblasten kann also ein Adipocyt werden und umgekehrt. Voraussetzung dafür ist eine erhöhte Expression des für die jeweils andere Zellart entscheidenden Faktors. Demnach kann ein Osteoblast, in dem große Mengen PPAR γ produziert werden, noch den Phenotyp eines Adipocyten erlangen. Reife, aktive Osteoblasten auf der Oberfläche eines Knochens unterscheiden sich von den noch unreifen durch ihre morphologischen Eigenschaften, wie einen vergrößerten Kern, vermehrte Produktion von Golgi-Vesikeln sowie Endoplasmatischem Retikulum, was ihnen die Produktion und Sekretion von wichtigen Matrixproteinen ermöglicht. Wichtige Adhäsionsproteine für die Osteoblasten sind vor allem Integrine, die auf Peptid-Sequenzen reagieren, welche eine RGD-Sequenz aufweisen und darüber eine Verankerung der Osteoblasten vermitteln. Eine Anheftung der Zellen ist insbesondere für Osteoblasten entscheidend um diese am Leben zu erhalten. Diese RGD-Sequenzen können in unterschiedlichen Proteinen große Abweichungen aufweisen, wie auch Unterschiede zwischen einzelnen Integrinen bestehen, was unter anderem bestimmt, welche Zellen durch Vermittlung dieser beiden aneinander binden können. Darüber hinaus könnte eine Veränderung in den exakten Eigenschaften

der RGD-Sequenz enthaltenden Proteine und Integrine auch ein Hinweis dafür sein, dass sich im Zuge der Reifung einer Zelle diese Proteine verändern und damit womöglich auch eine Rolle in der Entwicklung und Ausreifung der Osteoblasten spielen, doch dies ist noch nicht restlos geklärt. (Robey und Boskey 2006) Reife und aktive Osteoblasten sezernieren die extrazelluläre Matrix des Knochens und sind ebenfalls für die anschließende Mineralisierung dieser Matrix zuständig. Sobald die zum Großteil aus Collagen Typ 1 bestehende Matrix aufgebaut wurde, wird sie durch Osteoblasten mineralisiert, die zu diesem Zweck membrangebundene Vesikel entlassen, die sogenannten Matrix-Vesikel. Durch die Wirkung dieser Vesikel wird die Mineralisierung der Matrix ermöglicht, da sie einerseits die nötigen Mineralien wie Phosphor und Calcium in großer Konzentration an die zu mineralisierende Stelle bringen und gleichzeitig Inhibitoren der Mineralisierung durch enzymatischen Abbau beseitigen, wie etwa Pyrophosphat oder Proteoglykane (Dempster 2006). Haben die Osteoblasten ihre Aufgabe erfüllt und den Knochen wieder aufgebaut, so stehen ihnen mehrere Schicksale offen. Der Großteil geht in Apoptose, doch ein Teil differenziert aus zu bone-lining-cells oder Osteocyten.

1.1.1.3 Osteocyten und bone-lining-cells

Osteocyten entstehen gemeinhin aus Osteoblasten, die während der Neubildung eines Knochens, sei es, bei der Heilung eines Bruchs, bei Anpassung an höhere Belastung (modeling) oder dem stetigen Umbau des menschlichen Skeletts, dem sogenannten „remodeling“, in dem frisch aufgebauten Knochengewebe eingeschlossen wurden. Sie stellen die letzte Differenzierungsstufe der Osteoblasten-Linie dar. Sie zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie enge Verbindungen zu anderen Zellen unterhalten und innerhalb der Knochenmatrix, in welche sie eingeschlossen wurden, weiterhin Proteine für den Aufbau der Matrix und auch Wachstumsfaktoren produzieren. Osteocyten können, sofern der sie beinhaltende Knochen nicht resorbiert wird, sei es nach einem Bruch, durch Krankheit oder im Zuge des „remodeling“, sogar Jahrzehnte

hindurch überleben. (Aubin et al., 2006). Rund 30%-50% der an einem Um- oder Wiederaufbau eines Knochens beteiligten Osteoblasten gehen nicht in die Apoptose, sondern werden zu Osteocyten oder bone-lining-cells. (Dempster 2006) Osteocyten sind innerhalb des Knochens zu finden und in der Matrix eingeschlossen, doch sie sind keineswegs abgeschottet, sondern stehen durch gap junctions und Filopodien in regem Kontakt mit anderen Osteocyten und auch den bone-lining-cells, welche an der Oberfläche des Knochens zu finden sind. Durch diese Verbindung ist es den Osteocyten und bone-lining-cells möglich, Veränderungen im Knochen zu erfassen, wie etwa eine Änderung der Spannung, ein Strecken oder Verbiegen im Knochengewebe. Diese Information wird an die Oberfläche des Knochens weitergeleitet, in dem sich die Osteocyten befinden, sodass von dieser Stelle aus Zellen rekrutiert werden, die eine Reparatur oder einen Umbau einleiten, um entsprechend auf die von den Osteocyten gegebene Information über etwaige Verletzungen oder Schwachstellen zu reagieren. Auch den bone-lining-cells kommt bei diesem Vorgang eine wichtige Rolle zu. Dadurch, dass sie die gesamte Oberfläche des Knochens bedecken, schützen sie diesen vor zirkulierenden Faktoren, welche die Knochenmatrix schädigen könnten, und verfügen über Rezeptoren für Hormone und weitere Faktoren, die zur Initiation des „remodeling“ entscheidend sein können. Auch kommt ihnen die Aufgabe zu, für die Freisetzung von Calcium aus der Knochenmatrix zu sorgen, wenn dessen Blutspiegel zu niedrig ist. (Oursler und Bellido 2003)

1.1.2 Das menschliche Skelett

Die ursprüngliche Entwicklung der menschlichen Knochen unterscheidet sich von postnatalen Vorgängen. Bei der embryonalen Entwicklung des menschlichen Skeletts spielen vor allem zwei Arten der Knochenbildung eine große Rolle, zum einen ist dies die Bildung membranösen Knochens, zum anderen die endochondrale Knochenbildung. Membranöser Knochen wird durch Osteoblasten gebildet und stellt vor allem flache Knochen, wie die Schädelknochen oder das Schulterblatt. Damit die Entwicklung dieser flachen Knochen vonstattengehen kann, muss das Gewebe von

Blutgefäßen durchzogen sein. Im Gegensatz dazu ist Gewebe, in dem sich die Bildung endochondralen Knochens vollzieht, nicht vaskularisiert. Vor allem langgestreckte Knochen wie etwa das Schienbein oder auch der Oberschenkelknochen entstehen durch diese Art der Knochenbildung, bei der zunächst Knorpelanlagen gebildet werden. Diese bauen bereits die Struktur des späteren Knochens auf, sodass in Mäusen, bei denen der für die Entstehung von Osteoblasten entscheidende Transkriptionsfaktor RUNX2 ausgeschaltet wurde, zwar ein beinahe vollständiges Skelett entwickeln, dieses jedoch nicht ossifiziert wird und somit zur Gänze aus Knorpelgewebe besteht. In gesunden Individuen bilden die Chondrocyten sozusagen eine aus Knorpel bestehende Vorlage für den späteren Knochen. Diese Chondrocyten erreichen beim Fortschreiten der Entwicklung endochondralen Knochens ein Stadium der Hypertrophie. Sobald dieses erreicht ist, werden aus dem umliegenden Gewebe Osteoblasten sowie Chondroclasten rekrutiert, die für den Abbau des Knorpelgewebes sorgen und die darauffolgende Ossifikation. Gleichzeitig sprießen auch neue Blutgefäße, die den entstehenden Knochen darauffolgend versorgen. Anschließend erfolgt noch eine Phase membranöser Knochenbildung, die den endochondral gebildeten Knochen vervollständigt. Ist die embryonale Entwicklung abgeschlossen, so folgt nach der Geburt keine neue Bildung von Knochen, dennoch bleibt das Skelett stets aktiv. Einerseits, wie zuvor erwähnt, werden einzelne Knochen bei starker Beanspruchung verändert, um verstärkten Belastungen standzuhalten, andererseits werden Schwachstellen in Knochen behoben und so die Widerstandsfähigkeit dieses Stützapparates aufrecht erhalten. Dies wird durch „remodeling“ bewerkstelligt, das eine enge Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Zellen darstellt, wie etwa Osteoblasten, Osteoclasten und Osteocyten, und dieser Verband an umformenden Zellen wird auch bone „remodeling“ unit, kurz BRU, genannt. Kurz gesagt gibt es vier voneinander unterscheidbare Phasen des „remodeling“, die nacheinander stattfinden: Aktivierung, Resorption, Umkehr und „Formation“. Während der Aktivierung werden mononukleare Vorläufer der Osteoclasten zu der von „remodeling“ betroffenen Stelle

des Knochens berufen. Diese heften sich an den Knochen fest und entfernen beschädigte Stellen oder durch Zufall für das „remodeling“ bestimmte Bereiche des Knochens, indem sie in der durch ihre „sealing zone“ abgetrennte Resorptionslakune einen sauren pH-Wert schaffen, in dem von Osteoclasten freigegebene Enzyme ihre Wirkung tun und den Knochen auflösen. Wenn diese Phase des „remodeling“ beendet ist, gehen die knochenresorbierenden Osteoclasten in Apoptose und die Umkehr-Phase beginnt. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass an die resorbierte Stelle Osteoblasten-Vorläuferzellen wandern. Wodurch dieser Vorgang eingeleitet wird, ist noch nicht zur Gänze erforscht, doch eine plausible Theorie ist, dass durch die Resorption des Knochens durch Osteoclasten in die extrazelluläre Matrix eingebettete Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, die für die Mobilisierung und Differenzierung von Osteoblasten entscheidend sind. Diese Theorie ist insbesondere deshalb so plausibel, da sie erklären würde, weshalb Osteoblasten an der korrekten Stelle an einem im Umbau begriffenen Knochen eintreffen und weshalb ausreichend dieser Zellen vorhanden sind, wenn die vierte Phase des „remodeling“ beginnt, die Formation. In dieser Phase bauen die Osteoblasten zunächst organische Matrix auf, die im weiteren Verlauf des Aufbaus auch von ihnen mineralisiert wird. Dabei werden auch einige Osteoblasten in dem neu aufgebauten Knochenmaterial eingeschlossen und werden zu Osteocyten. Sobald der Wiederaufbau abgeschlossen ist, verendet der Großteil der Osteoblasten in Apoptose, doch ein gewisser Teil, der gut 30% bis 50% der an der Formation beteiligten Osteoblasten ausmachen kann, wird entweder zu Osteocyten oder bone-lining-cell, die beide für die weitere Funktion des Knochens entscheidend sind, da sie über gap-junctions eng miteinander in Kontakt stehen und somit Änderungen in den mechanischen Eigenschaften des umliegenden Knochengewebes an die Oberfläche des Knochens und somit auch weiter berichten können. Vorgänge des „remodeling“ ermöglichen es dem Skelett, seinen Aufgaben nachzukommen, denn nur durch ständigen Um- und Aufbau können die Knochen ihre Funktion als Stützapparat beibehalten oder die nötige Stabilität aufweisen, um die Organe der

Bauchhöhle ausreichend zu schützen. Insbesondere für die Homöostase des Calciumhaushalts ist „remodeling“ entscheidend, da aus dem Knochen, dem größten Calciumreservoir des Körpers, nur durch Abbau von Knochen Calcium freigesetzt oder durch Einbau in Knochen aus dem Blutkreislauf entfernt werden kann. Auch die Niere und der Gastrointestinal-Trakt haben Einfluss auf den Calciumhaushalt, denn unter der Regulation von PTH wird die Aufnahme oder Ausscheidung von Calcium und Phosphor verändert. (Schinke und Karsenty 2002) Welche Art Knochen im Zuge der Calciumhomöostase dem „remodeling“ unterworfen wird und warum, ist noch nicht zur Gänze geklärt. Aufgrund der Funktionalität der verschiedenen Knochen nahm man an, dass corticaler Knochen, der den Großteil der langen, gewichttragenden Knochen ausmacht, geringere metabolische Aktivität aufweise als trabekulärer Knochen, doch Forschungen haben die Frage aufgeworfen, ob diese Entscheidung nicht auch möglicherweise durch weitere Faktoren wie Zugehörigkeit zu einer bestimmten Spezies oder bestimmte Situationen beeinflusst wird. Der physiologische Vorgang der Laktation etwa erfordert viel zusätzliches Calcium, das Großteils aus Knochen stammt, die kein Gewicht zu tragen haben.

1.1.3 Knochenbrüche

Nach einem Knochenbruch, sei er die Folge eines Traumas oder begünstigt durch eine Krankheit, muss die betroffene Stelle erst repariert werden, um den oben genannten Aufgaben wieder ausreichend nachkommen zu können. Die Wundheilung in Knochengewebe unterscheidet sich ein wenig von den Vorgängen während der Entwicklung des Skeletts und auch des „remodeling“. Beachtlich an der Heilung eines gebrochenen Knochens ist, dass der Knochen nach dem Abheilen des Bruchs wieder dieselben Aufgaben wahrnehmen kann wie zuvor, da er dieselbe Architektur und Festigkeit aufweist. Diese exakte Nachbildung gelingt dem Körper nicht immer selbstständig, manchmal ist auch ein regulierendes Eingreifen von außen nötig, um die Eigenschaften des

Knochens zufriedenstellend wiederherzustellen. Und um derlei Eingriffe korrekt durchführen zu können, eventuell auch unterstützende Medikamente zu verabreichen oder Knochenersatzmaterialien sinnvoll einzusetzen, ist Verständnis der Vorgänge bei der Heilung eines Bruchs notwendig.

1.1.3.1 Heilung eines Bruches

Die Heilung einer Verletzung des Knochengewebes, sei diese durch einen Knochenbruch, Folgen einer Operation oder auch einer Krankheit entstanden, lässt sich im Groben in vier einzelne Phasen einteilen: (1) Eine Entzündungsreaktion, die (2) Bildung von Knorpel, die (3) Resorption dieses Knorpels mit darauffolgender Bildung von primärem Knochen und letztendlich die (4) Bildung sekundären Knochens. Wenn diese vier Phasen geordnet und korrekt ablaufen, wird der Knochen in seiner vollen Widerstandsfähigkeit wiederhergestellt und kann wieder seinen Aufgaben nachkommen. Größtenteils finden während einer Wundheilung im Knochengewebe die gleichen Abläufe statt wie während der embryonalen Entwicklung des Skeletts, jedoch gibt es auch einige wesentliche Unterschiede. (Gerstenfeld und Einhorn 2006) Zum einen ist nach einer Verletzung eine Entzündungsreaktion im Knochen zu finden und zum anderen gibt der unbeschädigte Teil des Knochens einen Kontext vor, eine strukturelle Vorlage, an die angeschlossen werden muss und das neugebildete Gewebe hat den Eigenschaften des angrenzenden, unbeschädigten Knochens zu entsprechen. Beides ist bei der Embryonalentwicklung nicht der Fall. Der Heilungsprozess wird nicht nur von physiologischen und biomechanischen Faktoren beeinflusst (Gerstenfeld und Einhorn 2006), sondern auch die Belastungen durch äußere Einflüsse spielen eine Rolle. Große Störfaktoren können verhindern, dass eine der oben genannten vier Phasen der Heilung bei einer Knochenverletzung verzögert oder gar nicht durchlaufen wird, was eine Verzögerung der Heilung zur Folge hat bis hin zu der Möglichkeit, dass ein gebrochener Knochen falsch zusammenwächst.

➤ Entzündungsreaktion

Bei einem Bruch oder der Verletzung von Knochengewebe im Zuge einer Operation kommt es zu Blutungen, die in Hämatomen resultieren und auch zur Verletzung des umliegenden weichen Gewebes, das daraufhin abstirbt und nekrotisch wird. Deshalb wandern direkt nach der Verletzung Makrophagen in das betroffene Gewebe ein und entfernen sowohl Hämatome als auch Nekrosen. Für die Funktion der Makrophagen und weiterer Immunzellen sind einige Zytokine von Bedeutung, darunter IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β , sowie auch PGs. Die Wichtigkeit dieser Faktoren zeigte sich unter anderem in einer Studie an Ratten, denen ein selektiver COX-2-Hemmer verabreicht wurde. Bei diesen Tieren zeigte sich eine deutlich schlechtere Heilung als bei der Kontrollgruppe, der NSAIDs verabreicht worden waren.

➤ Bildung von Knorpelgewebe

Chondrocyten wandern in das verletzte Gewebe ein und bauen eine Matrix aus Knorpelgewebe auf, die anschließend noch mineralisiert wird, vor allem im Zentrum der Fraktur, in der Knochen endochondral nachgebildet wird, während zum Rand des Knochens hin eher intramembranöse Knochenbildung stattfindet. Auch in diesem Abschnitt der Heilung spielen für Immunzellen wichtige Faktoren eine große Rolle, denn erst die Apoptose hypertropher Chondrocyten ermöglicht die Bildung primären Knochens.

➤ Resorption von Knorpelgewebe und Bildung primären Knochens

Chondroclasten bauen die zuvor mineralisierte Knorpelmatrix wieder ab und es kommt zum Aufbau primären Knochens. Zeitgleich steigt der Pegel an TNF- α an und auch für die Osteoclastogenese entscheidende Mediatoren werden gebildet, allen voran RANKL. Zum Abschluss dieser Phase wird der primäre Knochen von den entstehenden Osteoclasten resorbiert und die letzte Phase eingeläutet.

➤ Bildung sekundären Knochens

Während das primäre Knochengewebe abgebaut wird, wird bereits sekundärer Knochen aufgebaut und somit der Heilungsprozess einer Fraktur abgeschlossen.

Um dem Körper bei der Reparatur schwerwiegender Verletzungen des Knochenapparates helfen zu können, ist es entscheidend, über gute Kenntnisse zu verfügen, wie der Heilungsprozess vonstattengeht. Dies ermöglicht die Verabreichung unterstützender Medikamente, denn es ist von großer Wichtigkeit, zu welchem Zeitpunkt ein bestimmter Faktor an bestimmten Orten ausgeschüttet wird. Darüber hinaus kann aber auch das helfende Eingreifen mit Hilfe von Biomaterialien zum Knochenersatz notwendig werden, weshalb sich der zweite Teil der Einleitung diesen Materialien widmen wird.

1.2 Biomaterialien

Einen groben Umriss des Begriffes „Biomaterial“ kann dieser Definitionsversuch geben: „Biomaterialien sind nicht lebensfähige Materialien, die zur Interaktion mit biologischen Systemen vorgesehen sind“. (Ratner und Bryant 2004) Diese Interaktion kann im Zuge einer medizinischen Anwendung erfolgen, wie etwa als Stent in der Gefäßchirurgie oder als Bestandteil eines Katheters, muss allerdings nicht zwangsläufig direkt in oder an einem Patienten stattfinden. So kann nach dieser Definition auch in Zellkulturen Biomaterial zum Einsatz kommen, wie etwa bei Petrischalen, die zum Zweck der besseren Zelladhäsion mit Polystyren beschichtet wurden. Bereits vor rund 3000 Jahren wurden erste Versuche durchgeführt, Materialien zu medizinischen Zwecken zu implantieren, die Funde von Wundnähten gehen oft sogar noch weiter zurück. Doch diese frühen Versuche von Implantationen mussten zwangsläufig auf Schwierigkeiten stoßen, da weitaus weniger über Immunreaktionen und Abstoßung von Fremdkörpern bekannt war, als die Forschung heutzutage weiß, obwohl auch heute noch vieles zu erforschen bleibt. Den Beginn der modernen Erforschung von Biomaterialien kann man in den 1940er Jahren setzen, in denen der britische Augenarzt Harold Ridley eine wichtige Beobachtung machte. Dr. Ridley bemerkte bei einigen seiner Patienten, die im Zweiten Weltkrieg als Piloten von Kampfflugzeugen des Typs Spitfire gedient hatten, dass diese mitunter Splitter aus Poly-Methylmethacrylat in ihren Augäpfeln hatten, die beim Zerbersten des Daches der Pilotenkanzel eingedrungen waren, und dass diese Wunden ohne Beeinträchtigung der Sehfähigkeit verheilt waren. Diese Beobachtung und Dr. Ridleys Interpretation legten den Grundstein für heutige Katarakt-Operationen, bei denen die Linsen der Patienten durch künstliche Linsen ersetzt werden. In den 1960er Jahren entstand die Theorie, dass durch Körperflüssigkeiten möglicherweise toxische Stoffe aus einigen Implantaten gelöst werden könnten und seither gehört es zu den grundlegenden Anforderungen an Biomaterialien, dass sie selbst und all ihre innerhalb des biologischen Systems, in dem sie

verwendet werden, entstehenden Abbau- und Nebenprodukte nicht toxisch sein dürfen.

Generelle Grundanforderungen an Biomaterialien gelten auch für die Verwendung als Knochenersatzmaterial, jedoch kommen aufgrund der besonderen Eigenschaften des Knochenapparates noch einige weitere hinzu, denen sich die folgenden Abschnitte zuwenden werden.

1.3 Knochenersatzmaterialien

Die Möglichkeiten, den Körper bei regenerativen Prozessen zu unterstützen sind vielfältig und durch die komplexe Natur der körpereigenen Vorgänge ebenfalls sehr kompliziert. Zahlreiche Biomaterialien werden in vielerlei Gebieten eingesetzt, zu denen die Lebensmittelindustrie und die Medizin gleichermaßen gehören, letztere vor allem durch die Anwendungen im Rahmen des tissue-engineering und der regenerativen Medizin, in denen eine große Anzahl unterschiedlicher Substanzen eingesetzt werden, vor allem als „scaffolds“, also sozusagen als Gerüste, in denen Zellen kultiviert werden können. (Shoichet 2009) Die Informationen in dieser Arbeit werden sich hauptsächlich auf Materialien beschränken, die eine Relevanz für die Wundheilung bei Knochen aufweisen sowie auf die noch recht neue Substanzklasse der ELPs, welche im Rahmen dieser Arbeit in Verbindung mit Knochenzellen untersucht wurden.

Die Entscheidung, welches Biomaterial für einen bestimmten Zweck eingesetzt werden sollte, wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, die allesamt in die Überlegungen einfließen sollten um einen bestmöglichen Erfolg der Anwendung zu gestatten. Entscheidend sind hierbei die Eigenschaften des Materials, wie etwa die Lebensdauer in vivo, die mechanische Stabilität oder auch die Interaktion mit den Zellen des Körpers, welche sich vor allem durch die chemischen und strukturellen Eigenschaften der Materialien ergeben. Um eine erfolgreiche Anwendung des Biomaterials zu erreichen, sollte jenes Material genutzt werden, dessen Eigenschaftsprofil am besten zu dem erhofften Endergebnis passt. Dabei kann auf eine große Auswahl bereits verwendeter Substanzen

zurückgegriffen werden oder aber auch ein neuer Stoff synthetisiert werden, der dann in Abhängigkeit von den zuvor definierten Eigenschaften maßgeschneidert werden kann.

Abhängig von einigen dieser Eigenschaften kann man Biomaterialien in ein grobes Schema einteilen, das dem besseren Überblick dienen soll. Diese Einteilung orientiert sich nur an wenigen Eigenschaften, die keinesfalls das gesamte Eigenschaftsprofil eines Biomaterials wiedergeben können, aber dennoch für die Auswahl eines für die gedachte Anwendung passenden Materials von großer Wichtigkeit sind.

1.3.1.1 Unterschiede zwischen biostabilen und bioabbaubaren Materialien

Die Entscheidung für eine dieser beiden Möglichkeiten wird vor allem davon abhängig sein, über welchen Zeitraum hinweg das Biomaterial im Körper verbleiben soll und ob es möglich ist, den Körper zum Ersatz des beschädigten Knochens zu bewegen, etwa durch bioabbaubare „Platzhalter“, die für die Dauer des Heilungsprozesses die Stützfunktion des Knochens übernehmen. Wenn diese Möglichkeit besteht, so wäre sie dem Einsatz einer verweilenden Prothese vorzuziehen, da allein natürlicher Knochen in der Lage ist, alle Funktionen und Aufgaben des Skeletts in vollem Ausmaß zu erfüllen.

1.3.1.1.1 Biostabile Materialien

Biostabile Materialien können vom Körper nicht abgebaut werden und verweilen, bis sie, wie etwa im Fall künstlicher Gelenke, durch Abnützung unbrauchbar werden und ersetzt werden sollten. Ein Beispiel hierfür wäre etwa ein künstliches Hüftgelenk, die es heutzutage des Öfteren eingesetzt wird. (Huebsch und Mooney 2009) Viele dieser Endoprothesen bestehen aus Titan-Legierungen.

Besondere Aufmerksamkeit haben biostabile Polymere erlangt, als mit ihrer Hilfe versucht wurde, Zellen einzuschließen und somit für eine Zelltherapie nutzbar zu machen. Auf diese Weise wären die Zellen vor dem Zugriff des Immunsystems geschützt und könnten für eine Therapie relevante Stoffe unbehelligt in die Blutbahn abgeben, wie etwa Insulin. Es

wurden auch bereits erste Erfolge erzielt, problematisch bleibt aber immer noch, eine ausreichende Zahl an Zellen in diesen abgeschotteten Bereichen einzuschließen, ihre Überlebensfähigkeit zu sichern sowie ihre therapeutische Funktion und auch die Sicherheit dieser Therapie, da es noch Schwierigkeiten bereitet, Immunreaktionen gegen etwaige von den Zellen oder Polymeren abgegebenen Antigene auszuschließen. Einige solcher Versuche wurden mit Alginat/Polylysin als Material für Mikrokapseln durchgeführt. (Shoichet 2009)

Den Großteil der biostabilen Materialien, die Anwendung finden, tun dies in Form eines künstlichen Gelenks. In Österreich wurden allein im Jahr 2006 rund 15.000 Endoprothesen des Hüftgelenks eingesetzt. Diese Prothesen bestehen zumeist aus Titan oder einer Titan-Legierung, da dieses Metall einige entscheidende Vorteile besitzt. Titan ist überaus biokompatibel und es kommt nach Implantation zur Osseointegration, die Prothese wird also nahtlos in den bestehenden Knochenapparat integriert und fungiert nach dem Abschluss dieses Vorgangs als Bestandteil des Skeletts. Auch ist es widerstandsfähig gegenüber Beanspruchungen, ist also einwandfrei dazu in der Lage, die auf den Knochen, den es zu ersetzen hat, ausgeübten Belastungen, wie etwa das Körpergewicht des Patienten zu ertragen, da es große Resistenz gegen Biegen und Brechen aufweist. Ebenso ist es sehr korrosionsbeständig, was eine wichtige Voraussetzung für die Biokompatibilität darstellt. Metalle, die im Körperinneren korrodieren, können eine große Menge an Ionen und abgelösten Partikeln freigeben, die wiederum Immunreaktionen und die Bildung fibrösen Gewebes begünstigen, da Makrophagen die von der Prothese abgeschilferten Fremdkörper entfernen wollen. Dies bewirkt eine Entzündungsreaktion, die den Heilungsprozess verlangsamen kann oder gar die positive Wirkung des Implantats schmälern, wenn sich an der Grenze zwischen Körpergewebe und Metall fibröses Gewebe formt, das eine vollständige Integration der Prothese verhindert und damit ein Lockern der selbigen begünstigt, was zum Versagen der Gelenkersatzes führt. (Santavirta et al., 2003) Titan hingegen ist sehr korrosionsbeständig, da es im Körper oxidiert wird und es so zur Bildung von Titanoxid kommt,

welches eine etwa 10nm breite Schicht bildet, die das darunterliegende Metall vor weiteren Einflüssen durch den Körper schützt. Wenn die Bildung dieser Schicht gestört wird, was durch niedrige pH-Werte oder zu geringen Sauerstoffgehalt an der Implantationsstelle der Fall sein kann, so zeigt sich Titan weitaus empfindlicher gegenüber Korrosion. (Ho 2009) Da es im Rahmen einer Entzündungsreaktion bekanntermaßen zu einer leichten Hypoxie im betroffenen Gewebe kommt wäre eine solche für ein aus Titan bestehendes Implantat demnach gleich im doppelten Sinne unvorteilhaft, da sie nicht nur die spätere Osseointegration der Prothese verhindert, sondern die Bildung der schützenden Titanoxid-Schicht gleichermaßen. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, eine Titan-Prothese vor der Implantation noch aufzubereiten und so ihre Eigenschaften zu verbessern. Eine hiervon wäre eine induzierte Oxidation, sodass die Bildung einer schützenden Titanoxid-Schicht bereits vor dem Einbringen des Implantats in den Körper stattfindet. Diese Methode bringt auch den Vorteil mit sich, dass eine derart aufbereitete Oberfläche aufgeraut ist und somit den Körperzellen einen besseren Haftgrund bietet, was wiederum die Osseointegration des Materials günstig beeinflusst. Ein weiterer Versuch, die Oberfläche für Knochenzellen attraktiver zu gestalten, besteht darin, auf die Oberfläche einer Titan-Prothese Kristalle von HA oder TCP aufzubringen, welche resorbierbar sind und damit die Neubildung des Knochens positiv beeinflussen und lenken können. Ein Problem dieses Ansatzes ist die Brüchigkeit und geringe Widerstandsfähigkeit dieser Kristallschicht, weshalb befürchtet wird, dass die Kristalle sich ablösen könnten und das darunterliegende Metall anfällig für Korrosion zurücklässt. (Ho 2009) Auch besteht das Bestreben, die Oberfläche mit Proteinen zu besetzen, die für die Bildung von Knochen förderlich sind, wie etwa die Familie der BMPs.

Bisher zeigt sich Titan als biokompatibel und gut verträglich, jedoch wurde im Jahr 1997 zum ersten Mal von einer Allergie gegen dieses Metall berichtet, wenngleich die Fälle eher selten sind. Doch Titan als Knochenersatzmaterial hat den Nachteil, dass seine Eigenschaften von denen des natürlichen Knochens doch stark abweichen. Titan ist weitaus

weniger flexibel und schwerer als Knochen, sodass Bedenken bestehen, ob es auf Dauer in der Lage ist, wichtige mechanische Funktionen des Knochens zu übernehmen. Durch seine Beständigkeit ist es zweifelsohne geeignet, großes Gewicht zu tragen, doch durch die dem Knochen unterlegene Flexibilität kann es mechano-sensorische Reize nicht in der Form weiterleiten, wie es natürliches Knochenmaterial könnte, da es durch diese leben einwirkenden Kräfte nicht denselben Verformungen unterliegt. Deshalb wurde nach einem anderen Material gesucht, welches den Knochen weitestgehend imitieren kann. Versuche bestehen unter anderem mit biostabilen Polymeren wie UHMWPE. Zunächst wurden mit diesem Polymer nur dürftige Erfolge erzielt, da sich rasch Abnutzung des Materials zeigte und die Prothesen versagten. Im weiteren Verlauf wurde UHMWPE durch den Zusatz eines Photoinitiators und der Behandlung mit ionisierender Strahlung dem „crosslinking“ unterworfen und die auf diese Weise verstärkten Prothesen erneut getestet. In einer Studie mit einer durchschnittlichen Verweildauer solcher Implantate von 15,5 Jahren zeigte sich bei 87,5% der Patienten keine messbare Abnutzung der Prothesen, was für ein Gelingen der verstärkenden Versuche spricht.

Nach wie vor ist dennoch Titan oder eine Legierung dieses Metalls das Material, das am häufigsten zum Einsatz kommt, wenn ein Gelenk im Zuge einer Operation durch eine Endoprothese ersetzt wird.

1.3.1.1.2 Bioabbaubare Materialien

Bioabbaubare Materialien haben den Vorteil, dass sie nach ihren Abbau keine Rückstände hinterlassen, was eine operative Entfernung unnötig macht, wie dies etwa bei bioabbaubarem Nahtmaterial in der Chirurgie genutzt wird. (Shoichet 2009) Die besondere Schwierigkeit besteht jedoch, wie bereits erwähnt, darin, Substanzen zu finden, die weder zum Zeitpunkt des Einbringens noch in irgendeinem Stadium des Abbaus toxische Wirkung haben dürfen.

Eine weitere Herausforderung ist die exakte Bestimmung des Verlaufs dieses Abbaus. Ein eingebrachtes Material hat oft die Aufgabe,

körpereigene Strukturen bis zur Wiedherstellung dieser zu ersetzen und demnach ist es für den Heilungsprozess hinderlich, wenn die mechanische Stabilität dieses Materials zu früh beeinträchtigt wird. Dies kann der Fall sein, wenn Erosion stattfindet, bevor der Körper ausreichend Zeit hatte, die beschädigte Struktur zu ersetzen, sei dies nun ein gebrochener Knochen, der mit Hilfe eines Biomaterials versorgt wurde, oder die Haut bei einer Operationsnaht. Grundsätzlich kann man zwischen zwei Arten der Erosion unterscheiden, Oberflächen- oder Bulkerosion, wobei es von dem Material abhängig ist, welche Art eintritt. Wenn es bei Polymeren zur Bulkerosion kommt, so behalten diese ihre Struktur größtenteils, bis jener Punkt erreicht ist, an dem die Molekularmasse des im Abbau begriffenen Polymers ausreichend gering ist, dass es in den umliegenden Flüssigkeiten gelöst werden kann. Bei Oberflächenerosion verliert ein Stoff seine mechanische Stabilität nach und nach, bis sie nicht mehr ausreicht, um die an ihn gestellten Ansprüche und Belastungen auszuhalten und die Konstruktion bricht. (Shoichet 2009) Demnach müssen biodegradable Stoffe eher langsam abgebaut werden, damit dem Körper genug Zeit bleibt, die Stützfunktionen, die ihm die Biomaterialien bisher abgenommen haben, wieder selbst zu übernehmen.

Aufgrund der beim Abbau stattfindenden Vorgänge lässt sich die Art des Abbaus noch genauer definieren. Dies erlaubt eine exaktere Definition unterschiedlicher Materialien und damit auch die bessere Berücksichtigung einiger Eigenschaften der Abbauvorgänge und etwaige Folgen des Abbaus, die für die Auswahl des passenden Materials von Bedeutung sein können. Hier sei eine Definition nach Vert genannt. (Hutmacher 2000)

➤ Biodegradable Materialien

Diese Materialien zerfallen aufgrund der durch den Körper vermittelten Spaltung der Verbindungen zwischen den Makromolekülen, welche das Material aufbauen, allerdings werden sie nicht zwangsläufig auch aus dem Körper ausgeschieden. Wichtig hierbei ist, dass der Abbau durch körpereigene Vorgänge und Mechanismen bedingt ist, für die

Definition dieses Begriffs werden etwaige bakterielle Abbaumechanismen sowie solche, die durch Pilze oder exogene Effekte vermittelt werden, nicht in Betracht gezogen. Körpereigene Abbaureaktionen zerstören hierbei die zusammenhängende Struktur des Materials, aber nicht zwangsläufig die einzelnen Makromoleküle, die das Material aufbauen. Im Zuge dieses Abbaus können jedoch Fragmente und Spaltprodukte entstehen, die sich zwar von der Position des implantierten Materials entfernen können, aber nicht unbedingt auch durch Ausscheidung aus dem Körper eliminiert werden.

➤ Bioresorbierbare Materialien

Diese Materialien sind Bulkerosion unterworfen und anschließender Resorption, sie werden also durch körpereigene Vorgänge eliminiert, mit oder ohne vorangegangene Metabolisation. Ein bioresorbierbares Material wird dieser Definition zufolge vollständig aus dem Körper entfernt, sodass nach der Bulkerosion und der Elimination der Abbauprodukte keinerlei Rückstände des Materials im Körper verbleiben.

➤ Bioerodierbare Materialien

Diese Materialien unterscheiden sich dadurch von bioresorbierbaren Materialien, dass sie Oberflächenerosion unterworfen sind. Ansonsten allerdings gleichen sie in den für diese Definition berücksichtigten Eigenschaften den bioresorbierbaren Materialien, denn auch die bioerodierbaren Materialien werden nach Erosion, in diesem Fall eben Oberflächenerosion, vollständig eliminiert, wobei zuvor eine Metabolisation stattfinden kann. Es bleiben keine Rückstände im Körper, da alle Bestandteile durch natürliche Vorgänge vollständig aus dem Körper entfernt werden.

➤ Bioabsorbierbare Materialien

Diese Materialien können in Körperflüssigkeiten gelöst werden, ohne dass zuvor ein Abbau der Moleküle erfolgen muss, welche das Material aufbauen, die Kettenlänge der Makromoleküle oder die

Molekularmasse werden also nicht verringert, um die Löslichkeit des Materials zu erreichen. Bioabsorbierbare Materialien können zugleich auch bioresorbierbar sein, sofern die gelösten Makromoleküle ausgeschieden werden, dies ist aber nicht zwangsläufig erforderlich.

1.3.1.2 Unterschiede zwischen Materialien synthetischen und natürlichen Ursprungs

Die Quelle eines Materials wird vor allem dann in die Entscheidung mit einfließen, wenn die Verfügbarkeit der Substanzen problematisch sein kann. Ebenso kann der Ursprung einen Einfluss auf die Fähigkeit der Materialien haben mit Zellen zu interagieren, wobei beispielsweise sowohl die starke, wie auch die schwache Anheftung von Zellen von Vorteil sein kann, abhängig davon, was erreicht werden soll.

1.3.1.2.1 Synthetische Materialien

Synthetische Materialien haben den großen Vorteil, dass sie speziell auf die gewünschten Eigenschaften zugeschnitten werden können, die sich durch die gedachte Anwendung ergeben. Problematisch ist jedoch die Tatsache, dass synthetische Materialien mitunter in Abbauprodukte zerlegt werden, die toxisch wirken, was eine gründliche Testung nötig macht, um derlei Risiken ausschließen zu können. Ein sicheres Material hingegen kann exakt so geformt werden, wie es der Anwendung entsprechend günstig wäre, beispielsweise kann PEG, das an sich auf Zellen eher abweisend wirkt und durch seine große Hydrathülle keine Angriffsfläche für Proteine und Zellen bietet, durch bestimmte Proteine, die synthetisch an die PEG-Ketten gehängt werden, modifiziert werden und dadurch gezielt nur das Wachstum ganz genau definierter Zellarten erlauben. (Salinas und Anseth 2008)

Ein weiteres gut erforschtes Material synthetischen Ursprungs ist PLGA. Dieses wird schon seit vielen Jahren in der Chirurgie als Nahtmaterial eingesetzt, das nicht gezogen werden muss, da sich die Fäden mit der Zeit auflösen. Der große Vorteil von PLGA liegt darin, dass es von körpereigenen Enzymen abgebaut wird und die Abbauprodukte bestens bekannt sind sowie für den Körper verträglich, wird doch eines dieser Produkte, Milchsäure, bei großer Muskelaktivität auch im Körper selbst produziert. (Shoichet 2009)

Das große Feld an synthetische Materialien bietet viele Möglichkeiten, gezielt auf die Bedürfnisse bestimmter Anwendungen einzugehen und somit das bestmögliche Ergebnis zu ermöglichen. Dennoch gibt es noch

vieles zu erforschen und zu verbessern, um Materialien mit noch größerer Sicherheit und Verlässlichkeit zu erreichen.

1.3.1.2.2 Materialien natürlichen Ursprungs

Materialien, die in der Natur vorkommen, haben besondere Eigenschaften, die von synthetisch hergestellten Produkten oft nur mit großer Schwierigkeit oder gar nicht imitiert werden können. Auch ist bei natürlichen Substanzen die Gefahr einer Unverträglichkeit oder Toxizität geringer, da dies bei Verwendung eines Stoffes, der von Natur aus im Körper vorhanden ist, ausgeschlossen werden kann, wie dies etwa bei Collagen der Fall ist. Ein Nachteil natürlicher Stoffe ist jedoch die mitunter begrenzte Verfügbarkeit sowie etwaige Schwankungen zwischen einzelnen Chargen, was bei Naturprodukten kaum vermeidbar erscheint. Hinzu kommt noch, dass, abhängig von der Quelle des Materials, eventuell Pathogene vorhanden sind, die zunächst entfernt werden müssten, bevor es zu einer Anwendung kommen kann. Dies stellt allerdings mitunter eine weitere Herausforderung dar, da einige gängige Sterilisationsmethoden mit den Materialien nicht kompatibel sind. (Singh et al., 2010)

Materialien natürlichen Ursprungs zeichnen sich vor allem durch ihre große Verträglichkeit aus und die besonderen Eigenschaften, die ihnen innewohnen. Collagen etwa bietet Zellen gute Möglichkeiten der Anheftung, da viele Zellen über Integrine verfügen, die an die Struktur von Collagen binden, während Agarose, im Gegensatz dazu, kaum von Zellen besiedelt wird. Beide Materialien können allerdings modifiziert werden, sodass ihre Fähigkeit, Zellen zu binden, beeinflusst wird, was es im Fall der Agarose gestattet, sich nur bestimmte Zellarten anheften zu lassen, vergleichbar mit dieser Möglichkeit zu einer Modifikation für das synthetische Material PEG. (Shoichet 2009)

1.3.2 Grundanforderungen an Knochenersatzmaterialien

Grundsätzlich gilt für alle Materialien, die innerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers Anwendung finden, dass sie biokompatibel, nicht toxisch, nicht inflammatorisch und nicht mutagen wirken dürfen. Ganz besondere Wichtigkeit kommt diesen Eigenschaften zu, wenn das verwendete Biomaterial im Körper durch Vorgänge unterschiedlicher Natur abgebaut wird, denn in einem solchen Fall dürfen alle etwaigen Abbauprodukte ebenfalls kein Risiko für den Patienten darstellen. Auch sie müssen demnach biokompatibel, nicht toxisch, nicht inflammatorisch und nicht mutagen sein, um angewendet werden zu können. (Shoichet 2009) Soll das implantierte Biomaterial als Knochenersatz dienen, so kommen noch einige weitere Anforderungen hinzu, die eine gute Funktion des Materials gewährleisten sollen. Wie zuvor schon erwähnt, ist das menschliche Skelett ein Apparat mit vielen Aufgaben und sehr komplexen Reparatur- und Regenerationsmechanismen, sodass gute Kenntnis der Vorgänge bei der Heilung eines Knochenbruchs vonnöten ist, um den Körper durch Medikamente und Implantate bestmöglich bei Heilungsprozessen zu unterstützen, denn Medikamente und Materialien können nur dann wirklich hilfreich eingreifen, wenn sie die natürlichen Vorgänge nicht behindern, sondern unterstützen und gegebenenfalls in richtige Bahnen leiten.

1.3.2.1 Osseointegration und Immunreaktionen

Wenn nach einem Trauma, das Schaden an einem Knochen verursacht hat, ein Biomaterial implantiert wird, um die Heilung zu unterstützen, so ist das Ziel eines abbaubaren Materials, dass es die Stützfunktion des beschädigten Knochens so lange übernimmt, bis dieser regeneriert werden konnte und in der Lage ist, diese Aufgabe wieder selbst wahrzunehmen, nachdem das Implantat abgebaut wurde, während bei einem biostabilen Material das Ziel der Implantation darin besteht, die Prothese in den Knochenapparat zu integrieren, damit es dauerhaft die Stützfunktion des zu ersetzenden Knochens auf sich nimmt. Um dazu in der Lage zu sein, muss das Biomaterial in das Skelett aufgenommen werden, Ziel ist also die Osseointegration. Diese wird dann erreicht, wenn

das Implantat direkt durch die Bildung von Knochengewebe verankert wird, ohne, dass zwischen dem Implantat und dem Knochen fibröses Gewebe gebildet wird, welches unter einem Lichtmikroskop sichtbar wäre. (Ho 2009) Das erwähnte fibröse Gewebe kann als Folge einer lokalen Entzündungsreaktion an der Implantationsstelle entstehen. Es lässt sich kaum verhindern, dass der Körper mit einer Entzündung auf das Einbringen eines fremden Materials reagiert. Bei einer einfachen Verletzung tritt Blut aus und dieses gerinnt durch die Einwirkung von Blutplättchen und der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Anschließend wandern Monocyten aus dem Gefäßsystem in das betroffene Gewebe ein und differenzieren aus zu Makrophagen um das Blutgerinnsel wieder aufzulösen. (Anderson et al., 2008) Gleichzeitig werden auch abgestorbene Zellen und eventuelle Keime entfernt, sowie Fremdkörper und unter dem Einfluss der Makrophagen und von ihnen ausgeschütteter Wachstumsfaktoren werden Zellen zum Wiederaufbau des verletzten Gewebes rekrutiert, wie etwa Endothelzellen, die zur Vaskularisierung der betroffenen Stelle führen. Das granulöse Gewebe, das sich während dieser Immunreaktion bildet, wird bei einer ideal verlaufenden Heilung nach und nach durch extrazelluläre Matrix ersetzt, jedoch bleibt meist auch Narbengewebe zurück, welches aus granulösem Gewebe entsteht, das nicht zu einer extrazellulären Matrix umgesetzt werden konnte. Bei der Implantation eines Materials laufen diese Vorgänge in ähnlicher Weise ab, da bei einer Operation, die für eine Implantation nötig ist, stets Gewebe verletzt wird, sodass sich auch hier ein Blutgerinnsel bildet. Jedoch tritt bereits dann ein wesentlicher Unterschied zu einem gewöhnlichen Heilungsprozess auf. An die Oberfläche eines Biomaterials werden Proteine adsorbiert und die Adsorption verläuft, wenn das Implantat nicht auf besondere Weise modifiziert wurde unspezifisch, was in einem natürlichen Heilungsprozess nicht der Fall ist. Diese Adsorption kann dazu führen, dass die angelagerten Proteine mitunter auch denaturiert werden, was die Theorie aufgeworfen hat, dass dies bereits den Beginn einer schwerwiegenden Entzündungsreaktion ermöglicht, der sogenannten „foreign body reaction“. (Ratner und Bryant 2004) Hierbei

fusionieren die rekrutierten Makrophagen zu FBGCs und können eine chronische Entzündung bewirken, die über die gesamte Lebensdauer des Implantats hinweg bestehen bleiben kann. Eine anfängliche Entzündungsreaktion lässt sich nicht verhindern, doch es ist erstrebenswert, diese entzündliche Reaktion so gering und kurz wie möglich zu halten, da bei einer heftigen Reaktion des Körpers die Möglichkeit besteht, dass sich zum Schutz vor dem fremden Material eine fibröse Schicht zwischen diesem Entzündungsherd und den Körperzellen bildet. Die Bildung einer solchen fibrösen Kapsel würde das verwendete Biomaterial vom Rest des Körpers abschotten und somit keine Integration des Biomaterials zulassen, was bei Ersatz körpereigener Strukturen wie Knorpel oder Knochen jedoch den Sinn der Anwendung darstellt. Darüber hinaus würden Zellen, die auf dem Biomaterial kultiviert und dann damit in den Körper eingebracht wurden, um in vivo ihre Wirkung zu entfalten, durch das Fehlen von Blutgefäßen absterben und keine Hilfe mehr bieten können. (Shoichet 2009) Doch nicht nur eine Abschottung des Implantats durch fibröses Gewebe kann zu einem Versagen des Materials führen, sondern auch das Einwirken von Makrophagen bei einer Infektion der Implantationsstelle kann das Implantat beschädigen und seine günstige Wirkung einschränken oder gar zum völligen Versagen des Implantats führen. Üblicherweise besteht über einen Zeitraum von rund zwei Wochen nach Implantation eine Entzündung des Gewebes, die allerdings nur die Reaktion des Körpers auf das Implantat zeigt, jedoch noch keinen negativen Einfluss hat. Erst bei einer Entzündung, die länger als drei Wochen anhält ist eine Infektion sehr wahrscheinlich und die dadurch bedingte langanhaltende Entzündung des Gewebes kann ernsthafte Schäden auch an dem eingesetzten Biomaterial herbeiführen. Bei einer derartigen Infektion werden ruhende Makrophagen aktiviert, jedoch nicht, wie sonst eher üblich, durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder körperfremde Antigene, sondern durch das Einwirken von IL-4 oder IL-13. Auf diese alternative Weise aktivierte Makrophagen haben das Potential zu sogenannten foreign body giant cells (FBGCs) zu fusionieren, die weitaus größere Partikel, die eventuell von einem Implantat abgeschilfert

wurden, zu phagocytieren, als Makrophagen dies könnten, da Makrophagen Partikel bis zu einem maximalen Durchmesser von etwa 5µm phagocytieren können, FBGCs jedoch selbst noch Partikel, die größer als 10µm sind. Für die Fusion von aktivierten Makrophagen zu FBGCs ist nicht nur die Aktivierung durch IL-4 oder IL-13 nötig, sondern auch, dass die Oberfläche, auf der sich diese Makrophagen befinden, eine Fusion zulässt, also spielt auch das Biomaterial an sich eine große Rolle. Wenn es zur Aktivierung der Makrophagen und zur Bildung von FBGCs gekommen ist, so sind diese in der Lage, in den Zwischenraum, der sich zwischen dem Biomaterial und den Zellen selbst befindet, Protonen, matrixabbauende Enzyme sowie Sauerstoffradikale abzugeben, welche das implantierte Biomaterial angreifen und durch Oxidation beschädigen können. Auf diese Weise angegriffene Materialien sind weitaus empfindlicher gegenüber Infektionen, was vermutlich dadurch begründet ist, dass die vorhandenen Makrophagen die zur Abwehr von Bakterien und anderen Erregern benötigten ROS bereits gegen das Biomaterial gerichtet haben und nun über keine weiteren Kapazitäten mehr verfügen. Weiters bewirkt der oxidative Stress bei bereits mechanisch strapazierten Biomaterialien, wie es ein gewichtstragender Knochen zweifelsohne wäre, die Bildung von Rissen in der Oberfläche des Materials, wodurch die Oberfläche weiter vergrößert wird und somit neu freigelegte Bereiche weiterer Oxidation ausgesetzt sind. (Anderson, et al. 2008) In einigen Polymeren, die zur Implantation gedacht sind, wie etwa bei Herzschrittmachern, finden sich deshalb in der Zusammensetzung des Polymers auch Antioxidantien, welche bei einer Entzündung die Schäden durch eine Oxidation gering halten sollen, doch ist dies mitunter nicht ausreichend.

Demnach ist es von großer Wichtigkeit eine Entzündung an der Stelle der Implantation, die länger dauert, als diejenige, welche für den Beginn des Heilungsprozesses nötig ist, zu verhindern, damit es nicht zu einer Abkapselung oder Beschädigung des Biomaterials kommt und somit zu einem Versagen des Implantats. Demnach erscheint es vorteilhaft, die Ansiedelung von Monocyten und Makrophagen im umgebenden Gewebe

und auf der Oberfläche des implantierten Materials zu verhindern und es bieten sich mehrere Möglichkeiten, Einfluss auf die Besiedelung des Materials zu nehmen. Dadurch könnten sowohl Entzündungsreaktionen minimiert, wie auch die Knochenneubildung begünstigt werden. Jedoch sollte die Besiedelung mit Makrophagen nicht vollständig verhindert werden, wenn die Möglichkeiten zu derart großer Einflussnahme einmal bestehen, denn, wie zuvor erwähnt, erhöht sich das Risiko einer Infektion deutlich, wenn an der Implantationsstelle keine Makrophagen vorhanden sind, die Krankheitserreger abwehren könnten.

1.3.2.1.1 Ansätze zur Förderung der Osseointegration

Der Erfolg der Osseointegration ist nicht allein davon abhängig, ob es zu einer Entzündungsreaktion kommt, sondern zu einem gewissen Grad auch davon, wo die Implantation eines Knochenersatzmaterials vorgenommen wird und wie es um den dort vorhandenen Knochen beschieden ist, also ob zusätzlich zu einem Trauma, das ein Implantat nötig gemacht hat, eine Erkrankung vorliegt. Um eine Integration eines Implantats zu fördern, bieten sich mehrere Möglichkeiten an, die im Idealfall zur Osseointegration des Implantats führen, unabhängig davon, an welcher Stelle es eingesetzt wird und welche Bedingungen dort herrschen. (Puleo und Nanci 1999)

1.3.2.1.1.1 Physikochemisch

Durch eine Veränderung in den physikochemischen Eigenschaften des Implantats kann auch Einfluss auf die Interaktion des Implantats mit Zellen genommen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Oberfläche eines Implantats elektrisch zu laden, wobei bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden, da einige Gruppen sowohl bei positiver als auch bei negativer Oberflächenladung erhöhtes Knochenwachstum zeigen konnten.

Ein weiterer physikochemischer Faktor, der Einfluss nehmen kann, ist die chemische Zusammensetzung des Materials und so wurden Versuche gestartet, auf den Oberflächen von Implantaten Beschichtungen aus TCP aufzubringen, da diese Verbindung in chemischer Hinsicht dem menschlichen Knochen ähnelt. Hierbei zeigte sich jedoch das Problem,

dass diese Beschichtungen oft sehr brüchig waren, wodurch Risse und Bruchstellen in der Oberflächenbeschichtung auftraten, was die Oberfläche des Implantats darunter freigegeben hat. Dadurch geht einerseits der positive Effekt der Beschichtung verloren, andererseits setzt dies auch das Implantat wieder den Effekten der Körperzellen aus, wodurch es beschädigt werden könnte oder Partikel abgeschilfert werden können, die eine Entzündungsreaktion begünstigen können.

Die Hydrophilität beziehungsweise Hydrophobizität eines Materials ist durch seine chemische Struktur vorgegeben und eine wichtige Eigenschaft, die großen Einfluss auf die Interaktion des Biomaterials mit Serumproteinen und in der Folge mit Zellen nimmt. Sobald ein Material in den Körper eingebracht wird, erreichen Körperflüssigkeiten seine Oberfläche und sofort nach Einbringung setzen sich Serumproteine auf dem Material ab, noch lange, bevor Zellen das Material besiedeln. Dies gilt auch in der Zellkultur, denn die im Medium enthaltenen Proteine setzen sich ebenfalls auf der Oberfläche der Materialien ab, wobei es entscheidend ist, dass sie in einer Art und Weise gebunden werden, die ihnen noch eine gewisse Beweglichkeit erlaubt und wichtige Bindungsstellen für Körperzellen nicht durch sterische Hindernisse unzugänglich werden. Diese adsorbierten Proteine bilden in vivo und in vitro die Grundlage der Interaktionen zwischen Biomaterial und Zellen. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften ist nach den Erkenntnissen mehrerer Gruppen für die Adhäsion von Zellen am besten geeignet. (Vagaska et al., 2010). Hingegen können Serumproteine auf einem stark hydrophilen Material aufgrund der großen Hydrathülle keinen engen Kontakt mit der Oberfläche des Materials eingehen und werden nur locker gebunden. Diese lose Bindung reicht nicht aus, um Zellen an das Material zu binden und sie festsetzen zu lassen, sodass nur geringe Zelladhäsion besteht. Hydrophobe Materialien binden die Proteine hingegen zu stark, sodass diese denaturiert werden und wichtige Bindungsstellen entweder verändert oder sterisch nicht zugänglich sind. Darüber hinaus wurden auf hydrophoben Oberflächen größere Mengen gebundenen Albumins

gefunden als auf Flächen mit geringerer Hydrophobizität, was die Zelladhäsion weiter verringert, da Albumin an sich bereits die Anheftung von Zellen verhindert. Diese geringe Bindung von Zellen ist ein Nachteil, da fehlende Interaktion mit Zellen auch eine Integration des Biomaterials in die Umgebung des zu ersetzenden Knochens verhindert, jedoch wurden bioinerte Materialien dennoch eine Zeitlang angestrebt, da sie auch keine Interaktionen mit Immunzellen eingehen und so versucht wurde, Immunreaktionen zu minimieren. (Anselme 2000)

1.3.2.1.1.2 Morphologisch

Auch die Topographie der Oberfläche eines Implantats bestimmt seine Interaktion mit Körperzellen. Die Rauheit der Oberfläche und die Größe vorhandener Poren beeinflussen die Adhäsion von Zellen auf dem Material und ihre Fähigkeit, auf dem Biomaterial zu verbleiben. Nicht nur die Größe der Unebenheiten entscheidend, sondern auch die Form der selbigen, allerdings bleibt auf diesem speziellen Gebiet vieles noch zu erforschen. Jedoch hat sich gezeigt, dass vor allem Rauheiten im Nanometer-Bereich für die Adhäsion von Osteoblasten sowie auch die spätere Proliferation und Differenzierung von Vorteil sind. Dies liegt womöglich darin begründet, dass die natürliche Struktur des Knochens ebenfalls Unebenheiten aufweist, die in ihrer Größe kleiner sind als 100nm, also in den Nanometer-Bereich hineinfallen, sodass eine Imitation der natürlichen Gegebenheiten im Körper den Zellen bessere Bedingungen bietet als ein Material, das von der Oberfläche des Knochens stark abweichende Eigenschaften aufweist. (Vagaska, et al. 2010)

1.3.2.1.1.3 Biochemisch

Für einen biochemischen Ansatz, die Zelladhäsion zu beeinflussen, sind Erkenntnisse aus der Biologie wichtig darüber, wie die Adhäsion an Oberflächen vonstattengeht und wie man sie demnach zu Gunsten einer bestimmten Zellart verändern kann. Der Vorteil dieser Herangehensweise besteht vor allem darin, dass direkt an der Implantatoberfläche, der Stelle, an der Zellen und Biomaterial interagieren, Einfluss auf die Zellen genommen wird und das gleich von Anfang an, gleich nach Einbringen

des Biomaterials, was bei guter Planung eine genaue Steuerung des Geschehens ermöglicht. Deshalb hat diese Möglichkeit viel Aufmerksamkeit erlangt und bietet großes Potential.

Eine Möglichkeit eines biochemischen Ansatzes besteht darin, Zelladhäsionsmoleküle auf der Oberfläche des Biomaterials aufzubringen. Die Integrine sind die am besten erforschten Adhäsionsmoleküle und reagieren auf die Peptidsequenz RGD. (Vagaska, et al. 2010) Diese Sequenz ist in vielen Zellarten zu finden, wodurch eine Bindung durch Integrine nicht spezifisch ist, was eine Sorge damit experimentierender Gruppen war.

Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von Wachstumsfaktoren, um gezielte Zelladhäsion und Proliferation zu bewirken. Problematisch hierbei ist vor allem, dass die eingesetzten Wachstumsfaktoren, wie etwa TGF- α oder BMPs in ausreichend hoher Konzentration die Zellen erreichen müssen, um einen Effekt haben zu können.

Um einen spezifischen Effekt zu erhalten, könnte auch eine Kombination aus Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen angestrebt werden.

Die Zellantwort hängt auch davon ab, in welchem Zeitraum und welcher Konzentration die Abgabe von Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen erfolgt. Eine sehr einfache Möglichkeit, diese Substanzen auf Biomaterialien aufzubringen besteht darin, Implantate vor der Einbringung in den Körper in eine Lösung dieser Substanzen zu tauchen. Dies hat jedoch den Nachteil, dass die Abgabe nicht genau kontrolliert werden kann und die beeinflussenden Faktoren nur lose an die Oberfläche des Implantats gebunden sind, sodass sie mitunter schnell desorbieren und damit ihr positiver Effekt verloren geht. Weitaus schwieriger ist die Immobilisation von Faktoren auf der Oberfläche eines Materials, doch bietet dies den Vorteil, nicht nur die Konzentration der Proteine genau kontrollieren zu können, sondern auch, an welchen Stellen eines Implantats sie vorkommen, wodurch etwa gleichzeitige Förderung von Knochen und Knorpelwachstum ermöglicht werden könnte. (Alhadlaq und Mao 2003) Bei metallischen Implantaten können Faktoren zum Beispiel an der äußersten, oxidierten Schicht an den vorhandenen OH-

Gruppen der Metalloxide angebracht werden. Eine Herausforderung für die Proteinchemie besteht darin, die funktionellen Gruppen eines Wachstumsfaktors oder eines Adhäsionsmoleküls durch Schutzgruppen zu maskieren und somit die Möglichkeit zu haben, die Proteine auf ganz exakt definierte Weise an die Oberfläche der Biomaterialien zu binden, sodass ein bestimmter Abschnitt des Proteins den Zellen präsentiert wird. (Puleo und Nanci 1999)

1.3.2.2 Mechanische Stabilität

Wann immer eine Kraft auf ein Material ausgeübt wird, sei dies nun Druck, Dehnung oder Drehung, so wird dieses Material einer Deformation unterworfen. Ob das beanspruchte Material die einwirkenden Kräften unbeschadet übersteht, wieder zu seiner Ausgangsform zurückfindet oder gar bricht, hängt nicht nur von den Kräften ab, die ausgeübt werden, deren Intensität, Richtung und Dauer, sondern in hohem Maß auch von dem betroffenen Material und seinen mechanischen Eigenschaften, etwa Festigkeit oder Flexibilität. Diese können getestet werden, indem eine Probe des zu testenden Materials durch eine Maschine einer reproduzierbaren und bekannten Kraft, Dehnung oder Druck, ausgesetzt wird. Dieser Belastungstest eignet sich vor allem dafür, die mechanischen Merkmale verschiedener Materialien untereinander zu vergleichen, seien dies nun Knochen unterschiedlichen Ursprungs oder Knochenersatzmaterialien. (Rubin und Rubin 2006)

1.3.2.2.1 Auswirkungen von einwirkenden Kräften auf Materialien

Durch das Einwirken von Kräften wie Druck oder Dehnung verformt sich das betroffene Material, wobei es, abhängig von seinen Eigenschaften, zunächst wieder in der Lage ist, unbeschadet in seine ursprüngliche Form zurückzukehren, solange die einwirkende Kraft den sogenannten flexiblen Bereich des Materials nicht überschreiten. Wie groß dieser Bereich ist, hängt vor allem davon ab, wie biegsam das Material ist, das den Kräften unterworfen wurde, wobei gilt: Je flexibler das Material, desto größer können die darauf ausgeübten Kräfte sein, ohne dass Schaden angerichtet wird und das Material kann nach Aufhebung dieser Kräfte

wieder in seine ursprüngliche Form zurückkehren. Jedoch bestimmt die Festigkeit eines Materials, wie groß die Kräfte sein können, die das Material zu erdulden in der Lage ist. Übertreffen die auf das Material ausgeübten Kräfte den flexiblen Bereich der Substanz, so entstehen Schäden an dem Material. Zunächst sind diese klein, bei Knochen werden sie „microcracks“ genannt, aber wenn die einwirkenden Kräfte weiterhin steigen, kommt es zum völligen Versagen des Materials: Ein Knochen bricht.

1.3.2.2.2 Mechanische Eigenschaften des Knochens

Die mechanischen Eigenschaften der Knochen ergeben sich aus ihrem Aufbau aus Collagen-Fasern und mineralisierter Matrix. Die Organisation und Reife der Collagen-Fasern bestimmt dabei die Flexibilität des Knochens, die Dichte und Zusammensetzung der mineralisierten Matrix die Festigkeit des Knochens und das Zusammenspiel dieser beiden Hauptkomponenten ergibt ein Material, das sowohl biegefest als auch flexibel ist, was die besonderen Eigenschaften des Knochens ermöglicht, denn Knochen sind in der Lage, große Belastungen zu ertragen, sowohl Druck, als auch Dehnung. Die Widerstandskraft von Knochen reicht an diese von Gusseisen heran, dabei sind sie allerdings immer noch von geringem Gewicht. (Rubin und Rubin 2006) Zum leichteren Verständnis des Zusammenspiels zwischen den flexiblen Eigenschaften des Collagens und den biegefesten des Hydroxylapatites kann man sich Stahlbeton vorstellen. Beton allein ist sehr widerstandsfähig gegen Druck, wie es auch Hydroxylapatit ist, kann Zug jedoch nur wenig entgegensetzen. Verstärkt man Beton jedoch mit Stahlträgern, die Flexibilität aufweisen, oder Hydroxylapatit mit Collagenfasern, dann erhöht sich die Widerstandskraft des Materials beträchtlich.

Eine wichtige Aufgabe des Knochenapparates besteht darin, dem Körper Bewegungen zu ermöglichen und ihn zu stützen. Bei der Ausübung dieser Aufgabe wirken viele verschiedene Kräfte auf das Skelett ein, die je nach ihrer Intensität auch Schaden anrichten können. Wie groß einwirkende Kräfte werden können, bevor Knochen durch sie beschädigt werden,

hängt zum einen von der Art des betroffenen Knochens ab, zum anderen von der Art der ausgeübten Kraft. Knochen ist ein anisotropisches Material, es macht für die mechanischen Eigenschaften des Knochens also einen Unterschied, aus welcher Richtung eine Kraft auf ihn einwirkt. So ist der Oberschenkelknochen am widerstandsfähigsten gegen Druck, wie er etwa auf ihn ausgeübt wird bei dem Steigen von Treppen, gegen Kräfte die in rechtem Winkel auf ihn einwirken ist er jedoch deutlich empfindlicher und bricht wesentlich leichter unter einer derartigen Belastung, wie sie etwa bei einem Schlag oder Sturz entstehen kann. Die mechanischen Eigenschaften von trabekulärem Knochen sind komplexer als die von corticalem Knochen, da die enge Verzweigung und Dichte sowie auch die genaue Stelle, an der sich der Knochen im Körper befindet, großen Einfluss auf die Stabilität des trabekulären Knochens haben. Zudem können bereits kleine Veränderungen in den Eigenschaften der Knochen, etwa ihr Mineralisationsgrad, die Porosität oder eine Vielzahl kleinerer Schäden, „microcracks“, die mechanische Stabilität stark beeinflussen. Durch langanhaltende Mangelernährung, die zu Calcium- oder Vitamin-D-Mangel führen kann, oder durch Krankheiten, welche die Stabilität des Knochens beeinträchtigen, wie Osteoporose oder Knochenläsionen durch bestimmte metastasierende Carcinome, kann es beispielsweise zu einer derart großen Beeinträchtigung der Stabilität der Knochen kommen, dass selbst einfache Belastungen wie Treppensteigen bereits zu einem Bruch führen können.

1.3.2.2.1 Mechanobiologie des Knochens

Jedoch sind auf den Knochen ausgeübte Kräfte keinesfalls bloß schädlich, sondern auch essentiell für die nachhaltige Stabilität des Skeletts, da es nur dann durch Beanspruchung zu einem „remodeling“ des Knochenapparates kommen kann, wenn dieser durch einwirkende Kräfte das Signal zur Anpassung erhält. Wie diese Signalisierung funktioniert, ist noch nicht restlos geklärt, einiges ist jedoch bereits bekannt. So hat sich gezeigt, dass Stromazellen im Knochen durch die Auswirkungen von mechanischen Reizen sowohl ihre Proliferationsrate auch als ihre exprimierten Gene verändern können und dass verringerte Schwerkraft,

wie Astronauten sie im Weltall erfahren, die Anzahl an Osteoblasten verringert. Jedoch ist noch nicht bekannt, welche Zellen diese veränderten Bedingungen wahrnehmen und damit die Reaktionen des Knochenapparates in Gang setzen. Da mehr als 95% der Zellen in einem erwachsenen, menschlichen Skelett Osteocyten sind, wurde auch ihre Rolle bei der Wahrnehmung von mechanischen Veränderungen diskutiert. (Rubin und Rubin 2006) Bei dem Differenzierungsschritt von Osteoblasten zu Osteocyten büßen die Zellen zwar einige Organellen ein, dafür verändert sich ihr Phenotyp, sodass sie die Fähigkeit hinzu gewinnen, über cytoplasmatische Ausläufer und gap junctions mit anderen Osteocyten und den bone-lining-cells zu kommunizieren.

Das Skelett reagiert nur dann auf einwirkende Kräfte, wenn diese dynamisch sind, also nicht ständig gleichbleibend, sondern sich zeitabhängig verändern. Es hat sich gezeigt, dass selbst minimale Belastungen den Knochen zu Vorgängen des „remodeling“ anregen, wodurch sowohl die Knochenmasse, als auch die Stabilität des Knochens zunimmt, wenn diese minimalen Belastungen nur in ausreichend hoher Frequenz auf den Körper einwirken. Beispielsweise könnten die Kontraktionen der anliegenden Muskeln bereits ausreichen um diesen Effekt zu erzielen, jedoch wurde auch bereits diskutiert, ob Ultraschall die Heilung eines Knochenbruchs beschleunigen könnte, indem eben dieser Mechanismus angesprochen wird. Es liegen auch Ergebnisse vor, die zeigen, dass eine gewisse Belastung und Deformation der Knochenmatrix sogar für das Überleben von Osteocyten nötig ist, da eine physiologische Belastung die Apoptose-Rate der Osteocyten zu verringern in der Lage ist. (Rubin und Rubin 2006)

1.3.2.2.3 Anforderungen an die Stabilität von Knochenersatzmaterialien

Die komplexen mechanischen Eigenschaften des Knochens sind nötig, damit er seine Aufgaben im Körper erfüllen kann, jedoch stellen sie für die Produktion von Knochenersatzmaterialien eine große Herausforderung dar. Ein ideales Implantat, sei es nun dauerhaft oder nur zeitweise

vorhanden, bis der Körper in der Lage ist, einen Schaden zu reparieren, sollte möglichst ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie sie auch das Material zeigt, welches es ersetzen soll. Bei den bisher genannten Eigenschaften der Knochen wurde nicht berücksichtigt, dass diese mit Art und Lokalisation des Knochens mitunter stark variieren, sondern es wurde ein eher allgemein gehaltener Überblick gegeben, der ebenfalls bereits in der Lage ist zu zeigen, dass die mechanischen Eigenschaften des Knochens komplex sind. Ein Implantat sollte an diese Eigenschaften heranreichen, um ein ideales Ergebnis zu erzielen.

Dabei ist es von großer Wichtigkeit, dass die durch ein Implantat hervorgerufene Immunreaktion möglichst gering gehalten wird. Die Rekrutierung von Immunzellen ist bei jeglicher Art einer Verletzung Voraussetzung des Heilungsprozesses, da in Abhängigkeit von den Aktionen der beteiligten Makrophagen weitere Zellen rekrutiert werden, die in weiterer Folge für den Aufbau des verletzten Gewebes verantwortlich sind. (Ratner und Bryant 2004) Ein Beispiel hierfür wären etwa Endothelzellen, welche nach ihrer Rekrutierung zur Vaskularisierung des Gewebes führen. Dennoch führt eine zu heftige Entzündungsreaktion nicht zur Integration des Implantates, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer chronischen Entzündung, im Zuge derer das granulöse Gewebe, welches das Implantat umgibt, zu Narbengewebe aushärtet und es letztendlich zur Bildung einer fibrösen Kapsel um das vom Immunsystem als Fremdkörper betrachtete Biomaterial kommt. Diese Abschottung des implantierten Materials kann die Funktion beeinträchtigen und sollte daher vermieden werden. Dafür gibt es mittlerweile bereits zahlreiche Ansätze gibt, von denen einige bereits erwähnt wurden.

Weiters sollte das Material auch über eine der Anwendung angemessene Lebensdauer in vivo verfügen. Für manche Anwendungen ist es erwünscht, dass sich das Material möglichst gar nicht zersetzt und über lange Zeit bestehen bleibt, also biostabil ist, wie etwa bei der Implantation einer Endoprothese zum Ersatz eines beschädigten Gelenks. Wenn ein Implantat jedoch nur die Zeitspanne überbrücken soll, in der ein beschädigter Knochen vom Körper ersetzt werden kann, dann sollte es im

Idealfall mit derselben Geschwindigkeit abgebaut werden, mit der neuer Knochen aufgebaut werden kann, also kontrolliert biodegradabel sein. Den genauen Zeitpunkt und Verlauf der Degradation zu bestimmen ist eine große Herausforderung, an der mit großer Anstrengung gearbeitet wird. Verschiedene Ansätze werden zu diesem Zweck verfolgt und einer davon besteht darin in die Struktur von Polymeren „Sollbruchstellen“ einzubringen, die von Enzymen gespalten werden können, die im Körper vorhanden sind. Beispiele hierfür wären Polymere, die mit Ester-Gruppen quervernetzt wurden, welche dann durch Esterasen gespalten werden können. Einer der vielversprechendsten Ansätze besteht darin, das Material des Implantats empfindlich zu gestalten gegenüber Enzymen, die im Zuge des Knochenaufbaus und des Umbaus der extrazellulären Matrix sezerniert werden, sodass Aufbau der körpereigenen Strukturen und Abbau des Implantats genau zeitgleich erfolgen. (Ratner und Bryant 2004), (Rodriguez-Cabello 2005)

Jedoch bestehen an ein Implantat, welches als Knochenersatzmaterial dienen soll, noch weitere Anforderungen, die sich im Besonderen auf die mechanischen Eigenschaften des Biomaterials beziehen. Zum einen sollte ein Implantat widerstandsfähig sein, damit es in der Zeit, in der es die Stützfunktion des zu ersetzenden Knochens übernehmen soll, nicht durch Belastungen beschädigt wird oder gar bricht. Es hat sich gezeigt, dass es von Vorteil wäre, wenn ein Implantat bald nach Einsetzen die Fähigkeit besäße, wie ein Knochen zu fungieren, also auch das Körpergewicht des Patienten zu tragen, da dies die Dauer der Immobilisation verringern würde, was sowohl die Aufenthaltsdauer in einem Krankbett verringern würde, also auch die negativen Effekte auf das Skelett, die durch Bettruhe entstehen. (Rubin und Rubin 2006) Gleichzeitig sollte es aber auch, dem biologischen Vorbild gleich, über eine gewisse Flexibilität verfügen. Denn nur diese gestattet es dem Material, mechanische Reize an die angrenzenden Knochen weiterzugeben und diesen somit die für ein belastungsabhängiges „remodeling“ nötige Information zukommen zu lassen.

Die speziellen mechanischen Eigenschaften des Knochens stellen auch hohe Ansprüche an Biomaterialien, die zum Ersatz eines Knochens eingesetzt werden. Wie zuvor erwähnt ergibt bei einem Knochen die Kombination von Collagen und Hydroxylapatit ein widerstandsfähiges Material, das sowohl Zug als auch Druck standhalten kann. Ein Biomaterial zum Ersatz eines Knochens sollte diese Charakteristika ebenfalls aufweisen, da dies eine ausreichende Festigkeit gegenüber der Beanspruchung durch Bewegungen sicherstellt, allerdings gehen die Anforderungen an ein ideales Knochenersatzmaterial noch weiter. Im Idealfall sollte die Struktur eines Implantats es ihm ermöglichen, die Signale, die aus einwirkenden Kräften resultieren, an seine Umgebung weiterzugeben. In einem gesunden Knochen erfolgt die Weiterleitung solcher Signale, soweit bekannt, über das weitverzweigte Netzwerk der Osteocyten und die ECM. Ein ideales Implantat sollte ebenfalls in der Lage sein, Signale zum „remodeling“ weiterzugeben, denn nur, wenn diese Signale die umliegenden Knochen und ECM erreichen, können neu aufgebaute Knochen und Matrix ebenso stark und einsatzfähig werden wie das ursprüngliche Gewebe, dessen Zerstörung die Implantation eines Knochenersatzmaterials nötig gemacht hat. (Rodriguez-Cabello 2005) Demnach sollte ein Biomaterial, das zum Ersatz eines Knochens dienen soll, ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Flexibilität und Biegefestigkeit aufweisen, wie es das natürliche Vorbild dieser Materialien, der Knochen, tut, damit nicht nur eine ausreichende Widerstandsfähigkeit des Biomaterials gewährleistet ist, sondern auch eine bestmögliche Funktion des Gewebes, welches an das Biomaterial anschließt oder es in letzter Folge ersetzt.

1.3.3 Elastin-ähnliche Polymere

Die Anforderungen an Biomaterialien werden immer komplexer und so besteht die Notwendigkeit, neue Materialien zu erschließen. Deren Eigenschaften müssen die Grundanforderungen an Biomaterialien erfüllen, sodass sie einsetzbar sind. Allerdings besteht zusätzlich auch noch der Wunsch, dass sich diese neuen Materialien durch einfache und

umweltfreundliche Herstellungsverfahren sowie niedrige Produktionskosten auszeichnen. Ein vielversprechender Kandidat, der über viele günstige Eigenschaften verfügt, ist die von der Forschungsgruppe um Urry entdeckte Klasse der Elastin-ähnlichen Polymere. Diese Polypeptide wurden dem Vorbild des natürlichen Proteins Elastin nachempfunden, welches in Säugetieren vorkommt und die Elastizität von Geweben wie Haut und Lunge gewährleistet. Diese Peptid-Polymere verfügen über einige sehr interessante Eigenschaften, die sie zu einem vielversprechenden Werkstoff nicht nur für medizinische Anwendungen machen, sondern eventuell auch als Ersatz für heutzutage tagtäglich verwendete Kunststoffe auf Erdöl-Basis. (Rodríguez-Cabello et al., 2009)

1.3.3.1 Besonderheiten der Polymere aus der Klasse der ELPs

Die Forschungsgruppe um Rodríguez-Cabello, die sich die letzten Jahre hindurch sehr stark mit ELPs auseinandergesetzt hat, äußert in einer Veröffentlichung den Gedanken, dass die Bezeichnung „Polymer“ für diese Stoffklasse irreführend sei, da ELPs im Unterschied zu klassischen Polymeren wie etwa PEG oder PE nicht aus zahlreichen kleinen Monomeren bestehen, die in zufälliger Weise untereinander vernetzt werden. Stattdessen bestehen ELPs wie auch ihr natürliches Vorbild Elastin aus sogenannten „building blocks“, die innerhalb der Sequenz immer wieder wiederholt werden und zumindest im Fall des natürlichen Elastins und einfacher ELPs, ohne große Variation zwischen den einzelnen Blöcken, die in der Sequenz des natürlichen Proteins von dem Pentapeptid VPGVG gebildet werden, also der Aminosäureabfolge Valin-Prolin-Glycin-Valin-Glycin. (Herrero-Vanrell et al., 2005) In ELPs kann die Abfolge noch je nach gewünschter Funktionalität verändert werden, aber bereits diese Struktur ist zur hydrophoben Faltung befähigt. Dabei organisieren sich einzelne Peptid-Stränge variabler, aber genau definierter Länge und Sequenz in wässriger Lösung durch hydrophobe Wechselwirkung zu einem gelartigen Verband. (Rodríguez-Cabello, et al. 2009) Ein einzelner Peptid-Strang eines synthetisch hergestellten ELPs kann innerhalb seiner Sequenz verschiedene Blöcke aufweisen, die aufeinander folgen können, mitunter wiederholt werden und durch ihre Reihenfolge, die Primärstruktur des Peptids, die genauen Eigenschaften des Peptid-Stranges vorgeben.

Alle ELPs weisen eine inverse Temperatur-Transition auf. Dies bedeutet, dass ELPs in wässriger Lösung unterhalb einer bestimmten Temperatur T_T , wasserlöslich sind, wobei die hydrophoben Abschnitte des Peptids durch hydrophobe Hydratisierung von Wassermolekülen umgeben sind, die sich zu Clathraten organisiert haben, demnach also einen höheren Grad an Ordnung aufweisen als die lose verteilten Wassermoleküle in der wässrigen Lösung. In diesem Zustand sind die gelösten Peptid-Stränge nicht organisiert und in zufälliger Weise in Lösung verstreut. Wird jedoch die Temperatur erhöht und jene erreicht, bei der die Transition einsetzt, so

verlieren die Wasser-Clathrate ihre Ordnung und gleichen sich den losen Wassermolekülen an, wodurch sie von den hydrophoben Abschnitten der Peptidsequenz verdrängt werden. Das Peptid faltet sich als Folge dessen durch hydrophobe Wechselwirkung zusammen und bildet eine streng organisierte Struktur aus β -Faltblättern und β - Schleifen, die das Peptid in Wasser unlöslich macht und somit zu einer Bildung und Abgrenzung einer Phase aus Peptid führt. (Urry et al., 1988) Die Temperatur, bei der es zur Transition kommt, kann durch verschiedene Modifikationen verändert werden und auch andere Stimuli als eine Änderung der Temperatur sind als Auslöser möglich, wobei dies in der Primärstruktur des Peptids bereits festgelegt wird.

Gerade diese ITT und die Vielzahl an Möglichkeiten, diese zu nutzen und zu modifizieren, machen viele Vorteile der ELPs aus, die sich auf viele Bereiche der Handhabung der ELPs auswirken, angefangen bei der Produktion, bis hin zu Anwendungsmöglichkeiten in vivo.

1.3.3.2 Vorteile der ELPs

1.3.3.2.1 Produktionsverfahren

Die Herstellungsverfahren klassischer Polymere haben einige Nachteile, die eine dauerhafte Anwendung dieser Rohstoffe vor Schwierigkeiten stellt. Zum einen bestehen die meisten Kunststoffe und in Verwendung befindlichen Polymere aus Produkten, die auf Erdöl-Basis gewonnen werden und Erdöl ist bekanntlich ein endlicher Rohstoff, dessen Reserven sich dem Ende zuneigen. (Rodríguez-Cabello, et al. 2009) ELPs hingegen werden über die in der Pharma-Industrie bereits weitläufig genutzten Methoden der Gentechnik und der Fermentation produziert, wodurch sich zahlreiche Vorteile ergeben. Die Gentechnik hat in den vergangenen Jahren eine große Zahl neuer Möglichkeiten hervorgebracht und es in Kombination mit der Fermentation und Proteinsynthese in kultivierten Zellen ermöglicht, zahlreiche medikamentös verwendete Proteine auf vergleichsweise sichere und billige Art zu produzieren, wie etwa Insulin oder auch humanes Somatostatin. (Crueger und Crueger 1989) Der schwierigste und teuerste Schritt dieses Produktionsverfahrens ist die

Gewinnung eines für das gewünschte Protein kodierenden Gens, doch durch die moderne Gentechnik ist es mittlerweile möglich, eine Sequenz von etwa 150 Basenpaaren mit großer Genauigkeit zu generieren. Durch die gezielte Verwendung von Endonucleasen und enzymatischer Verbindung geteilter DNA-Stränge können mit einiger Geschicklichkeit auch größere Gene gewonnen werden. (Wright et al., 2002) Wenn dieses Gen erst in eine Zelllinie eingebracht wurde, die sich in einem Fermenter kultivieren lässt, im Falle der ELPs meist eine der zahlreichen Linien des Bakteriums *E. coli*, kann die großtechnische Produktion des kodierten Proteins beginnen. Das Erstaunlichste an dieser Produktion ist die Anzahl an positiven Effekten, die sie in sich vereint. Zum einen besteht auf Grund der Proteinsynthese durch kultivierte Zellen keine Heterogenität in dem produzierten Protein, sondern vollständige Homogenität, es wird einzig und allein jenes Protein synthetisiert, für welches das eingefügte Gen kodiert. Klassische Verfahren haben den Nachteil gegenüber der Proteinsynthese in Fermentern, dass viele Reaktionsschritte zu gewissen Teilen von Zufällen abhängen und somit keine Einheitlichkeit im erhaltenen Produkt entsteht, bei einer Fermentation hingegen besteht nahezu völlige Kontrolle über das Produkt. (Rodríguez-Cabello, et al. 2009) Hinzu kommt noch, dass eine klassische, chemische Synthese mit größerer Komplexität des gewünschten Produktes sehr rasch um ein Vielfaches schwieriger und auch immens teurer wird, was bei einer Fermentation nicht der Fall ist. Wie bereits erwähnt, ist der schwierigste Schritt bei diesem Produktionsverfahren die Herstellung des kodierenden Gens, aber sobald dieses in die Zellen eingebracht wurde, verändert sich an dem Aufwand und den Kosten des Verfahrens kaum noch etwas, da es für die Mittel einer produzierenden Firma keinen Unterschied macht, welches Gen die kultivierten Zellen umzusetzen haben. Interessanterweise hat sich in der Forschung von J. Carlos Rodríguez-Cabello et al. sogar gezeigt, dass Zellen mit längeren und komplexeren Proteinen mitunter besser zurechtkommen als mit sehr kleinen. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt vielleicht darin begründet, dass natürlich vorkommende Proteine ebenfalls große Komplexität aufweisen können

und demnach Proteine, die „zu einfach“ sind, also geringere Komplexität als die natürlich vorkommenden aufweisen, für fermentierte Zellen eine Schwierigkeit darstellen. (Rodriguez-Cabello 2005)

Ein weiterer Vorteil der Fermentation gegenüber der klassischen Synthese besteht darin, dass die benötigte Energie weitaus geringer ist. Klassische Synthesen benötigen mitunter einen großen Energie-Eintrag, um eine Reaktion zu ermöglichen, eine Fermentation hingegen benötigt lediglich vergleichsweise niedrige Energien, da es keine Energie einzubringen gilt, außer jener, die für die Aufrechterhaltung der Kultivierungstemperatur vonnöten ist. Diese liegt für die Kultivierung von E- Coli bei 37° Celsius und wird auch bei anderen Zelllinien kaum überschritten. (Crueger und Crueger 1989) darüber hinaus ist das einzige in der Fermentation verwendete Lösungsmittel Wasser, bei klassischen Synthesen kommen jedoch auch oft organische Lösungsmittel zur Anwendung, deren Entsorgung teuer und für die Umwelt problematisch ist. (Rodriguez-Cabello 2005)

Die große Vielseitigkeit der Proteinsynthese in Fermentern ist ebenfalls ein entscheidender Vorteil dieser Produktionstechnik. Durch die Möglichkeiten der Gentechnik kann das zu klonierende Gen für jede einzelne beliebige Peptidsequenz kodieren, sofern ein Triplet für die gewünschte Aminosäure bekannt ist, wobei es kein Hindernis darstellt, wenn die Zellen, die zur Produktion herangezogen werden, eine der in der Abfolge vorkommende Aminosäure in ihrer natürlichen Funktion nicht verwenden würden. Die große Flexibilität der Proteinsynthese ermöglicht es den Zellen, jede beliebige Abfolge an Aminosäuren zu synthetisieren, wenn der Syntheseapparat nur eine Vorlage in Form eines kodierenden Gens erhält. Auch die Ausgangsstoffe für die Proteinsynthese sind vergleichsweise billig und einfach zu beschaffen, da es nicht nötig ist, den Zellen die benötigten Aminosäuren in reiner Form zur Verfügung zu stellen, sondern die Zugabe von einfachen Lieferanten von Kohlenstoff und Stickstoff zum Kultivierungsmedium vollauf ausreichend ist, da sich die Zellen dann mit den Aminosäuren, die in der Synthese verwendet werden, aus diesen Quellen selbstversorgen. Zudem können für die

Kultivierung vieler Zelllinien wie auch E. Coli, welche sehr oft zur Produktion von ELPs eingesetzt werden, als Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff häufig Abfallprodukte aus anderen Industrie-Zweigen verwendet werden. So eignet sich als Lieferant von Kohlenstoff, der meist in Form von Kohlenhydraten zugeführt wird, Melasse aus der Produktion von Saccharose. Die Vorteile der Melasse als Substrat bestehen darin, dass sie recht billig zu bekommen ist, da sie im Zuge der Zuckerproduktion ein Abfallprodukt darstellt und dass sie auch über Vitamine, Spurenelemente und Stickstoffquellen verfügt, welche für die Zellen in Kultur zugänglich sind. Als Stickstoffquelle eignet sich Harnstoff oder Ammoniumsalze, aber auch Hydrolysate aus Fleisch, Gelatine oder Sojamehl können als Substrate verwendet werden. Ebenso auch Sojamehl direkt, das als Abfallprodukt bei der Gewinnung von Sojaöl übrigbleibt, dessen Vorteil darin liegt, dass es nicht nur über Proteine verfügt, sondern auch Kohlenhydrate beinhaltet. (Crueger und Crueger 1989) Die Verwendung billiger Substrate macht einen entscheidenden Vorteil dieses Produktionsverfahrens aus, da dadurch jedes beliebige Peptid produzierbar wird, ohne die Produktionskosten drastisch in die Höhe zu treiben. Es ist also eine vergleichsweise billige Methode, die dennoch eine Vielzahl an Möglichkeiten bietet, ohne dabei Kosten oder Aufwand zu erhöhen. (Rodriguez-Cabello 2005) Überdies ermöglicht dieses Verfahren die Produktion maßgeschneiderter Peptide, deren Eigenschaften durch die Aminosäuresequenz, die sie aufbaut, vorgegeben sind, da völlige Kontrolle über das Produkt der Proteinsynthese in den kultivierten Zellen besteht. (Wright und Conticello 2002)

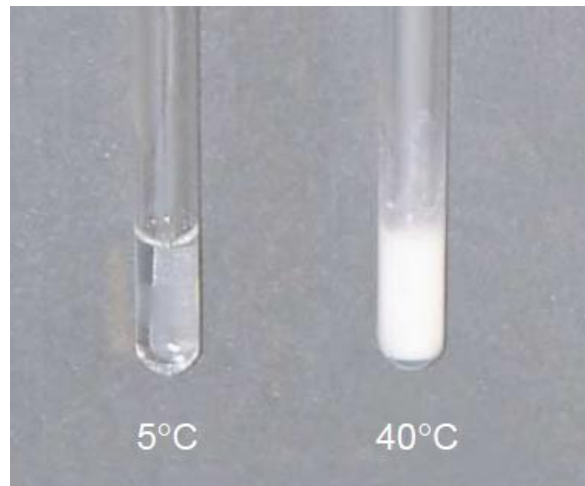
1.3.3.2.2 Self-assembly

Klassische Polymere bestehen aus kleineren Monomeren, die im Zuge einer Polymerisation miteinander verbunden und oft zusätzlich noch durch „crosslinking“ quervernetzt werden. Dieser Vorgang, insbesondere das „crosslinking“ durch Radikale, die durch Oxidation oder einen Photoinitiator in die Polymerlösung eingebracht werden können, sind jedoch zufällig und kaum steuerbar. (Ratner und Bryant 2004) Im Gegensatz dazu bestehen ELPs aus Makromeren, also weitaus größeren

Stücken, die durch sich wiederholende Abschnitte in ihrer Sequenz in Blöcke unterteilt werden können. Bei diesen Makromeren gibt es keine Zufälle, da die Sequenzabfolge der Aminosäuren durch das kodierende Gen vorgegeben ist und somit ganz exakt die Eigenschaften des resultierenden Peptids definiert.

ELPs wurden in ihrer Struktur dem Protein Elastin nachempfunden, welches in Säugetieren vorkommt und die Elastizität von Geweben wie Haut oder Lunge bewirkt. Die generelle Struktur $(VPGXG)_n$, Valin-Prolin-Glycin-X-Glycin, wobei X für jede beliebige natürliche Aminosäure außer Prolin stehen kann, beschreibt die ELPs. Alle Vertreter, die diese Abfolge an Aminosäuren besitzen, zeigen Eigenschaften, die sie für eine Anwendung als Biomaterial sehr interessant machen. (Bessa et al., 2010)

Zu diesen Eigenschaften zählen gute mechanische Eigenschaften, ausgezeichnete Biokompatibilität, die Möglichkeit zur Modifikation durch das Einfügen funktioneller Gruppen und die Tatsache, dass ELPs auf bestimmte äußere Faktoren wie Temperatur, Licht und Ionenstärke reagieren. In Abhängigkeit dieser Empfindlichkeit gegenüber äußerer Stimuli kommt es auch zu einem Phänomen, das Anwendung und Aushärtung dieses Biomaterials in situ ermöglicht, dem self-assembly genannten Phänomen der hydrophoben Faltung in Abhängigkeit von äußeren Reizen wie beispielsweise Temperatur. Bei den meisten ELPs tritt diese inverse Temperatur-Transition bei rund 37° Celsius auf, also bei der durchschnittlichen Körpertemperatur eines Menschen, jedoch kann das Verhalten eines Peptides durch Modifikationen drastisch verändert werden, sodass eine ITT auch erst bei einer Temperatur über 90° Celsius erfolgen kann. (Ratner und Bryant 2004)



Poly(VPGVG) in wässriger Lösung bei einer Konzentration von 5 mg/ml. Abgebildet sind die Lösungen bei einer Temperatur unter 5°C und über 40°C. Die ITT liegt dazwischen, weshalb sich das Material verfestigt. (Rodriguez-Cabello 2005)

Das Phänomen des self-assembly bietet auch für die Verbreitung der ELPs einen großen Vorteil. Unterhalb der Temperatur, bei der es zur Faltung der ELPs kommt, bleiben diese in wässriger Lösung gelöst und so können feste Verunreinigungen aus der Lösung durch einfache Zentrifugation entfernt werden, ohne die ELPs auch gleichzeitig abzutrennen, da diese in Lösung verbleiben. Oberhalb der Transitionstemperatur jedoch falten sich ELPs zusammen, bilden eine eigene, von der wässrigen Lösung abgetrennte Phase und bleiben nach einer Zentrifugation als Pellet im Zentrifugenröhrchen zurück, während der Überstand und lösliche Verunreinigungen abgetrennt werden können. (Di Zio und Tirrell 2003) Diese einfache Art der Aufreinigung ist in vielen Laboratorien bequem durchführbar und meist sind drei solcher Zyklen mit Erhitzen über die Transitionstemperatur/Abkühlen unter die Transitionstemperatur ausreichend, um eine hohe Reinheit von bis zu 95% des ELPs zu erreichen. (Nagapudi et al., 2005a), (Trabbic-Carlson et al., 2003)

1.3.3.2.3 Möglichkeiten der Modifikation der Eigenschaften von ELPs

Das Phänomen des self-assembly ist in der Natur weit verbreitet und beruht auf nicht kovalenten Bindungen, deren vergleichsweise geringe

Stärke dennoch ausreichend ist, um Proteine mit definierter Struktur hervorzubringen. Durch die Imitation natürlicher Proteine konnte auch bei ELPs self-assembly erreicht werden, auch wenn diese Peptid-Polymere mitunter nur noch geringe Ähnlichkeit mit dem natürlichen Protein Elastin aufweisen, da zahlreiche Möglichkeiten zur Modifikation offenstehen. Diese Modifikationen können die Eigenschaften des Peptids drastisch verändern. Die am nächsten liegende Methode der Modifikation ist eine Veränderung der Aminosäuresequenz, da die Eigenschaften eines Peptids bereits in seiner Primärstruktur festgelegt sind. Nicht nur die Art der verwendeten Aminosäuren, sondern auch die Gesamtlänge der Sequenz und das resultierende Molekulargewicht haben großen Einfluss auf die Eigenschaften des Peptids.

Die Auswirkungen einiger Modifikationen gehen ineinander über und kombinieren ihre Wirksamkeit, dennoch werden im Folgenden einige wenige Aspekte herausgegriffen werden, unter deren Einfluss die zuvor vorgenommenen Modifikationen dann ihre Wirkung entfalten.

1.3.3.2.3.1 pH-Wert

Jeder Vertreter der Klasse der ELPs mit einer bestimmten grundlegenden Struktur zeigt self-assembly, sobald eine gewisse Temperatur erreicht wurde, bei der es zur hydrophoben Faltung des Peptids und zu einer Trennung der Phasen zwischen Peptid und Wasser kommt. Die dazu benötigte Temperatur kann moduliert werden und eine Möglichkeit, die ITT zu verändern, besteht darin, bereits die Primärstruktur des Peptids zu verändern, also die Aminosäuresequenz an der vierten Stelle des grundlegenden Pentapeptids (VPGXG)_n. Dabei gilt, je polarer das fertiggestellte Peptid durch die Polarität der an der vierten Stelle eingefügten Aminosäure ist, desto höhere Werte muss die Temperatur der Lösung erreichen, ehe es zu einer Faltung des Peptids kommt. Dabei spielt auch der pH-Wert der Peptidlösung eine große Rolle, da sich die Eigenschaften funktioneller Gruppen in Aminosäuren abhängig von dem vorherrschenden pH verändern. So ist ein Peptid, in dessen Sequenz sich die leicht basische Aminosäure Lysin befindet, oberhalb des pK_a-Wertes

dieser Aminosäure, wenn Lysin demnach deprotoniert wurde und apolarer reagiert als zuvor, bereits bei einer niedrigeren Temperatur der hydrophoben Faltung unterworfen, als das gleiche Peptid in einer Lösung, deren pH-Wert unterhalb des pK_a -Wertes von Lysin liegt, in der Lysin also noch protoniert ist und polarer reagiert. (Costa et al., 2009) Besonders interessant ist diese Möglichkeit der Modifikation, wenn sich durch die Empfindlichkeit gegenüber pH-Werten die Temperatur, bei der es zur Phasentrennung kommt, drastisch verändert. Wenn in einem Peptid Aminosäuren vorkommen, deren Polarität sich durch den Einfluss des pH-Wertes der Umgebung verändert, so ändert sich in Abhängigkeit der Polarität auch die Transitionstemperatur des Peptids, sodass sich alleine durch die Änderung des pH-Wertes die Möglichkeit zur Reversion der Phasentrennung ergibt. Dies könnte beispielsweise genutzt werden, um in einer Umgebung mit gleichbleibender Temperatur, aber veränderlichem pH-Wert gezielt bei einem bestimmten pH-Wert eine Auflösung der hydrophob gefalteten Peptidstruktur zu ermöglichen. In Verbindung mit der Tatsache, dass, je nach Art und Organisation der Aminosäuresequenz, ELPs in der Lage sind, Mizellen zu formen, bietet dieses Verhalten die Gelegenheit, eingeschlossene Stoffe wie beispielsweise Medikamente gezielt freizusetzen. (Rodriguez-Cabello 2005) Auf ähnliche Weise ist es bei diabetischen Mäusen bereits gelungen, Blutglucosewerte durch oral verabreichtes Insulin zu senken, da die Hülle aus Eudragit (PMAA-g-PEG) bei Körpertemperatur der Mäuse im sauren pH des Magens stabil blieb, bei dem neutral bis basischen pH des Darmes jedoch das eingeschlossene Insulin freisetzte und auf diese Weise zur Wirkung brachte, was sich in den verringerten Blutglucosewerten zeigte. (Lowman et al., 1999) Eine ähnliche Anwendung auf diesem oder anderen Gebieten wäre auch für ELPs denkbar.

1.3.3.2.3.2 Licht

In ähnlicher Weise wie auch bei der zuvor genannten Möglichkeit zur Modifikationen, die es ermöglicht, die Transitionstemperatur des Peptids in Abhängigkeit des vorherrschenden pH-Wertes zu verändern, besteht auch die Möglichkeit, diese Modifikation mit Hilfe einer photoreaktiven

funktionellen Gruppe vorzunehmen. Dabei besteht die Möglichkeit, diese erst nach Fertigstellung des Peptids auf chemischem Wege an eine der Seitenkette der Aminosäuren zu koppeln oder nicht natürliche Aminosäuren in die Sequenz einzubauen, die bereits über eine photochrome Gruppe verfügen. Diese Gruppen besitzen sowohl eine cis- als auch eine trans-Form und gehen durch den Einfluss von Licht in die jeweils andere über, zeigen also ein cis-trans-Isomerisation, wobei eine der beiden Formen eine größere Polarität zeigt als die andere. Rodríguez-Cabello et al berichten von einem Peptid, das mit einer nicht natürlich vorkommenden Aminosäure mit der photoreaktiven Gruppe p-Phenylazobenzen versehen war, nämlich mit L-p-(Phenylazo)phenylalanin. Diese nahm in Dunkelheit oder sichtbarem Licht bis zu einer Wellenlänge von rund 420nm ihre trans-Form ein, welche eine geringere Polarität aufweist. Nach Bestrahlung mit UV-Licht von einer Wellenlänge ab 348nm nahm diese photoreaktive Gruppe ihre cis-Form ein, deren Polarität zwar nur geringfügig höher war als jene der trans-Form, aber dennoch ausreichte um die Transitionstemperatur des Peptids um einige Grad zu erhöhen, sodass diese Peptid unterschiedliche Transitionstemperatur zeigte je nachdem, ob es zuvor UV-Licht ausgesetzt worden war oder nicht. Die geringe Anzahl von drei photoreaktiv veränderten Aminosäuren auf je 100 Aminosäuren innerhalb des Peptids war ausreichend um diesen kleinen Polaritätsunterschied zu bewirken, der dennoch großen Einfluss nahm. (Rodríguez-Cabello 2005) Eine weitere Möglichkeit, die Abhängigkeit der Transitionstemperatur von der Polarität des Peptids zu nutzen ist das Einbringen einer Spiro-Verbindung. Eine Spiropyran-Derivat, das an die freie gamma-Carboxylgruppe einer innerhalb der Peptidsequenz vorkommenden Glutaminsäure gekoppelt wurde, zeigt bei Einwirkung von Dunkelheit einen Übergang von der Spiro-Form zu einer Merocyanin-Form, welche positiv geladen und damit polarer ist als die Spiro-Form. Unter dem Einfluss von sichtbarem Licht ist dieser Übergang reversibel, sodass erneut die Spiro-Form erlangt werden kann. UV-Licht hat denselben Effekt auf diese Verbindung wie Dunkelheit, es kommt zur Umlagerung in die

Merocyanin-Form, jedoch in größerem Ausmaß. Auch bei diesem Peptid ist der Unterschied in der Polarität gering, jedoch ausreichend, um die Transitionstemperatur des Peptids deutlich zu verändern. Und auch bei dieser Art der Modifikation reicht bereits eine geringe Anzahl derart veränderter Aminosäuren in der Sequenz des Peptids aus, um diesen Effekt zu erlangen, rein rechnerisch wäre die Anzahl von 2.3 photoreaktiven Gruppen je 100 Aminosäuren ausreichend. (Rodriguez-Cabello 2005)

1.3.3.2.3.3 Ionenstärke

Auch die Ionenstärke der Lösung, in der ein ELP gelöst wurde, hat einen Einfluss auf die zur Transition benötigte Temperatur. Vereinfacht gesagt ist die Ionenstärke ein Maß dafür, wie viele Ionen sich in Lösung befinden und diese nehmen auch Einfluss auf das Verhalten von ELPs. Die Ionenstärke einer Lösung kann beispielsweise durch den Zusatz von NaCl verändert werden und somit auch die Transitionstemperatur eines sich ebenfalls in Lösung befindlichen ELPs verändern. Dabei gilt, dass eine größere Ionenstärke die benötigte Temperatur zur Transition herabsetzt, allerdings ist die Größe dieses Effekts auch von den Eigenschaften des ELPs abhängig, auf das er ausgeübt wird. Ein Peptid, das in seiner Struktur eine hohe Ladungsdichte aufweist, reagiert sensibler auf Veränderungen der Ionenstärke in der Lösung als ein Peptid mit geringerer Ladungsdichte. (Trabacchi-Carlson, et al. 2003)

Eine Modulation der Transitionstemperatur bietet sich beispielsweise dann an, wenn es gilt, ELPs in einem Labor verschiedenen Tests zu unterziehen, bei denen die Messung der zur Faltung benötigten Temperatur nicht von großer Wichtigkeit ist, da eine Verringerung der zur Faltung benötigten Temperatur gleichzeitig bedeutet, dass die Versuchslösung nicht stark aufgeheizt werden muss und somit ein Erwärmungsschritt mitunter ganz entfallen kann, wenn die Transition bereits bei Raumtemperatur erreicht wird.

1.3.3.2.3.4 Lösungsmittel in der Verarbeitung

Da die Produktion der ELPs unter Zuhilfenahme der Gentechnik es ermöglicht, die Primärstruktur des entstehenden Peptids genau zu

kontrollieren, besteht die Möglichkeit, einzelne Blöcke in die Sequenz des Peptids einzubauen. Die einzelnen Blöcke dieser sogenannten Blockpolymere können aufgrund ihrer voneinander abweichenden Aminosäuresequenz identifiziert werden, aber da die Eigenschaften eines Peptids bereits in seiner Primärstruktur festgelegt sind, weisen diese Blöcke mitunter auch sehr unterschiedliche Eigenschaften auf, deren Kombination innerhalb eines Peptids dessen Verhalten stark beeinflusst und es somit für bestimmte Anwendungen qualifiziert. (Wright, et al. 2002)

Dadurch, dass einzelne Blöcke unterschiedliche chemische, biologische und unter anderem auch mechanische Eigenschaften besitzen, bietet sich die Möglichkeit, durch eine gezielte Auswahl des Lösungsmittel während der Verarbeitung des isolierten Peptids die Eigenschaften der durch das self-assembly entstehenden Strukturen noch weiter zu modulieren. Ein Beispiel hierfür wären zahlreiche Versuche mit Triblockpolymeren, deren vereinfachte Struktur die Bezeichnung BAB-Triblockpolymere für sie geprägt hat. Jeder der erwähnten Blöcke besteht aus dem für ELPs grundlegenden Pentapeptid $(VPGXG)_n$, jedoch wurden Substitutionen der Aminosäure an vierter Stelle vorgenommen, um die Polarität des Blockes zu verändern, wobei die außenliegenden B-Blöcke hydrophobere Eigenschaften aufweisen als die mittleren A-Blöcke. Wie zuvor erwähnt, moduliert die Polarität der Aminosäure an vierter Stelle des Pentapeptids die Transitionstemperatur des gesamten Peptids, und je höher die Polarität, desto höher ist auch die zur Phasentrennung benötigte Temperatur. Bei einem BAB-Triblockpolymer ist die Transitionstemperatur des A-Blocks demnach höher als die eines B-Blocks aufgrund der höheren Polarität. Dies bewirkt, dass bei einer Temperatur, die für den hydrophoberen B-Block bereits zur Transition ausreicht, der hydrophilere A-Block noch nicht der Faltung unterworfen war und demnach, aufgrund seiner geringeren Ordnung innerhalb seiner Struktur, größere Flexibilität aufweist. (Nagapudi et al., 2005b)

Zur Weiterverarbeitung nach der Extraktion wurde bei diesen Peptiden das Verfahren des Elektrospinning gewählt, das auch in der Textilindustrie verbreitet ist, um damit Fasern zu produzieren. Als Lösungsmittel wurde in einem Fall Wasser verwendet, in

einem anderen Trifluorethanol. Diese beiden Lösungsmittel weisen einen Unterschied in ihrem Lösungsverhalten auf, da in Wasser hydrophile Komponenten weit besser gelöst werden können als hydrophobe, in TFE hingegen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Substanzen vergleichsweise gleich gut löslich sind. Demnach wurde erwartet, dass die untersuchten BAB-Triblockpolymere in beiden Lösungsmitteln gelöst werden können, in Wasser jedoch der hydrophile A-Block besser löslich ist als der B-Block, in TFE hingegen beide Blöcke gut löslich sind. Bei der Untersuchung der Zugfestigkeit der durch das Elektrospinning erhaltenen Fasern zeigte sich, dass die aus wässriger Lösung produzierten Fasern größere Elastizität aufwiesen und damit größere Dehnung ertrugen als die Fasern, welche aus TFE gewonnen worden waren. In der Sequenz des A-Blocks befand sich auch die Aminosäure Glutaminsäure, da diese nicht nur geeignet war, die Polarität des Blocks zu erhöhen, sondern auch noch eine weitere Möglichkeit zur Modifikation bietet. Die Carboxyl-Gruppe der Glutaminsäure kann abhängig von dem in der Lösung vorherrschenden pH-Wert deprotoniert werden und dadurch ergibt sich eine Abstoßung der negativ geladenen Carboxyl-Reste. BAB-Triblockpolymere, die aus 0,1 M NaOH durch Elektrospinning gewonnen wurden, wiesen sogar noch höhere Zugfestigkeit auf als solche Fasern, die aus wässriger Lösung heraus produziert worden waren, da die Abstoßung innerhalb des Peptids den Zusammenhalt der Strukturen innerhalb des A-Blocks verringerte und die Elastizität der Fasern erhöhte, sodass sie auf bis zu 1300% ihrer ursprünglichen Länge gedehnt werden konnte, bevor sie unter der angewandten Kraft rissen.

Diese Erkenntnisse über Modulationen durch Faktoren während der Weiterverarbeitung bieten eine gute Grundlage, um die Eigenschaften des erhaltenen Peptids durch einfach zu bewerkstellende Änderungen in der Prozesstechnik genau auf das gewünschte Eigenschaftsprofil des Produkts abzustimmen.

1.3.3.2.3.5 Spezifische Aminosäuresequenzen

Die grundlegenden Eigenschaften eines Peptids sind in der Primärstruktur des Peptids bereits vorgegeben, jedoch können auch in die Aminosäuresequenz noch spezifische, biologisch aktive Gruppen von Aminosäuren eingebracht werden. Diese können die Eigenschaften des Peptids verändern oder auch die Reaktion von Zellen auf das Biomaterial beeinflussen, allerdings muss das Einbringen solcher kurzer, biologisch aktiver Aminosäuresequenzen mit Bedacht vorgenommen werden, da eine Veränderung in der Primärstruktur auch die Eigenschaften des gesamten Peptids verändern kann und womöglich zum Verlust einiger wichtiger Funktionen führt, wie etwa der Fähigkeit zum self-assembly. Wenn die zusätzlichen Aminosäuren jedoch in einer Art und Weise in die Primärstruktur integriert wurden, welche die gewünschten Eigenschaften des Peptids nicht stört, oder die kurzen Aminosäuresequenzen anstatt in die Primärstruktur eingebracht zu werden an eine der Seitenketten gekoppelt wurden, so behält das Peptid jene Eigenschaften, die durch die Abfolge der Aminosäuren vorgegeben wird, die es aufbauen, und darüber hinaus können die biologisch aktiven, zusätzlichen Proteine ihre Wirkung entfalten.

Ein Beispiel für eine solche biologisch aktive Abfolge von Aminosäuren ist die Sequenz RGD. Diese Abfolge findet sich in Matrixproteinen wie Laminin, Collagen oder auch Vitronectin und wird von Integrinen erkannt, wie sie auch in Fibroblasten oder Osteoblasten vorkommen. (El-Amin et al., 2003) Demnach kann eine Integration der Sequenz RGD die Zellantwort auf ein in den Körper eingebrachtes Biomaterial dahingehend beeinflussen, dass bevorzugt solche Zellen an dieses Material binden können, welche diese Sequenz erkennen und zur Adhäsion nutzen, sodass die Besiedelung des Materials schneller und mit größerem Erfolg vonstattengeht. (Swierczewska et al., 2008), (Ratner und Bryant 2004)

Eine andere Möglichkeit das Verhalten eines ELPs durch das Einbringen einer biologisch aktiven Aminosäuresequenz zu modulieren besteht darin, in das Peptid eine Abfolge von Aminosäuren einzubringen, die von Kinasen erkannt wird und von diesen auch phosphoryliert werden kann. In

ähnlicher Weise wie pH-sensible Gruppen das Verhalten des Peptids in Abhängigkeit von dem pH-Wert der Umgebung modulieren können, so wäre dies auch durch eine Phosphorylierung durch Kinasen erreichbar. Urry et al konnten zeigen, dass die Elastizität eines Peptids, welches Glutaminsäure enthielt, in Abhängigkeit von dem pH-Wert der es umgebenden Lösung stark beeinflusst wurde. (Urry, et al. 1988) Je nach pH-Wert der Lösung und damit dem Zustand der Carboxyl-Gruppe der Glutaminsäure, also ob diese funktionelle Gruppe der Seitenkette protoniert war oder deprotoniert, verfügte das Peptid über eine stark veränderte Elastizität und demzufolge auch Zugfestigkeit. Dieser Effekt, der bei einem ELP erzielt werden kann, welches Glutaminsäure in seiner Aminosäuresequenz beinhaltet, wäre auch durch eine Phosphorylierung denkbar an Stellen, die von Kinasen erkannt werden können, wenngleich diese Möglichkeit der Modifikation erst noch eingehender erforscht werden muss. (Urry, et al. 1988)

ELPs orientieren sich in ihrer Primärstruktur an dem natürlich vorkommenden Protein Elastin. Dieses kann durch das Enzym Elastase abgebaut werden, ELPs hingegen üblicherweise nicht. Jedoch ist es möglich durch gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz des gewünschten Peptids Stellen einzubauen, welche von Elastase erkannt und demnach auch zertrennt werden können. Der Einsatz solcher Sequenzen, wie auch die Abfolge der Aminosäuren VGVAPG (Valin-Glycin-Valin-Alanin-Prolin-Glycin) eine ist, bietet einen großen Vorteil für den Einsatz der ELPs als Biomaterialien bei Anwendungen innerhalb des Körpers, da sie damit durch das natürlich im Körper vorkommenden Enzym Elastase abgebaut werden können, jedoch nur dann, wenn der Körper Elastase freisetzt, was üblicherweise nur dann geschieht, wenn ein Umbau der ECM nötig ist. (Girotti et al., 2004) Wenn also durch das Einfügen Elastase-empfindlicher Abschnitte ein biodegradables Peptid erhalten wurde, so liegt die Annahme nahe, dass dieses erst dann abgebaut wird, wenn die ECM, die es als Biomaterial in vielen Anwendungen ersetzen soll, zerstört und danach neu aufgebaut werden soll, es also erst dann abgebaut wird, wenn bereits vom Körper

produzierte ECM wieder vorliegt und das Peptid nicht mehr vonnöten ist. Hinzu kommt noch der vorteilhafte Umstand, dass die Bruchstücke Elastase-empfindlicher Sequenzen eine biologische Aktivität aufweisen, welche Zellwachstum und Heilung fördern können, jedoch muss diese Theorie erst noch bewiesen werden. (Rodriguez-Cabello 2005)

Die Möglichkeiten zur Modulation der Eigenschaften von ELPs sind vielfältig und noch lange nicht vollständig ausgeschöpft oder gar erforscht, da auch das Molekulargewicht, die Konzentration an ELP in der zu verarbeitenden Lösung und das Einbringen von Wirkstoffen, wenn die ELPs zum „drug delivery“ eingesetzt werden sollen, mitunter starken Einfluss auch das Verhalten der Peptide nehmen können. Hinzu kommt noch, dass nicht nur die Eigenschaften der ELPs Einfluss auf ihre Verarbeitbarkeit und ihr Verhalten nehmen, sondern auch die Prozesstechnik das endgültige Resultat stark verändern kann, wie etwa die gewählte Methode der Verarbeitung, genaue Temperatur währenddessen oder der gezielte Einsatz bestimmter Lösungsmittel dabei. Jeder einzelne der bisher kurz vorgestellten Aspekte kann Einfluss auf das Verhalten eines Peptids nehmen, darüber hinaus ist es allerdings auch möglich, die Auswirkung einzelner Modifikationen miteinander zu kombinieren und damit die Eigenschaften des erhaltenen Peptids bis ins Detail fein auf das gewünschte Eigenschaftsprofil abzustimmen, das für die angedachte Anwendung vorteilhaft wäre. Dies macht die Produktion und Verarbeitung der ELPs sehr komplex, eröffnet aber auch gleichzeitig die Möglichkeit, nahezu jeden Aspekt ihres Verhaltens exakt zu bestimmen und es auf diese Weise auf die Anwendung abzustimmen, bei der es zum Einsatz kommen soll.

1.3.3.2.4 Biokompatibilität von ELPs

Die Vermutung ist naheliegend, dass ELPs eine ausgezeichnete Biokompatibilität aufweisen und diese wurde auch in vielen Experimenten bereits bestätigt. ELPs bestehen zur Gänze aus Aminosäuren, wobei auch die Möglichkeit besteht, nicht im humanen Zellapparat vorkommende Aminosäuren zu verwenden, da eine Proteinsynthese, wie sie zur

Produktion von ELPs meist durchgeführt wird, auch den Einbau nicht natürlicher oder mit zusätzlichen Gruppen wie zum Beispiel mit Chromophoren konjugierten Aminosäuren gestattet. Nicht jedes ELP ist leicht abbaubar, aber diejenigen, welche durch Enzyme abgebaut werden können, stellen für den Körper bei der Exkretion kein Hindernis dar, da sie meist lediglich aus Aminosäuren bestehen, die leicht ausgeschieden werden können, da der Körper stets mit Aminosäuren konfrontiert ist. (Rodríguez-Cabello, et al. 2009) Es ist durchaus möglich, dass ELPs zusätzlich zu der Struktur, die sich durch ihre hydrophobe Faltung ergibt, noch mit chemischen „crosslinks“ gefestigt werden, aber abhängig von der Wahl des „crosslinkers“ können auch diese Vertreter abgebaut werden. (Meyer et al., 2001) Jedoch sind bisher auch keine Komplikationen bekannt, wenn ein ELP innerhalb des Körpers verbleiben sollte, da es nach Einbringen eines ELPs in vivo zu keiner heftigen Entzündungsreaktion kommt. Bisher war es nicht möglich, monoklonale Antikörper gegen ELPs zu finden, da das Immunsystem diese Polypeptide einfach nicht erkennt und es somit zu keiner Abwehrreaktion gegen sie kommt. (Herrero-Vanrell, et al. 2005)

Diese herausragende Biokompatibilität und die fehlende Immunreaktion, sowie die Vielzahl an Möglichkeiten, ELPs genau nach dem erwünschten Eigenschaften zu gestalten, machen sie zu einem Kandidaten im Feld des „drug delivery“, der großes Potential hat, in Zukunft dort in vielerlei Weise eingesetzt zu werden.

1.3.3.2.5 Mechanische Eigenschaften von ELPs

ELPs sind in Temperaturbereichen, die unterhalb ihrer Transitionstemperatur liegen, in Wasser vollständig löslich, bilden oberhalb dieser Temperatur jedoch eine abgetrennte Phase, die durch hydrophobe Faltung entsteht. Die mechanischen Eigenschaften dieses Hydrogels, wie auch andere Aspekte seines Eigenschaftsprofils, ergeben sich durch die Primärstruktur des Peptids, also aus der Abfolge an Aminosäuren, die das Peptid aufbauen. Dieses Peptid kann aus mehreren Blöcken aufgebaut sein, deren Eigenschaften sich mitunter stark unterschieden können wie zum Beispiel in ihrer Transitionstemperatur, die

sowohl durch die Polarität als auch durch das Molekulargewicht und die Konzentration an ELP in der Lösung beeinflusst wird. (Meyer und Chilkoti 2004) Es ist bereits gelungen ein Triblockpolymer zu synthetisieren, dessen Blöcke durch eine Variation des zugrundeliegenden Pentapeptids VPGVG sich deutlich voneinander unterscheidende Transitionstemperaturen aufwiesen und somit drei abgegrenzte Blöcke entstanden, welche man mit der generellen Struktur BAB beschreiben kann, da die mit B bezeichneten Blöcke gleich waren, der Block A hingegen eine deutlich höhere Polarität aufwies und demzufolge auch eine höhere Transitionstemperatur. Die vorgenommenen Variationen bestanden aus einer Veränderung der vierten Stelle des Pentapeptids, wodurch die Polarität der einzelnen Blöcke bestimmt wurde, und zusätzlich noch eine Substitution an der dritten Stelle, in deren Rahmen die innerhalb der natürlichen Struktur vorkommende Aminosäure Glycin durch Alanin ersetzt wurde. Durch diese Veränderung wandelte sich das mechanische Verhalten von ELPs, das durch die strukturelle Ähnlichkeit zu dem Vorbild Elastin bedingt ist, von elastisch zu plastisch. (Nagapudi, et al. 2005a), (Nagapudi, et al. 2005b) Bei Lösung dieses Peptids in Wasser war die Struktur in ihrer Gesamtheit löslich, jedoch ergab sich durch den Unterschied in der Transitionstemperatur der Blöcke A und B auch ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Blöcke. Während die hydrophoberen Blöcke B bereits der Faltung unterworfen waren, blieb der mittlere, hydrophilere Block A noch in Lösung, wodurch seine Elastizität in Verbindung mit seinem elastischen, durch seine Aminosäuresequenz vorgegebenen Verhalten, noch weiter verstärkt wurde. Dadurch wurde es möglich, aus Peptidfilmen ausgeschnittene Streifen dieses Triblockpolymers auf bis zu 1000% ihrer ursprünglichen Länge zu dehnen, bevor diese unter dem ausgeübten Zug rissen. (Nagapudi, et al. 2005a) Urry et al zeigten auch eine andere Möglichkeit, durch eine einfache Änderung der Primärstruktur das mechanische Verhalten eines Peptids zu verändern. In diesem Experiment wurde die grundlegende Pentapeptidsequenz VPGVG dahingehend verändert, dass bei einem von fünf aufeinander folgenden Blöcken innerhalb der Aminosäuresequenz die

vierte Stelle des Peptids, ursprünglich Valin, durch Glutaminsäure ersetzt wurde. Dadurch ergab sich eine erhöhte Polarität des Peptids, die jedoch durch eine Veränderung des pH-Wertes der Lösung moduliert werden kann. Bei einem pH-Wert, bei dem die Glu-Seitenketten protoniert und damit eher hydrophob sind, ist das Peptidpolymer elastisch, wenn die Seitenketten jedoch ionisiert wurden und damit die Polarität im Molekül steigt, so erhöht sich auch die zur Transition benötigte Temperatur und das elastische Verhalten geht verloren. Bei pH-Änderung kommt es zu einer vollständig reversiblen Kontraktion dieses Peptids, die über ausreichend Stärke verfügt, um damit Arbeit zu verrichten, genauer gesagt kann ein Gewicht angehoben werden, das bis zu dem Tausendfachen dessen wiegen kann, was das verwendete ELP in trockenem Zustand wiegt. (Urry, et al. 1988)

Zusätzlich zu der Möglichkeit die mechanischen Eigenschaften eines ELPs durch eine Variation in seiner Primärstruktur zu modulieren, kann auch nach der hydrophoben Faltung des Peptids noch eine Veränderung vorgenommen werden. Die durch das self-assembly erlangte Struktur eines Peptids kann durch „crosslinking“ gefestigt werden, das auf verschiedene Arten durch geführt werden kann. Es ist möglich, gefaltete ELPs mithilfe von Gamma-Strahlung quer zu vernetzen, jedoch ist dieser Vorgang dem Zufall unterworfen und bringt unspezifische Verbindungen hervor, deren Bildung keinerlei Kontrolle unterworfen werden kann. Eine spezifischere Methode der Quervernetzung baut darauf auf, dass die Primärstruktur dahingehend verändert wird, dass in einigen Pentapeptiden, welche ein ELP aufbauen, die Aminosäure Lysin eingebracht wird und diese gezielt zur Quervernetzung genutzt wird, sodass spezifische Abschnitte der Sequenz, die intakt bleiben sollen, wie zum Beispiel zelladhäsive oder enzymempfindliche Aminosäureabfolgen, nicht beeinträchtigt werden, was bei eines „crosslinking“ durch Gamma-Strahlung nicht gewährleistet werden kann. (Di Zio und Tirrell 2003) Über die zur Verfügung stehende epsilon-Aminogruppe von Lysin, die bei einer Peptidbindung frei bleibt, ist es möglich, ein chemisches „crosslinking“ vorzunehmen. Diese kann durch den Einsatz von Glutaraldehyd oder auch

Hydroxysuccinimidyl-Ester, sowie durch einige Enzyme erreicht werden. (Girotti, et al. 2004), (Ratner und Bryant 2004). Durch eine stabilisierende Quervernetzung der gefalteten Struktur eines ELPs werden dessen mechanische Eigenschaften verändert, allerdings ist diese Veränderung nicht immer nur auf die mechanischen Aspekte des Verhaltens in Lösung beschränkt. Da die zur Vernetzung verwendete Aminogruppe der Aminosäure Lysin basisch ist, kann eine Reaktion dieser Gruppe mit einem chemischen „crosslinker“ die Polarität des Peptids verändern und damit die Transitionstemperatur. So kann es dazu kommen, dass ein Peptid seine Transitionstemperatur bereits bei niedrigeren Werten erreicht und dies kann wiederum den geplanten Ablauf der Produktion stören, was dann problematisch ist, wenn die Quervernetzung vor einer hydrophoben Faltung stattfinden soll. Abhilfe schafft in diesem Fall eine Veränderung der Temperatur in der Reaktionslösung, wenn die Differenz zwischen den Temperaturen bekannt ist, die mit beziehungsweise ohne „crosslinker“ benötigt werden, oder aber auch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, in denen es zu keiner Transition der ELPs kommt. Ein Vorteil der Verwendung von organischen Lösungsmitteln besteht darin, dass eine Quervernetzung in diesen ein einheitlicheres Netz an Verbindung zustande kommt, jedoch ist die Entsorgung von organischen Lösungsmitteln aufwändiger und teurer als die von wässrigen Lösungen. Die Anzahl an vorhandenen Lysin-Seitenketten innerhalb der Primärstruktur beeinflusst selbstverständlich die Möglichkeit zum „crosslinking“ und eine größere Anzahl zur Verfügung stehender Lysine ermöglicht die Bildung zahlreicher Querverbindungen, die damit die Festigkeit der erhaltenen Hydrogele erhöhen. Allerdings fließen noch weitere Faktoren in die mechanischen Eigenschaften von ELPs ein außer einem chemischen „crosslinking“. Auch das Molekulargewicht beeinflusst die mechanische Stabilität des fertiggestellten ELPs insofern, dass ein höheres Molekulargewicht festere Hydrogele ergibt. Dies ergibt sich dadurch, dass schwerere und damit auch längere Ketten mehr intramolekulare Wechselwirkungen aufweisen und so dichtere Netzwerke ergeben, die dennoch elastisch bleiben. Auch eine hohe Konzentration an

ELP führt zu dichten, elastischen Netzwerken. Generell ermöglicht eine große Anzahl an Möglichkeiten zu intermolekularen Wechselwirkungen, also zwischen verschiedenen Peptiden gleicher oder unterschiedlicher Sequenz, die Bildung von intermolekularen Bindungen, die funktionelle „crosslinks“ darstellen, die also ein Netzwerk zahlreicher Peptide ermöglichen. Bei kurzen Peptidketten oder geringer Konzentration an Peptid in der Reaktionslösung kommt es eher zu intramolekularen Verbindungen, durch die es zu weniger festen Hydrogelen kommt. (Trabbic-Carlson, et al. 2003)

Auch die mechanischen Eigenschaften von ELPs sind in vielerlei Hinsicht modulierbar und können damit auf das erwünschte Eigenschaftsprofil abgestimmt werden, allerdings bleibt noch vieles zu erforschen und zu klären.

1.3.3.3 Mögliche Anwendungen von Peptidpolymeren

Die vielfältigen Eigenschaften der ELPs machen eine Anwendung dieser Stoffklasse auf vielen verschiedenen Gebieten denkbar und auch praktisch, da sie sich durch die Vielzahl an Möglichkeiten, ihre Eigenschaften zu modulieren für viele Aufgaben eignen, die von hochspezialisiert bis hin zu alltäglich reichen können. Vor allem die vergleichsweise einfache, umweltfreundliche und selbst für komplexe ELPs im Vergleich zu einfacheren kaum teurere Produktion zeichnet die Vorteile dieser Materialien aus.

1.3.3.3.1 Anwendungen außerhalb des medizinischen Bereichs

Die Rohstoffe zur Produktion heutiger Kunststoffe stammen aus der Erdölindustrie, doch die Reserven sind erschöpflich und werden nicht auf Dauer als Rohstoff zur Verfügung stehen, wenngleich nur ein geringer Prozentsatz des gewonnenen Erdöls für die Produktion von Kunststoffen verwendet wird. Für die Herstellung von ELPs sind keine Rohstoffe auf Erdölbasis vonnöten, weder als Ausgangsprodukt noch als Lösungsmittel, was auf lange Sicht einen großen Vorteil darstellt, da erneuerbare und umweltfreundliche Rohstoffe eingesetzt werden können. Eine Anwendung von ELPs oder anderen Polypeptiden, die nach einem Vorbild aus der

Natur gentechnisch nachgebaut oder verändert wurden, als Ersatz für heutzutage tagtäglich verwendete Kunststoffe auf Erdölbasis ist denkbar und auch sinnvoll, da Peptidpolymere durch recht einfache Modulationen genau auf die gewünschten Eigenschaften abgestimmt werden können und dabei aus erneuerbaren Rohstoffen hergestellt werden können mit umweltfreundlichem Energieverbrauch und Abfall, der leichter und unschädlicher zu entsorgen ist als jener aus der Rohölindustrie. Jedoch ist dies zurzeit für noch nicht machbar, da die Produktionskosten für Materialien des täglichen Gebrauchs einfach noch zu hoch sind. Zwar ist die Produktion mittels Gentechnik und Fermentation eher billig im Vergleich zu anderen Methoden um medizinisch verwendbare Polymere herzustellen, jedoch sind sie teurer als die Produktionsverfahren für alltägliche Kunststoffe. Allerdings wird mit Hochdruck daran gearbeitet, die Kosten zu senken und Peptidpolymere somit als Alternative und letztendlich Ersatz für herkömmliche Kunststoffe auf Erdölbasis zu etablieren. Abgesehen von der umweltfreundlichen Art der Produktion ist ein weiterer Vorteil von Peptidpolymeren, die Beispielen aus der Natur nachempfunden wurden, ihre den herkömmlichen Kunststoffen oft deutlich überlegenen Eigenschaften. Als Beispiel sei hier Spinnenseide genannt, die es vermag, Insekten im Flug abzufangen, ohne dabei zu zerreißen, obwohl das Spinnennetz dabei die gesamte kinetische Energie des Fluges abfangen muss. Diese Fähigkeit beruht nicht nur auf der besonderen Architektur eines Spinnennetzes, sondern auch auf den mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide, die weitaus stärker ist als Kevlarfasern, die in schusssicheren Westen verwendet werden. Somit wäre eine Anwendung von gentechnisch erzeugter Spinnenseide in diesem Sektor gut denkbar, da dies ein stärkeres Material hervorbringen würde, dabei aber gleichzeitig die Produktion umweltfreundlicher gestalten und auf Dauer sichern würde, da die Herstellung von Spinnenseide keine Rohstoffe auf Erdölbasis benötigt.

Ein weiteres Beispiel für die herausragenden Fähigkeiten natürlicher Proteine wären die Adhäsiv-Proteine von Muscheln, wie etwa von Miesmuscheln. Die genau Struktur dieser Proteine ist noch nicht geklärt,

wäre allerdings sehr attraktiv als neuartiger Kleber, da dieses Protein es vermag, die Muscheln im Salzwasser des Meeres selbst bei starkem Wellengang sicher an ihren Plätzen zu halten. Einer derartigen Belastung kann kein bisher synthetisch hergestelltes Klebematerial auch nur annähernd standhalten, weshalb eine Nutzbarmachung dieser Adhäsiv-Proteine von großem Vorteil wäre. (Rodriguez-Cabello 2005)

1.3.3.3.2 Anwendungen im medizinischen Bereich

Die variablen Eigenschaften und die gute Biokompatibilität von ELPs im Besonderen machen sie auch zu vielversprechenden Kandidaten in medizinischen Anwendungen.

Bereits in den Neunzigerjahren wurde die Möglichkeit genutzt, kurze Abschnitte von Aminosäuren, die von Zellen erkannt werden, in ELPs einzufügen, um damit Petrischalen und Kulturflaschen zu beschichten, um auf diese Weise die Adhäsion von Zellen zu fördern. Diese Anwendung weist auch darauf hin, dass ELPs in dem immer mehr an Bedeutung gewinnenden Feld des „tissue engineering“ von großem Nutzen sein können, da eine sichere Verankerung von implantierten Zellen auf einem Gerüst aus ELPs das Überleben und die Funktionalität dieser Zellen positiv beeinflussen und damit auch den Nutzen und die Wirksamkeit eines mit Zellen behafteten Implantats fördern dürfte. (Ghandehari und Cappello 1998)

Eine weitere vielversprechende Anwendung von ELPs eröffnet sich in dem Gebiet von „drug delivery“ und „drug targeting“. Durch die Produktion von ELPs über Gentechnik und Fermentation ergibt sich große Kontrolle über die Struktur und damit die Eigenschaften des resultierenden Peptids, wodurch sich mit ausreichendem Verständnis der Vorgänge bei der hydrophoben Faltung dieser Peptide ihr Verhalten vorhersagen lässt. Blockpolymere können bei Erreichen ihrer Transitionstemperatur und bei ihrer Faltung Mizellen bilden, deren Größenverteilung sehr eng und innerhalb der erhaltenen Vesikel recht einheitlich ist. (Wright, et al. 2002) Durch verschiedene Faktoren wie etwa Temperatur oder Primärstruktur lässt sich die genaue Größe der Mizellen noch variieren, wobei sich, wie die Ergebnisse der Forschungsgruppe um Chilkoti gezeigt haben, bei Erreichen der Transitionstemperatur zunächst Mizellen von rund 40 nm Durchmesser bilden, die sich bei weiterer Erhöhung der Temperatur zu größeren Aggregaten zusammenlagern. (Chilkoti et al., 2002) Der genaue Mechanismus dieser Aggregation ist noch nicht bekannt, gibt jedoch schon wichtige Erkenntnisse über das Verhalten von Mizellen aus ELPs preis. (Chilkoti, et al. 2002) Der Grund dafür, dass sich die Stoffklasse

ELPs so sehr für eine Anwendung im Zuge des „drug delivery“ und „drug targeting“ eignen, liegt darin, dass die Eigenschaften der Peptide genau auf das zugeschnitten werden können, was für ihren Einsatz benötigt wird. Es ist bereits gelungen, in Mizellen aus ELP-Blockpolymeren, deren Hülle aus den hydrophilen Abschnitten ihrer Sequenz bestand und der Kern aus den hydrophoben Abschnitten, schwer wasserlösliche Wirkstoffe einzuhüllen und damit deren Löslichkeit in Plasma zu erreichen. Dies beruht darauf, dass ein ELP nach seiner hydrophoben Faltung zwar anhaftende Wassermoleküle verdrängt und die Abschnitte, die zuvor durch hydrophobe Hydratisierung von Wasser umgeben waren, zusammenlagern, jedoch nicht das gesamte Wasser verdrängt werden kann. Nach der Faltung resultieren etwa 37% der Masse eines ELPs immer noch von Wasser, das in eine erhaltene Mizelle eingeschlossen wurde und genau diese Wassermoleküle können verwendet werden, um darin Wirkstoffe einzubringen und durch eine Faltung der Peptide innerhalb der Wirkstoff-Lösung diese in die erhaltenen Mizellen einzuschließen. Ein anderer Ansatz besteht darin, durch eine Veränderung der Primärstruktur ein geladenes Peptid zu erhalten und anschließend einen Wirkstoff mit entgegengesetzter Nettoladung durch elektrostatische Wechselwirkung an das Peptid zu binden. (Herrero-Vanrell, et al. 2005) Ferner besteht auch die Möglichkeit, Konjugate zu bilden. Hierfür kann ein in die Primärstruktur eingebrachtes Lysin genutzt werden, um an dessen Seitenkette nach Bildung der Peptidsequenz eine chemische Modifikation vorzunehmen und einen Wirkstoff kovalent an das Peptid zu binden. (Dreher et al., 2003)

Ein bedeutender Vorteil von ELPs als Carrier-Moleküle für Wirkstoffe besteht darin, dass für die Bildung von Vesikeln keine hohen Temperaturen vonnöten sind, sondern lediglich die Transitionstemperatur erreicht werden muss, die in den meisten Fällen nahe der Körpertemperatur eines Menschen liegt. Dies hat zur Folge, dass temperaturempfindliche Wirkstoffe ebenfalls verarbeitet werden können, da keine ausreichend hohe Temperatur erreicht wird, um diesen Schaden zuzufügen. Darüber hinaus kann die Transitionstemperatur eines ELPs

durch eine Veränderung der Primärstruktur oder der Prozessbedingungen noch moduliert werden und dem angepasst werden, was dem Wirkstoff maximal zumutbar ist. (Urry, et al. 1988) Ein weiterer Vorteil der ELPs besteht darin, dass viele in ihrer Transition eine Hysteresis zeigen. Dies bedeutet, dass sie bei einer scharf abgegrenzten Transitionstemperatur, die sich je nach genauer Modifikation des Peptids meist nur über 2-3°C erstreckt, hydrophob gefaltet werden und dadurch in Wasser unlöslich werden, beim Abkühlen unterhalb ihrer Transitionstemperatur jedoch eine gewisse Verzögerung zeigen. Bei der Reversion der Faltung ist der Temperaturbereich weiter gefasst, was bedeutet, dass ELPs, die bei beispielsweise 30°C hydrophob gefaltet werden, nach Abkühlen auf Raumtemperatur dennoch stabil bleiben, da eine tiefere Temperatur nötig sein kann, die in etwa bei 8-10°C liegt, um sie wieder vollständig zu lösen. Dieses Hysteresis-Verhalten variiert abhängig von den genauen Eigenschaften des Peptids, kann jedoch als Vorteil genutzt werden, da nach Faltung der ELPs keine nachträgliche Stabilisierung mehr vonnöten ist, da ein einfaches Unterschreiten der Transitionstemperatur zur Auflösung der ELPs mitunter nicht ausreichend ist, sondern eine wirkliche Kühlung erforderlich ist, um die Faltung vollständig umzukehren. (Trabbi-Carlson, et al. 2003), (Herrero-Vanrell, et al. 2005), (Bessa, et al. 2010)

Jedoch bleibt zu beachten, dass durch Einbringen eines Wirkstoffes das Verhalten eines ELPs mitunter drastisch verändert werden kann, wie dies beispielsweise bei einer Konjugation eines ELPs mit DOX der Fall ist. Eine derartige kovalente Verbindung verringert die Transitionstemperatur des nunmehr konjugierten Peptids um bis zu 8°C. Allerdings ist es durch die Vielseitigkeit der ELPs möglich, diese Veränderung durch gezielte Modulationen der Eigenschaften bei dem Entwurf der Primärstruktur wieder auszugleichen und somit dennoch ein Peptid zu erhalten, dessen hydrophobe Faltung bei einer zuvor festgelegten Temperatur stattfindet. Bei einer weiter verbreiteten Anwendung von ELP-Wirkstoff-Konjugaten, wie sie aufgrund der Eignung dieser Stoffklasse für „drug delivery“ durchaus denkbar ist, ist es nötig mehr Wissen und Erfahrung über Auswirkung von bestimmten Wirkstoffen auf das Verhalten der ELPs zu

sammeln, jedoch ist es mit diesem Wissen durch eine Modulation von Primärstruktur oder Prozessbedingungen zu bewerkstelligen, dennoch ein Peptid zu fertigen, das dem gewünschten Eigenschaftsprofil entspricht. (Dreher, et al. 2003)

In Versuchen mit Mäusen ist es auch bereits gelungen, einen Fluoreszenzfarbstoff als Mustersubstanz als Konjugat an einen zuvor eingesetzten humanen Tumor zu bringen. Zwar bleibt noch vieles zu erforschen und sowohl die Wirksamkeit als auch Toxizität dieser möglichen Anwendung muss noch genauer untersucht werden, bevor ein Einbringen dieser Herangehensweise in der Klinik etabliert werden kann, aber die bisher durchgeführten Experimente zeigen auf beeindruckende Art und Weise, wie die besonderen Eigenschaften der ELPs nutzbar gemacht werden können. ELPs sind unterhalb ihrer Transitionstemperatur wasserlöslich und falten und aggregieren erst oberhalb dieser Temperatur, was zur Folge hat, dass sie aus wässriger Lösung ausfallen. Dieses Verhalten wurde ausgenutzt, indem ELPs synthetisiert wurden, deren Transitionstemperatur bei rund 42°C liegt, sodass sie bei Körpertemperatur löslich blieben und innerhalb der Blutbahn transportiert werden konnten, jedoch bei einer lokalen, spezifisch im Tumorgewebe induzierten Hyperthermie unlöslich wurden und dadurch gezielt im Tumor kumulierten. Dabei zeigte sich, dass sich durch die Anreicherung der ELPs in dem aufgeheizten Gewebe mit der Zeit größere Aggregate bildeten aus den zu Anfang kleinen Partikeln aus ELPs, die an der Gefäßwand hafteten. Einige wenige dieser Aggregate wurden durch den Blutstrom wieder fortgerissen, jedoch sollte dies, den Überlegungen zufolge, kein Problem in Bezug auf systemische Toxizität darstellen, da ein ELP-Partikel, das den beheizten Bereich verlässt und somit wieder unter seine Transitionstemperatur abkühlt, durch die reversible Faltung erneut löslich wird und sich somit nur in Geweben anreichern kann, deren Temperatur ausreichend hoch ist für eine Transition der eingesetzten ELPs. (Meyer, et al. 2001) In diesem Experiment beruht die Kumulation der ELPs auf einer Kombination zweier passiver Ansätze zum targeting von Tumorgewebe. Zum einen dem sogenannten „enhanced permeability

and retention“-Effekt (EPR-Effekt), der darauf beruht, dass die Blutgefäße von Tumoren vergleichsweise löchrig sind und dadurch mehr Durchtritt durch die Gefäßwand möglich ist und gleichzeitig keine Lymphgefäße vorhanden sind, die unerwünschte Stoffe abtransportieren würden, sowie auf den Auswirkungen der Hyperthermie, durch die ebenfalls die Permeabilität der Gefäße erhöht und gleichzeitig die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Toxinen, wie sie Wirkstoffe in der Krebstherapie sind, gesteigert wird. Durch die Möglichkeit, ELPs mit bioaktiven Abschnitten von Aminosäuren zu versehen, die zur Erkennung spezifischer Zellen genutzt werden können und somit auch einen auf Affinität beruhenden Ansatz zur Bekämpfung von Tumoren zu nutzen, bietet sich die Gelegenheit, die Spezifität solcher als Carrier eingesetzter ELP-Partikel deutlich zu erhöhen, und durch Erkennungssequenzen oder Antikörper ein targeting spezifischer, den angesteuerten Marker exprimierender Zellen zu erreichen. (Chilkoti, et al. 2002)

Aufgrund ihrer Elastizität und der guten Biokompatibilität der ELPs wurden auch Versuche unternommen, sie als Materialien zum Ersatz geschädigter Blutgefäße zu nutzen. Bei einer Bypass-Operation beispielsweise wird ein nicht mehr funktionstüchtiges Gefäß umgangen, indem an anderer Stelle ein Blutgefäß extrahiert und anschließend neben einem verengten Gefäß wieder eingesetzt wird, wodurch der Blutfluss bevorzugt durch das neuimplantierte, nicht verengte Gefäß fließt und somit das bereits geschädigte Blutgefäß entlastet wird. Jedoch bedeutet ein solches Vorgehen stets eine weitere Operationswunde neben der eigentlichen Bypass-Operation und die Möglichkeiten zu autologem Ersatz sind begrenzt. Bisher war es nur möglich, künstliche Ersatzvenen aus dem synthetischen Material Polyethylenterephthalat herzustellen, jedoch verstopften diese bald nach Implantation, wenn ihr Durchmesser nicht mindestens 6 mm betrug. ELPs erscheinen als attraktive Alternative zu synthetischen Ersatzmaterialien, da sie ausgezeichnet verträglich sind, große und gleichzeitig veränderbare Elastizität aufweisen, ein chemisches „crosslinking“ für größere Stabilität möglich ist sowie auch der gezielte Einsatz von Erkennungssequenzen, welche die Adhäsion von Zellen

fördern und kontrollieren. Zwar sind die Experimente auf diesem Gebiet noch nicht weit gediehen, es ist allerdings erwiesen, dass ELPs bei einer Produktion unter bestimmten Prozessbedingungen einen Elastizitätsmodulus aufweisen, der jenem von natürlichem Elastin ebenbürtig ist. Was ihre mechanischen Eigenschaften angeht, eignen sie sich somit zum Ersatz von Venen mit geringem Durchmesser, jedoch bleibt noch zu erforschen, wie sich ein dauerhafter Verbleib und der Blutfluss auf die Stabilität des Materials auswirken und wie sich Zellen diesem und ähnlichem Material gegenüber verhalten, wenn Erkennungssequenzen wie beispielsweise REDV (Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin) aus Fibronectin vorhanden sind. (Di Zio und Tirrell 2003)

Die vielfältigen Möglichkeiten, die Eigenschaften dieser Peptidpolymere zu modulieren und auf die benötigten Bedingungen abzustimmen, eröffnen die Möglichkeit, sie auf vielerlei Gebieten einzusetzen und ihre Eignung als artifizielle ECM macht sie auch auf dem Gebiet der Knochenbiologie interessant. Gerade die möglichen Modulationen was die mechanischen Eigenschaften der ELPs betrifft sowie das Einfügen von Erkennungssequenzen, wie der von Osteoblasten erkannten Aminosäureabfolge RGD, bieten die Aussicht, diese vielseitigen Materialien auch für eine bessere Heilung von Knochenbrüchen einsetzen zu können, wenngleich noch vieles zu klären bleibt, bevor ein erfolgreicher Einsatz möglich sein wird.

1.4 Ziele der Diplomarbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das Verhalten von Knochenzellen unter Einfluss eines ELP zu untersuchen, welches dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe um Rodríguez-Cabello zur Verfügung gestellt wurde. Da, unseres Wissens nach, diese junge Stoffklasse noch nicht in Verbindung mit Knochenzellen getestet wurde, bestand eines der vorrangigen Ziele daraus zu zeigen, ob diese Zellen das Material annehmen würden. Hierzu wurde die Morphologie der Zellen auf Beschichtungen des ELPs bei einer feststehenden Konzentration betrachtet im Vergleich zu Zellen, die auf unbeschichteten Deckgläsern oder Knochenplättchen kultiviert worden waren. Ebenso wurde ein viability-assay mittels MTS-Test durchgeführt, wobei ELPs in verschiedenen Konzentrationen untersucht wurden um die Auswirkung von unterschiedlichen Gehalten an ELP innerhalb des Kulturmediums auf Zellzahl und Überlebenschance zu untersuchen. Das für die Experimente dieser Arbeit verwendete Proteinpolymer besitzt folgende Primärstruktur:

MESLLP-[(VPGVG)₂VPGEG(VPGVG)₂]₁₀-(VGIPG)₆₀]₂-[(VPGIG)₁₀-AVTGRGDSPASS-(VPGIG)₁₀]₂-V

Damit ergibt sich ein Molekulargewicht von 112292 Dalton.

Innerhalb dieser Sequenz befindet sich auch die von Osteoblasten erkannte Aminosäuresequenz RGD, sodass es auch Ziel war, die Auswirkung dieser Erkennungssequenz auf Wachstum und Morphologie der Knochenzellen zu prüfen.

Diese Experimente wurden durchgeführt, um die Eignung von ELPs zur Anwendung in Verbindung mit Knochenzellen zu zeigen, welche, in weiterer Folge, sowohl innerhalb der Zellkultur liegen könnten, allerdings auch in medizinische Anwendungen Einzug finden könnten, wenn einige bisher offene und neu aufgeworfene Fragen in weiteren Versuchen geklärt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Liste verwendeter Geräte

Analysenwaage	Sartorius
ELISA-Reader	Labsystems Multiskan MS
Eppendorf-Gefäße	Firma Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop (Bildanalyse)	Olympus BX 51
Inkubatoren	Firma Kendro HERA cell 240
Inkubierschrank	Heraeus instruments BFL 3032
Kamera	Olympus XM10
Knochensäge Isomet	Firma Buehler ISomet low speed saw
Kulturplatten (12-well)	Firma Greiner
Kulturplatten (96-well)	Firma Iwaki
Lichtmikroskop (Labor)	Nikon TMS
Magnetrührer	Ikamag RCT
Mikropipetten	Labsystems
Petrischalen	Sterilin
pH-Meter	Firma Inula Metrohm 713 pH Meter
Pipetboy	Integra Biosciences
Sägeblatt	Firma Buehler Diamond wafering blade/series 15
Sterile Kunststoffpipette	Costar
Sterile Pipetten	Brand
Sterile Werkbank (Laminar Air Flow)	Firma Ehret
Transferpipette	Sterilin
Trockenschrank (Dg Sterilisierung)	WTB binder
Ultraschallbad	Elma Transsonic 570
Vortexmischer	Firma Bender & Hobein AG Vortex Genie 2
Waage	Sartorius

Wasserbad	Firma Aigner GFL 1086
Zentrifuge	Hermle Z 323K
Zentrifugenröhrchen	Firma Greiner

2.1.2 Liste verwendeter Lösungen und Substanzen

Alexa Fluor 488	Invitrogen
Alexa Fluor 546	Invitrogen
Alkohol 70% (EtOH 70%)	Sigma
Alkohol absolut	Sigma
DAPI-Stocklösung	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Formaldehyd 37%	Sigma
Matrigel	BD Biosciences
MTS-Reagens	Promega
NaN ₃ 500x	Sigma
Natronlauge (NaOH)	Sigma
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Firma Gibco
Phosphate buffered saline (PBS)	Eigenherstellung
Protein-Bestimmung Kit Bio-Rad	Bio Rad
Salzsäure HCl 1m	Fluka
α-MEM	Firma Gibco

2.1.3 Kulturmedien

Das verwendete „10% α-MEM“ beziehungsweise „5% α-MEM“ besteht stets aus α-MEM versetzt mit FCS, das 10% beziehungsweise 5% des Endvolumens ausmacht, sowie 1% P/S, um eine Kontamination des Mediums während der Lagerung oder der Kultur zu verhindern.

Im Falle einer Co-Kultur wurde das FCS nicht hitzeinaktiviert, bei anderen Experimenten wurde hitzeinaktiviertes FCs verwendet.

Das Medium zur Herstellung der ELP-Lösung enthielt kein FCS, sondern nur 1 % P/S zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des α-MEM.

2.1.4 Verwendete Zellen

2.1.4.1 Osteoblasten

Die in den Experimenten verwendeten Osteoblasten stammen aus den Calvarien 1-3 Tage alter Mäuse.

2.1.4.2 Knochenmarkszellen

Um in einer Co-Kultur Osteoclasten zu gewinnen, wurde zu einer bereits bestehenden Mäuse-Osteoblasten-Kultur das Knochenmark aus Femur und Tibia der Hinterbeine von Mäusen zugesetzt und mit $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PGE2 kultiviert.

2.1.4.3 Osteoclasten

Für eine Kultur von Osteoclasten und Knochenmarkszellen ohne vorangegangene Kultur von Osteoblasten wurden die Osteoclasten aus den Extremitäten weniger Tage alter Kaninchen gewonnen.

2.2 Methoden

2.2.1 Osteoblastenisolierung

Die verwendeten Osteoblasten wurden aus den Calvarien neugeborener oder bis zu drei Tage alter Mäusejungtiere gewonnen. Hierfür werden zunächst die Calvarien der Tiere isoliert und anschließend in einer Collagenase-Dispase-Lösung bei gut 37° Celsius verdaut. Mehrere Fraktionen dieser Enzymlösung werden gesammelt, vereinigt und nach Zentrifugation in α -MEM mit 10% FCS in Petrischalen ausgesät. Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation, mit Mediumtausch nach 24 Stunden, werden die Zellen mithilfe von Trypsinlösung von den Petrischalen abgelöst und auf mehrere Petrischalen aufgeteilt, um eine größere Anzahl an Zellen zu produzieren. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation werden die Zellen erneut abgelöst und in einem speziellen Einfriermedium, das auch DMSO enthält, bei -80° Celsius zwischengelagert, bevor sie zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Zur Verwendung wurden die Zellen in einem Wasserbad aufgetaut, mit 10% α -MEM versetzt und somit auf das Volumen verdünnt, das zur Aussaat verwendet wurde. Diese Zellsuspension wurde dann auf die

vorbereiteten Präparate aufgebracht und diese anschließend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.2 Vorbereitung der Präparate

2.2.2.1 Deckgläser

Handelsübliche Deckgläser wurden über Nacht in EtOH abs. eingelegt, am darauffolgenden Tag auf Küchenpapier in einer Metallbox aufgelegt und anschließend bei 180°C für 3 Stunden im Hitzeschränk sterilisiert.

Die derart vorbereiteten Deckgläser wurden verschlossen gelagert und unter dem LAF zu Beginn eines Experiments steril entnommen.

2.2.2.2 Knochenplättchen

Rinderknochen wurden mit der Knochensäge in 300 µm dicke Scheiben geschnitten, diese wurden anschließend mit einem Messer zerkleinert, sodass je 4 Stück in ein well der für das jeweilige Experiment verwendeten Kulturplatten passten. Die Scheiben und auch die zurechtgeschnittenen Stücke wurden bis zum Abschluss der Verwendung der Säge in dH₂O gelagert. Die Plättchen passender Größe wurden anschließend dreimal in dH₂O für die Dauer von 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, jeweils mit einem Wechsel der Flüssigkeit zwischen den einzelnen Schritten, um anhaftenden Knochenstaub zu entfernen. Dann erfolgte noch ein letzter, fünfminütiger Waschschrift im Ultraschallbad in EtOH 70%. Nach diesem wurden die Knochenplättchen in EtOH abs eingelegt und aus diesem entnommen um sie unter dem LAF auszubreiten. Nach dem Trocknen wurden die Plättchen für 15 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, mithilfe eines kleinen Bleistiftstriches markiert und dann gewendet und erneut für 15 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um beide Seiten der Scheiben zu sterilisieren. Anschließend wurden die Plättchen zu je 4 Stück in ein well der für das Experiment angedachten Kulturplatte geklebt. Hierfür wurde für jedes einzuklebende Plättchen je ein kleiner Tropfen sterilen Silikonfettes auf den Grund des wells aufgebracht und darauf die Plättchen aufgesetzt, mit der markierten Seite zum Grund der Kulturplatte gewandt.

2.2.2.3 ELP

2.2.2.3.1 Herstellen der ELP-Lösung

Eine Teilmenge des lyophilisierten und bei -25°C gelagerten Proteins wurde steril entnommen und gewogen. Anschließend wurde mit Medium aufgefüllt, das nur aus α -MEM mit 1% Penicillin/Streptomycin bestand. Mit Hilfe eines Vortex-Mischers wurde das Protein suspendiert und anschließend bei 4°C gelagert, damit sich das Protein über Nacht lösen konnte. Vor der Verwendung wurde sichergestellt, dass die Lösung klar ist und keine ungelösten Bestandteile mehr vorhanden sind.

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und für die Verwendung in mehreren Experimenten aufbewahrt.

2.2.2.3.2 Herstellung von Beschichtungen auf Deckgläsern

Zur Beschichtung von zuvor sterilisierten Deckgläsern wurde die ELP-Lösung auf Eis gelagert und Pipettenspitzen, die mit dem Material in Berührung kommen, ebenfalls vorgekühlt. Unter diesen Bedingungen wurde eine Schicht ELP auf Deckgläser aufgetragen, die in einer Petrischale auf sterilem Parafilm lagen, wobei die Menge an aufgetragener ELP-Lösung bei etwa 100 μ l/100 mm² lag. Anschließend wurde die Petrischale verschlossen und für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der überstehenden Lösung erlaubt, abzufließen, die Deckgläser mit Beschichtung zweimal mit PBS steril gewaschen und mit BSA-Lösung versetzt, deren Konzentration bei 5 mg/ml lag und die zuvor eine Stunde auf 70°C erhitzt worden war sowie anschließend sterilfiltriert. Nach weiterer Inkubation für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde erneut zweimal mit PBS steril gewaschen und die derart präparierten Deckgläser im Anschluss mit Medium vorinkubiert. Zur Beschichtung der Böden von well-Platten wurde in gleicher Weise verfahren, die Lösungen jedoch direkt auf die well-Platten aufgebracht und diese inkubiert.

2.2.3 Vorinkubation

Bevor eine Aussaat von Zellen auf den Präparaten erfolgte, wurden diese in 10% α -MEM für die Dauer 1 Stunde im Inkubator bei 37° Celsius und 5% CO₂ vorinkubiert, im Falle einer Osteoclasten-Kultur mit Kaninchenzellen aus organisatorischen Gründen jedoch über Nacht.

Dies diente dazu, den Proteinen aus dem FCS Zeit zu geben, sich auf der Oberfläche der Präparate abzusetzen und als Anker für die später ausgesäten Zellen zu fungieren.

2.2.4 Osteblastenaussaat

Ein aus einem der Stickstoff-Tanks entnommenes Kryoröhrchen wurde im Wasserbad vorsichtig aufgetaut, bis noch ein Eiskügelchen zu sehen war. Die Lösung sollte aufgetaut, aber noch nicht erwärmt sein. Anschließend wurde mit 10% α -MEM auf die benötigte Menge Zellsuspension aufgefüllt und diese Suspension dann ausgesät. Zur Inkubation wurde ein Inkubator mit 37° Celsius und 5% CO₂ verwendet.

2.2.5 Isolierung und Aussaat von Knochenmarkszellen

Vor der Aussaat von Knochenmarkszellen wurden zuvor Osteoblasten auf den Präparaten für die Dauer eines Tages kultiviert. Die für die Co-Kultur verwendeten Knochenmarkszellen (BMCs) entstammen Knochenmark, das aus Femur und Tibia von Mäusen ausgespült wurde. Die verwendeten Mäuse waren dabei idealerweise jünger als sechs Monate. Zur Knochenmark-Isolierung wurde das Knochenmark zunächst mit Medium mit nicht hitzeinaktiviertem FCS mithilfe einer Spritze aus der Markhöhle der Röhrenknochen gespült, anschließend zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde resuspendiert, aufgeklopft und anschließend auf das Volumen verdünnt, das zur Aussaat verwendet wurde. Nach der Aussaat wurden die Präparate bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und nach Fertigstellung eines Mediums mit 1, 25(OH)₂D₃ und PGE2 mit diesem versetzt und anschließend bis zum Tag 5 der Kultur inkubiert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumtausch vorgenommen wurde.

2.2.6 Isolierung und Aussaat von Osteoclasten aus Kaninchen

Die für eine Osteoclasten-Kultur verwendeten Zellen wurden aus den vier Beinen weniger Tage alter Kaninchen isoliert. Dazu wurden Femur und Tibia aller vier Extremitäten isoliert, mit einem Skalpell zerschnitten und anschließend in Medium mit einer Schere weiterhin zerkleinert, um die Zellen aus dem Knochengewebe zu lösen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 600 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, das entstandene Pellet aufgeklopft und mit 5% α -MEM auf das zur Aussaat verwendete Volumen verdünnt. Dabei wurden die Präparate auf zuvor sterilisierten Parafilm aufgelegt und anschließend das benötigte Zellvolumen auf die Präparate pipettiert. Nach Aussaat wurden die Präparate für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit in eine Kulturplatte transferiert, wobei ein sanfter Waschschrift mit Medium erfolgte und anschließend Zugabe frischen Mediums. Mit diesem wurden die Zellen dann für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.7 Zellfixierung

Zur Fixierung der kultivierten Zellen werden diese mit 3,7% Formaldehyd-Lösung behandelt und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Lagerung der Präparate werden die Wells der Kulturplatte mit PBS aufgefüllt, das zuvor mit NaN₃ versetzt wurde, um Kontaminationen zu vermeiden und anschließend bei Raumtemperatur gelagert, da sich das ELP bei 4°C wieder verflüssigen würde.

2.2.8 Färbungen

2.2.8.1 Rhodamin-Färbung mit Antikörper Alexa Fluor 488 oder 546

Die gewaschenen Präparate wurden mit einer 0,01% Lösung von Triton X-100 in PBS überschichtet, um die Membranen der zuvor fixierten Zellen für die Antikörperlösung zu permeabilisieren. Anschließend erfolgte das Auftragen der Antikörperlösung, gefolgt von Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz. Zuletzt wurden die Präparate erneut gewaschen um Rückstände zu entfernen.

Der verwendete Farbstoff ließ das in den Zellen vorhandene Aktin im Fluoreszenzmikroskop rot erscheinen.

2.2.8.2 Färbung der DNA mit DAPI

Die Präparate wurden in die mithilfe einer DAPI-Stocklösung hergestellte Färbelösung eingelegt und bei 37° Celsius inkubiert. Anschließend erfolgten Waschschriffe mit PBS und dH₂O.

2.2.9 Einbettung der Präparate

Nach den erfolgten Färbungen werden die Präparate in Einbettungsmittel eingebettet und unter dem Schutz eines Deckglases auf einen Objektträger aufgelegt. Die Ränder des Deckglases werden anschließend mit Kleber verschlossen, um ein Austrocknen des Einbettungsmittels zu verhindern. Handelt es sich bei dem Präparat selbst um ein Deckglas, so wird dieses mit der zellbehafteten Seite zu der Oberfläche des Objektträgers hin gewandt eingebettet und ebenfalls mit Kleber gesichert. Die Objektträger mit den Präparaten wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert, um die Stabilität des ELPs nicht zu gefährden.

2.2.10 viability-assay mittels MTS-Test

Nach eintägiger Kultur von Maus-OBs wurde das Reagens in der in der mitgelieferten Arbeitsvorschrift genannten Konzentration zugesetzt und die Zellen anschließend für 2 Stunden damit bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde die Färbung in der well-Platte mithilfe eines plate-Readers bei einer Wellenlänge von 490 nm ausgewertet.

2.2.11 Protein-Bestimmung (Bio-Rad)

2.2.11.1 Zellyse

Die Zellen einer OB-Kultur von 24 oder 48 Stunden Dauer wurden in der Kulturplatte zweimal mit 37° C warmem PBS gewaschen und anschließend mit Lyse-Puffer versetzt. Dieser Puffer enthielt Triton X-100 sowie HEPES in PBS. Anschließend wurde die gesamte Platte zweimal eingefroren und auf einem Laborschüttler stehend wieder aufgetaut. Danach wurden die Inhalte aller wells einzeln in Eppendorf-Gefäße transferiert. Diese wurden dann 30 Sekunden mittels Vortexmischer homogenisiert und 30 Sekunden im Ultraschallbad behandelt, anschließend erfolgte diese Homogenisierung ein weiteres Mal. Zuletzt

wurden die Gefäße 20 Minuten bei 13500 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Die erhaltenen Lösungen waren die Proben für die folgende Protein-Bestimmung.

2.2.11.2 Protein-Bestimmung

Im Anschluss an die Zellyse wurde die Protein-Bestimmung nach den mitgelieferten Angaben des Protein-Bestimmung Kits der Firma Bio-Rad durchgeführt. Nach Entnahme von 5µl Probe und Zusatz der Reaktionssubstanzen wurde die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die entstandene Färbung anschließend bei 690 nm mithilfe eines plate-Readers gemessen.

3 Resultate/Ergebnisse

3.1 Hinweise zu den angewandten Methoden

3.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die kultivierten Zellen wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops morphologisch untersucht, um Unterschiede der Zellstruktur betreffend in Abhängigkeit von dem Kultursubstrat feststellen zu können. Verglichen wurden dabei Knochenzellen, die auf Deckgläsern oder Knochenplättchen kultiviert worden waren im Vergleich zu solchen, die auf einer ELP-Beschichtung auf Deckgläsern ausgesät worden waren. Betrachtet wurden hierbei die Zellkerne, die mit DAPI angefärbt worden waren sowie die Aktin-Filamente des Cytoskeletts, die durch Alexa Phalloidin sichtbar gemacht worden waren.

3.1.2 MTS-Test

Dieser colorimetrische Test auf Lebensfähigkeit von kultivierten Zellen beruht auf einer Bio-reduktion des sogenannten Owens Reagens zu dem gefärbten Produkt Formazan. MTS wird dabei unter Zuhilfenahme des Elektronen-koppelnden Hilfsreagens PES durch das in Mitochondrien lebensfähiger Zellen durch Dehydrogenasen produzierte NADH beziehungsweise NADPH bio-reduziert zu Formazan. Die Intensität der entstandenen Färbung ist dabei direkt proportional zur Anzahl lebensfähiger Zellen.

3.1.3 Protein-Bestimmung Bio-Rad

Diese assay ist ebenfalls colorimetrisch und beruht auf der sogenannten Lowry-Reaktion, welche aus zwei einzelnen Reaktionen besteht, deren Kombination die Proteinbestimmung nach Lowry ausmacht. Die in den Probenflüssigkeiten enthaltenen Proteine bewirken mit den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Tartrat-Lösung einen gefärbten Komplex und zusätzlich kommt es zu einer Reduktion des Folin-Reagens durch die Verbindung von Kupfer und Proteinen. Diese Reaktion wird hauptsächlich durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan getragen, zu einem geringeren Teil auch durch Cystin, Cystein und Histidin, wobei durch den

Verlust von Sauerstoff-Atomen verschieden reduzierte Spezies des Folin-Reagens entstehen können.

3.2 Ergebnisse in Mäusezellen

3.2.1 Osteoblasten

3.2.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

Generell zeigten die Osteoblasten auf ELP-coatings gute Lebensfähigkeit und wirkten in ihrer Morphologie gesund. Dies zeigt sich in der Gestalt der Aktinfasern des Cytoskeletts, die im Vergleich zu Zellen auf den Kontrollproben Knochen oder unbeschichtete Deckgläser keine Unterschiede zeigten. Die Osteoblasten waren auf der Beschichtung mit ELPs ebenso in der Lage, sich festzusetzen und auszubreiten, wie auch bei den Kontrollgruppen, waren also lebensfähig und unterschieden sich in der Morphologie einzelner Zellen nicht erkennbar von den Kontrollgruppen.

Ein Unterschied ergab sich jedoch in Bezug auf Zellzahl und Orientierung. Auf den ELP-Beschichtungen zeigte sich eine geringfügig geringere Anzahl an Zellen, was anhand einer eher lockeren Besiedelung der Präparate im Vergleich zu den Kontrollgruppen erkennbar war. Darüber hinaus wurde auf unbeschichteten Deckgläsern eine zufällige Verteilung der Zellen beobachtet, jedoch auf ELP-Beschichtungen und Knochen ein Muster. Auf den mit ELP-Lösung beschichteten Deckgläsern zeigte sich im Vergleich zu der Verteilung der Osteoblasten auf unbeschichteten Deckgläsern ein nahezu regelmäßiges Muster in der Verteilung der Zellen auf der Oberfläche des ELP-Präparats, durchbrochen von einigen Gebieten, in denen sich Zellcluster gebildet hatten. Das Muster auf ELP-Beschichtungen unterschied sich von jenem auf Knochenplättchen, bei denen zumeist eine gemeinsame Orientierung der Zellen in eine Richtung festgestellt wurde.

Das nahezu regelmäßige Muster der Osteoblasten auf mit ELPs beschichteten Deckgläsern wurde nur in einem Versuch erhalten, jedoch wäre eine weitere Untersuchung wünschenswert.

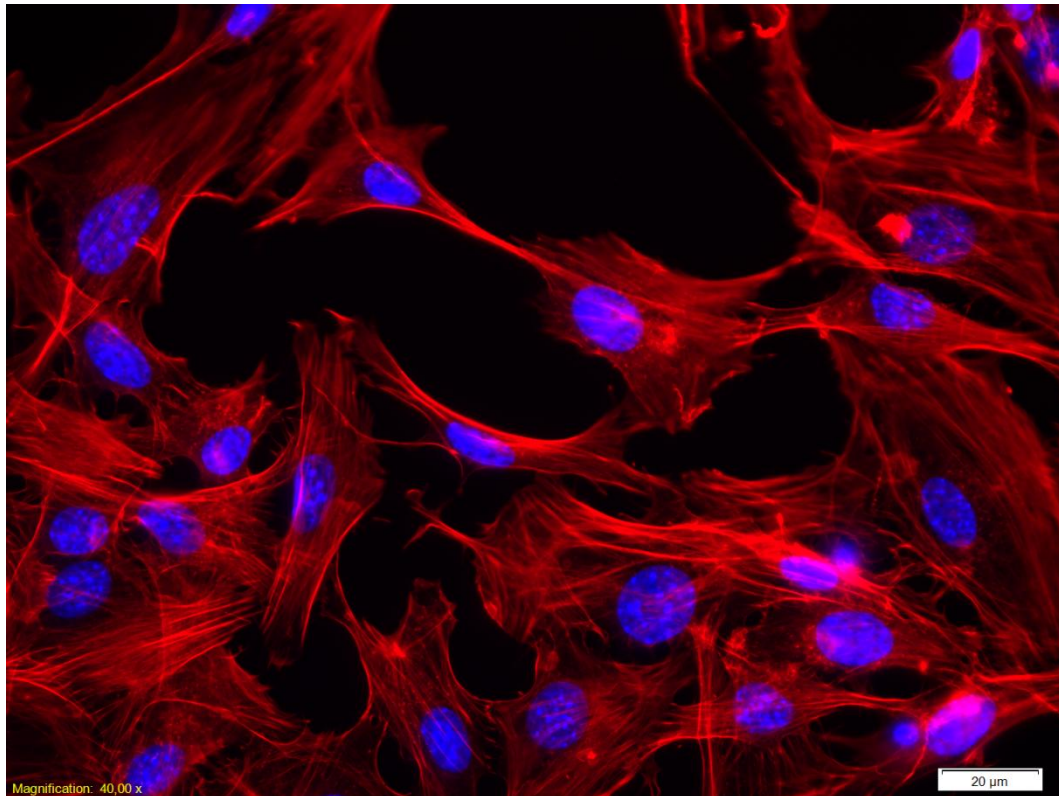


Abbildung 1: Maus-Osteoblasten auf einem unbeschichteten Deckglas.

Die Kultur dauerte zwei Tage bei einer Zelldichte von rund 3×10^5 Zellen in einem well einer 12-well-Platte. Nach Fixierung der Zellen wurden sie mit Alexa Fluor Phalloidin 488 und DAPI gefärbt.

Die Zellen waren in der Lage, sich auszubreiten und zu vermehren. Die angefärbten Aktinfilamente des Cytoskeletts und die Zellkerne zeigen gesunde Zellen, die sich auf dem angebotenen Material absetzen konnten und sowie eine gesunde Morphologie der ausgesäten Osteoblasten.

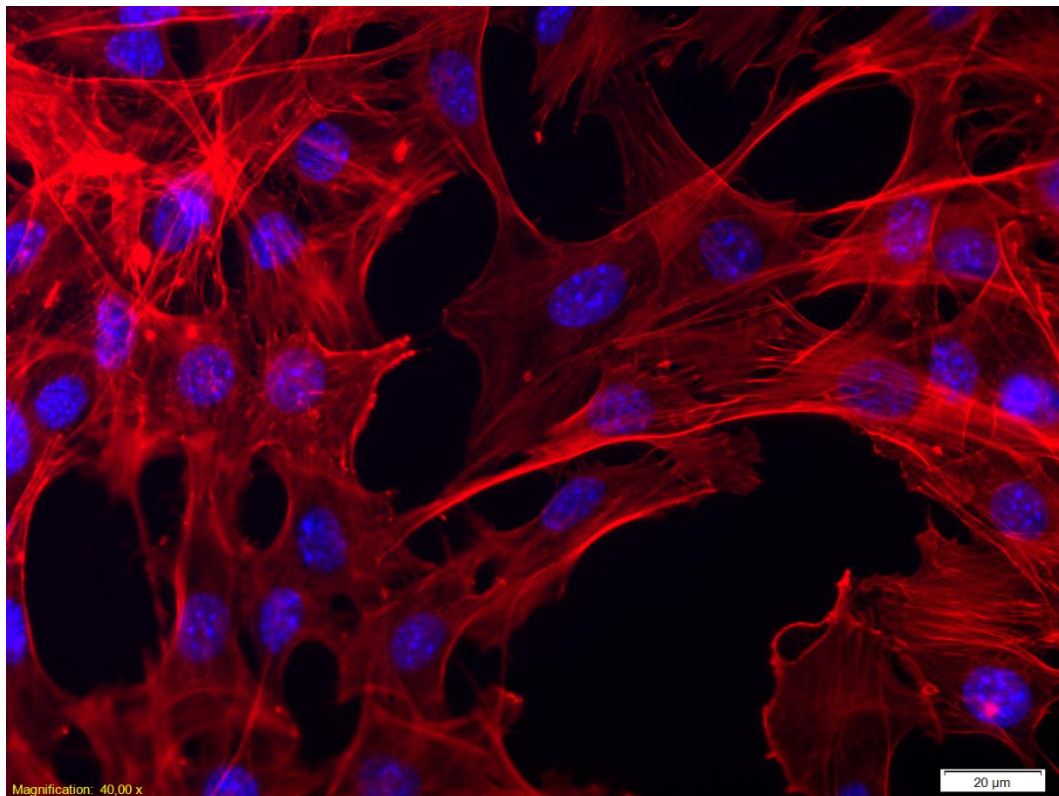


Abbildung 2: Maus-Osteoblasten auf einem ELP-beschichteten Deckglas.

Die Kultur dauerte zwei Tage bei einer Zelldichte von rund 3×10^5 Zellen in einem well einer 12-well-Platte. Nach Fixierung der Zellen wurden sie mit Alexa Fluor Phalloidin 488 und DAPI gefärbt.

Im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe auf einem unbeschichteten Deckglas zeigen diese Zellen eine ähnliche Morphologie, waren also in der Lage, sich auf dem Material abzusetzen und sich auszubreiten. Die ausgesäten Zellen erscheinen gesund.

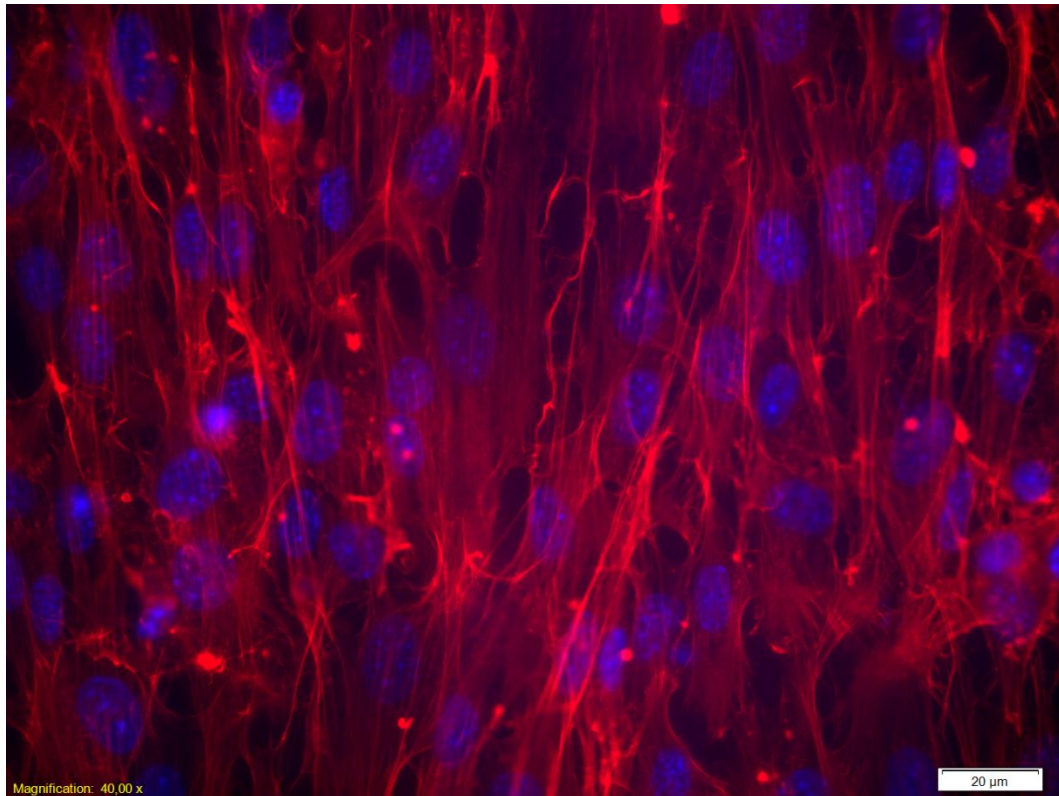


Abbildung 3: Maus-Osteoblasten auf einem Stück Rinderknochen.

Die Kultur dauerte zwei Tage bei einer Zelldichte von rund 3×10^5 Zellen in einem well einer 12-well-Platte. Nach Fixierung der Zellen wurden sie mit Alexa Fluor Phalloidin 488 und DAPI gefärbt.

Auch die Zellen dieser Kontrollgruppe zeigten die Fähigkeit, sich auf dem angebotenen Material abzusetzen und zu vermehren, damit ergab sich eine gesunde Morphologie. Auf diesem Bild ist eindeutig zu erkennen, dass die Zellen zu einer einheitlichen Orientierung tendieren, da die Aktinfilamente des Großteils der abgebildeten Zellen in dieser Abbildung vertikal orientiert sind.

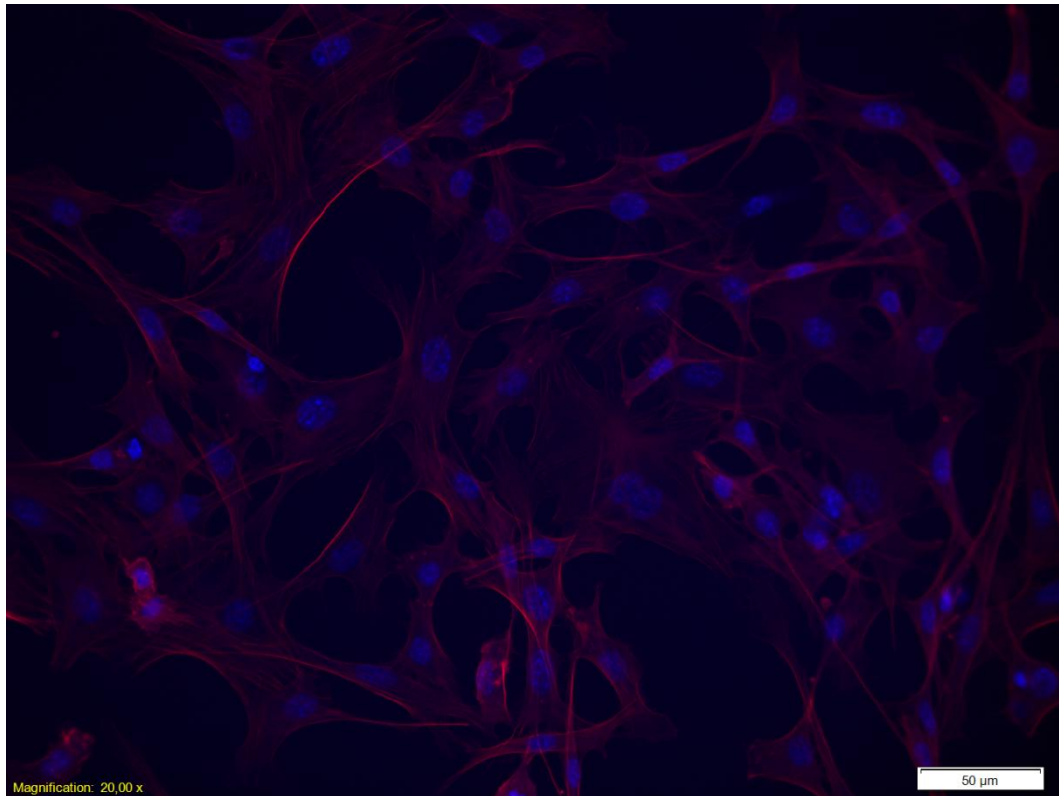


Abbildung 4: Maus-Osteoblasten auf einem unbeschichteten Deckglas, abgebildet mit geringerer Vergrößerung.

Die Kultur dauerte zwei Tage bei einer Zelldichte von rund 3×10^5 Zellen in einem well einer 12-well-Platte. Nach Fixierung der Zellen wurden sie mit Alexa Fluor Phalloidin 488 und DAPI gefärbt.

An den blau-gefärbten Zellkernen ist das Verteilungsmuster der Zellen auf dem angebotenen Material erkennbar, das hier zufällig erscheint.

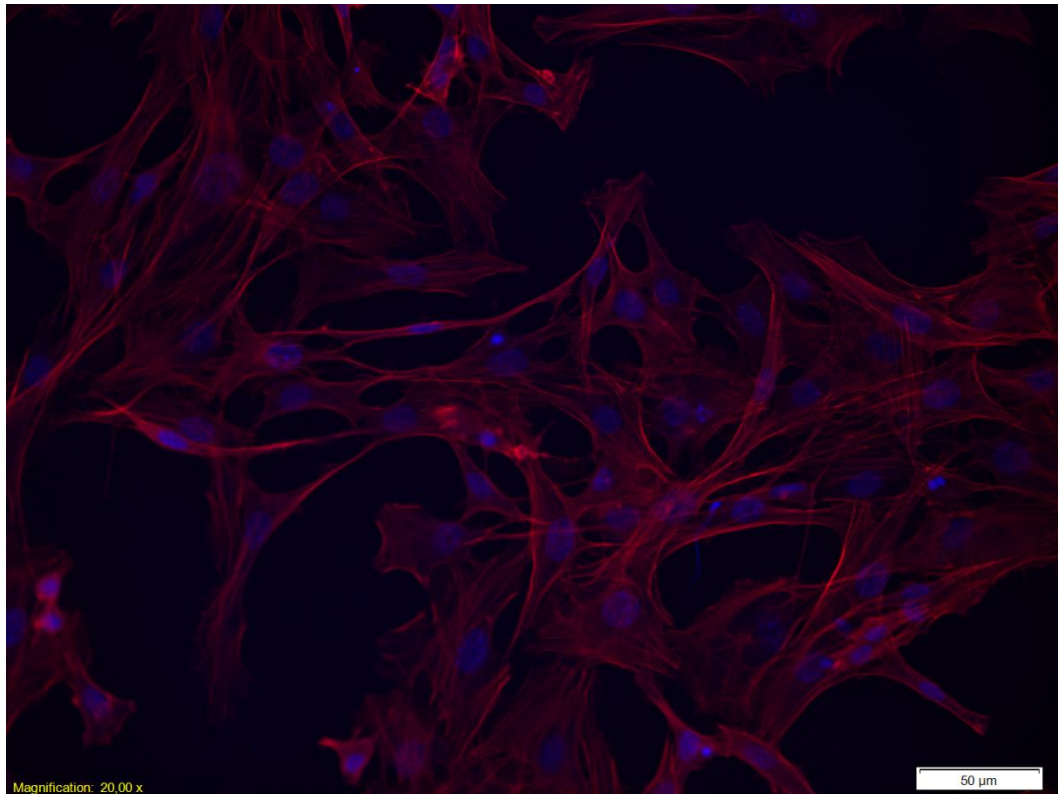


Abbildung 5: Maus-Osteoblasten auf einem ELP-beschichteten Deckglas, abgebildet mit geringerer Vergrößerung.

Die Kultur dauerte zwei Tage bei einer Zelldichte von rund 3×10^5 Zellen in einem well einer 12-well-Platte. Nach Fixierung der Zellen wurden sie mit Alexa Fluor Phalloidin 488 und DAPI gefärbt.

In weiten Bereichen dieser Gruppe erschien das Verteilungsmuster der Zellen nahezu regelmäßig, auf dieser Abbildung ist einer der erwähnten Zell-cluster zu sehen. Mittig sind mehrere Zellen zu erkennen, diesen Zellhaufen umgebend allerdings weniger Zellen.

3.2.1.2 MTS-Test

Dieser Test auf Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit fünf verschiedenen ELP-Lösungen durchgeführt, deren Konzentration von ELP in Medium von ELP1 zu ELP5 aufsteigend jeweils 1 mg/ml; 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 7,5 mg/ml; 10 mg/ml betrug. Zur Kontrolle wurde eine Gruppe an wells dem gleichen Beschichtungsverfahren unterworfen, wie bei einer Beschichtung mit ELPs, jedoch ohne den Zusatz eines Proteinpolymers, stattdessen jedoch mit der auch im coating-Prozess verwendeten BSA-Lösung mit der Konzentration 5 mg/ml als Modellschicht, eine andere Kontrollgruppe wurde mit der Substanz Matrigel erhalten. Eine weitere Gruppe wurde gar nicht behandelt bis zur Vorinkubation, die der Zellaussaat bei allen wells vorausging. Um Blindwerte zu gewinnen, wurde eine Dreifach-

Bestimmung der Extinktion durch reines Kulturmedium in den wells Co1-Co3 durchgeführt.

Alle Messwerte einer Gruppe wurden zusammengefasst, der Mittelwert bestimmt und anschließend das Mittel der Blindwerte von den Mittelwerten der Proben abgezogen, um die Extinktion zu erhalten, welche allein durch die colorimetrische Reaktion durch lebensfähige Zellen bedingt war.

Die Bestimmung ergab folgende Messwerte:

	Polystyren	BSA	Matrigel	ELP1	ELP 2	ELP 3	ELP 4	ELP 5		Co1	Co2	Co3
	1,364	1,250	1,237	1,074	0,834	0,836	0,805	0,638		0,452	0,447	0,488
	1,304	1,271	1,211	1,113	0,852	0,882	0,898	0,650		0,472	0,487	0,452
	1,400	1,123	1,198	0,969	1,032	0,797	0,781	0,635		0,459	0,492	0,439
	1,269	1,193	1,284	0,944	0,943	0,934	0,798	0,764		0,445	0,435	0,432
	1,334	1,242	1,139	1,178	0,949	0,753	0,704	0,719		0,439	0,434	0,448
	1,142	1,198	1,291	0,953	0,831	0,868	0,724	0,678		0,432	0,427	0,414
	1,382	1,315	1,173	0,938	0,954	0,862	0,854	0,732		0,435	0,43	0,412
	1,465	1,232	1,290	1,059	0,907	0,937	0,749	0,774		0,427	0,439	0,486
Mittelwerte:	1,333	1,228	1,228	1,029	0,913	0,859	0,789	0,699		0,445	0,449	0,446
minus 0,447	0,886	0,781	0,781	0,582	0,466	0,412	0,342	0,252			0,447	

Tabelle 1: Ergebnisse des MTS-Tests mit errechneten Mittelwerten und den um den Mittelwert (0,447) der Leerwerte korrigierten Mittelwerten.

Kontrollgruppen Co1, Co2, Co3 enthielten nur Kulturmedium ohne Zellen.

Mit ELP1 – ELP5 gekennzeichnete wells enthielten Beschichtungen mit einer ELP-Lösung unterschiedlicher Konzentration von ELP1 zu ELP5 aufsteigend: 1 mg/ml; 2,5 mg/ml; 5 mg/ml; 7,5 mg/ml; 10 mg/ml ELP-Lyophilisat in Kulturmedium.

Mit steigender ELP-Konzentration in der Lösung, die zur Beschichtung der wells verwendet wurde, zeigt sich eine Tendenz zu geringerer Aktivität. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze:

Die erste mögliche Erklärung wäre, dass Zellen, die auf einer ELP-Beschichtung kultiviert wurden, weniger Aktivität zeigen als solche, die auf der einfachen Polystyren-Oberfläche einer Zellkultur-Platte kultiviert wurden.

Die zweite wäre, dass sich auf einer ELP-Beschichtung zum Zeitpunkt der Messung weniger Zellen befanden, da sie auf dem verwendeten Protein-Polymer langsamer wachsen könnten als auf den zum Vergleich genutzten Oberflächen.

Es wurde keine Bestimmung der Zellzahl durchgeführt, jedoch eine Protein-Bestimmung, um das Verhältnis der Zellmengen abschätzen zu

können. Bei Betrachtung der wells unter einem Lichtmikroskop nach Ablauf der Kulturzeit, jedoch vor Zusatz des MTS-Reagens schienen allerdings in den mit ELPs beschichteten wells tatsächlich weniger Zellen vorhanden zu sein, jedoch wurden keine objektiven Messwerte der Zellzahl erhalten.

3.2.1.3 Protein-Bestimmung Bio-Rad

Dieser Test dient zur Bestimmung der Proteinmenge in einem Zelllysat und sollte den MTS-Test ergänzen, um durch Kombination beider Ergebnisse herauszufinden, ob die Osteoblasten auf den ELP-Beschichtungen geringere Aktivität aufwiesen oder in ihrer Zahl geringer waren als in den Kontroll-wells.

Zu diesem Zweck wurden die gleichen Proben-Ansätze genutzt wie in dem zuvor beschriebenen MTS-Test, jedoch wurden in einigen wells keine Zellen ausgesät. Dies diente dazu, die Proteinmenge in den verwendeten Testsubstanzen wie Matrigel und den ELP-Lösungen verschiedener Konzentration nachzuweisen, damit dieser Korrekturwert von der Gesamtproteinmenge von den Messwerten jener wells abgezogen werden konnte, in denen sich sowohl die jeweilige Testsubstanz wie auch Zellen befanden. Auf diesem Wege sollte es möglich sein, einen Hinweis auf die Zellzahl in den wells zu erhalten, sodass die erhaltenen Verhältnisse der Zellzahlen in Abhängigkeit von den Testsubstanzen mit den Ergebnissen des MTS-Tests korreliert werden können. Dies wiederum würde zeigen, ob auf ELP-Beschichtungen weniger Zellen wachsen und damit die durch den MTS-Test erhaltenen Messwerte geringer sind, oder ob eine vergleichbare Anzahl Zellen geringere Aktivität zeigt.

Die in den Zelllysaten erhaltenen Messwerte wurden mit Messwerten von Proteinstandards (St) korreliert, mit deren Hilfe eine Standard-Kurve erhalten wurde. Zusätzlich wurde der verwendete Lyse-Puffer als Blindwert vermessen.

Die Bestimmung ergab folgende Messwerte:

Zellaussaat								
	Polystyren	BSA	Matrigel	E1	E2	E3	E4	E5
	0,147	0,124	0,110	0,130	0,132	0,131	0,125	0,138
	0,161	0,124	0,116	0,131	0,142	0,125	0,147	0,127
	0,133	0,098	0,124	0,138	0,131	0,122	0,150	0,165
	0,134	0,158	0,127	0,111	0,150	0,131	0,150	0,129
Mittelwerte	0,144	0,126	0,119	0,128	0,139	0,127	0,143	0,140
KEINE Zellaussaat								
	0,112	0,140	0,114	0,141	0,116	0,141	0,158	0,155
	0,161	0,126	0,120	0,141	0,138	0,124	0,163	0,156
Mittelwerte	0,137	0,133	0,117	0,141	0,127	0,133	0,161	0,156

Tabelle 2: Ergebnisse der Protein-Bestimmung mit den Mittelwerten der einzelnen Gruppen. Der durch Vermessung der Leerwerte erhaltene Korrekturfaktor wurde nicht abgezogen, da sich die Werte kaum von den Leerwerten unterschieden.

Von den erhaltenen Mittelwerten hätte noch ein Korrekturfaktor abgezogen werden müssen, der sich durch die in den Leerwerten erhaltenen Werte ergab (nicht abgebildet), jedoch wurde dieser Schritt in der Berechnung nicht durchgeführt, da durch die Ähnlichkeit der Messwerte in den Probe-wells und den Leerwerten bereits ersichtlich ist, dass es keine signifikanten Unterschiede gibt, durch die Rückschlüsse auf die Proteinmenge in den Zelllysaten hätten gezogen werden können.

Die Reagenzien dieser Protein-Bestimmung reagieren auf fünf Aminosäuren. In der Primärstruktur des in unterschiedlichen Konzentrationen verwendeten ELPs ist keine dieser fünf Aminosäuren enthalten.

Mit den erhaltenen Ergebnissen lässt sich keine signifikante Aussage über den Proteingehalt in den lysierten Zellen und den Testsubstanzen, auf denen sie kultiviert worden waren, treffen. Möglicherweise war die Menge an Zellen in den verwendeten 96-well-Platten zu gering für die verwendete Bestimmung.

3.2.2 Osteoclasten

3.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Eine Co-Kultur von Osteoblasten und Knochenmarkszellen von Mäusen konnte Osteoclasten hervorbringen, sowohl auf den Kontrollsubstraten Rinderknochen und unbeschichtete Deckgläser. Die Morphologie der Osteoclasten auf den ELP- Beschichtungen zeigt eine große Ähnlichkeit zu jener auf Deckgläsern ohne Beschichtung: Die Zellen haben eine vergleichbare Größe und treten meist in rundlicher Form auf mit einem großen Aktinring je Zelle. Manche Osteoclasten auf ELP-Beschichtungen zeigten auch mehrere kleinere Aktinringe, die alle zu einer Zelle gehörten, wie dies sonst eher auf Knochenplättchen der Fall war, jedoch waren diese Zellen mit mehreren Ringe von eher geringer Anzahl im Vergleich zu jenen mit nur einem Ring. Tendenziell waren die Osteoclasten auf unbeschichteten Deckgläsern und auf ELP-Beschichtungen größer als jene auf Knochenplättchen und auch in ihrer Gestalt ähnlicher.

Auf Knochenplättchen, die gemeinsam mit Deckgläsern inkubiert worden waren, die eine ELP-Beschichtung aufwiesen, zeigte sich in einem Versuch eine größere Anzahl an Osteoclasten als auf den Knochenplättchen, die ohne den Einfluss von ELPs inkubiert worden waren. In einem neuerlichen Versuchsansatz konnte dieser Umstand nicht bewiesen werden, jedoch verbleibt es noch zu beweisen, ob die gemeinsame Inkubation von Knochen und ELPs einen Einfluss auf die Entstehung von Osteoclasten aus Knochenmarkszellen hat oder nicht und wie genau dieser Effekt gestaltet ist.

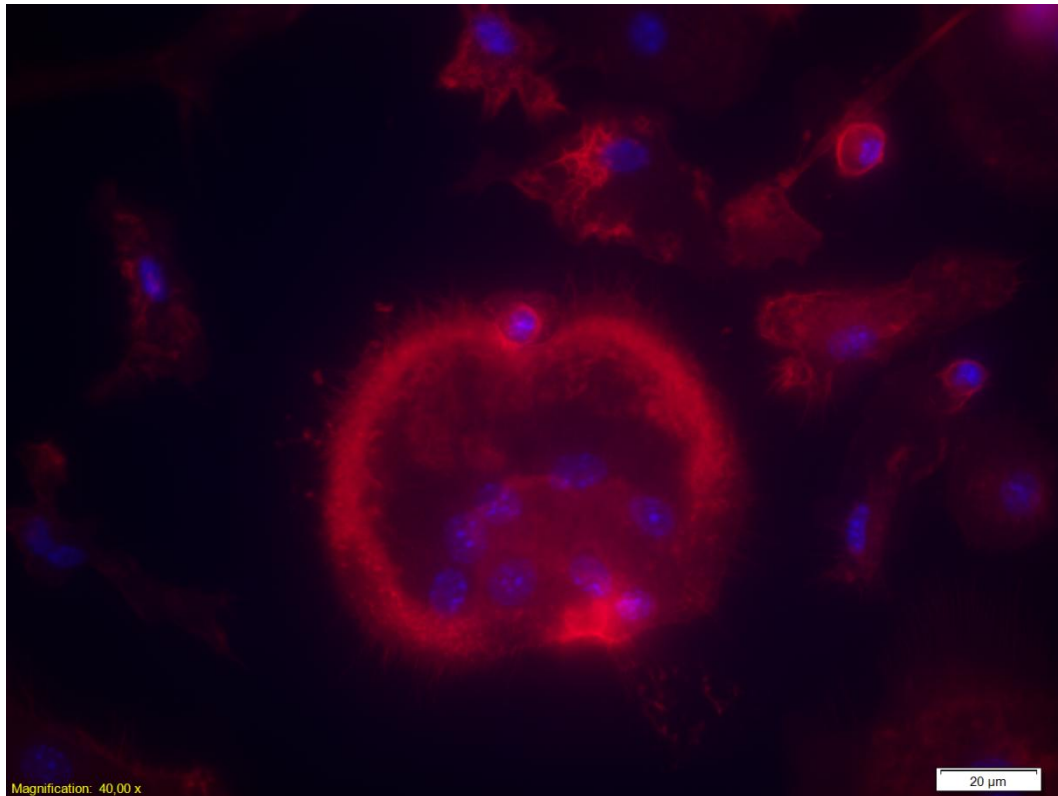


Abbildung 6: Maus-Osteoclast auf einem unbeschichteten Deckglas.

Nach eintägiger Kultur von Maus-OBs wurde Knochenmark aus Femur und Tibia einer Maus in die Wells eingebracht und das Kulturmedium mit Vit. D₃ und PGE₂ versetzt, um Osteoclasten zu erhalten. An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumtausch mit neuerlichem Zusatz dieser Substanzen und am fünften Tag der Kultur wurden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Alexa Fluor Phalloidin 546 und DAPI.

Der abgebildete Osteoclast ist deutlich an dem dichten Aktinring und den zahlreichen Kernen als Osteoclast erkennbar. Auf unbeschichteten Deckgläsern waren hauptsächlich rundliche Osteoclasten wie dieser zu finden, deren Aktinring am äußeren Rand der Zellen beinahe deren gesamten Umfang umschloss.

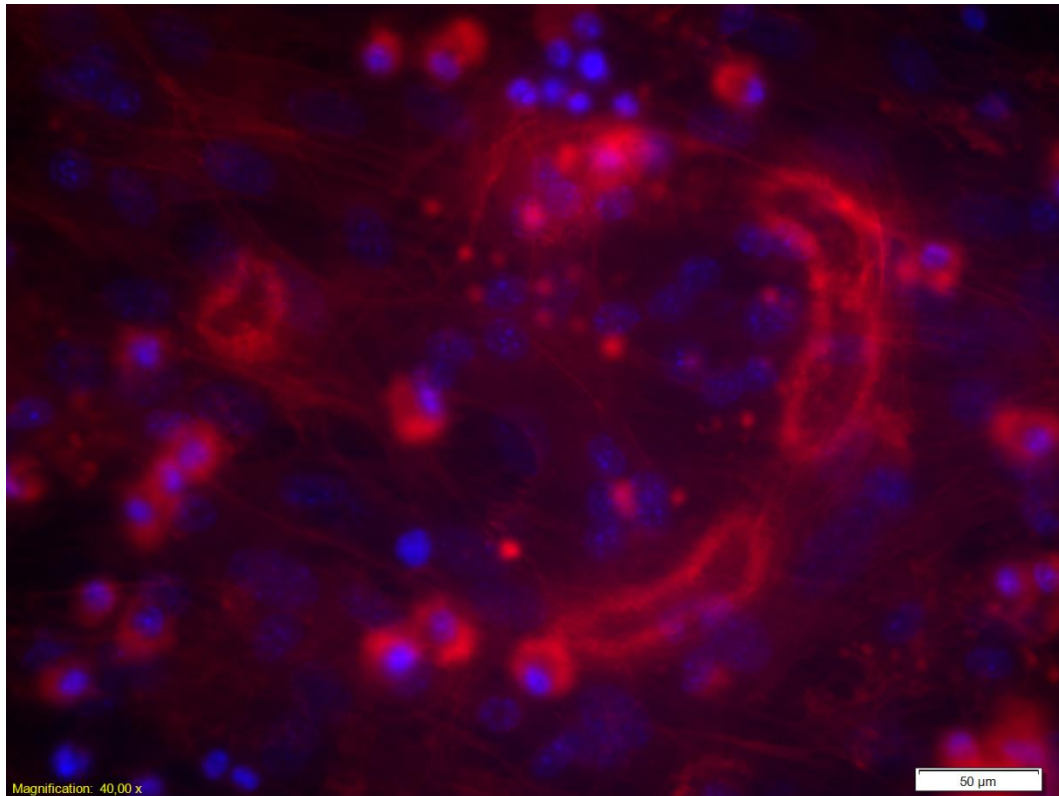


Abbildung 7: Maus-Osteoclast auf einem Stück Rinderknochen.

Nach eintägiger Kultur von Maus-OBs wurde Knochenmark aus Femur und Tibia einer Maus in die Wells eingebracht und das Kulturmedium mit Vit. D₃ und PGE₂ versetzt, um Osteoclasten zu erhalten. An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumtausch mit neuerlichem Zusatz dieser Substanzen und am fünften Tag der Kultur wurden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Alexa Fluor Phalloidin 546 und DAPI.

Viele der Osteoclasten, die auf Knochenplättchen entstanden, zeigten eine verzweigte Morphologie mit mehreren, dichten Aktinringen in einer Zelle, wie auch die abgebildete Zelle gestaltet ist. Osteoclasten auf Knochenstückchen waren zumeist auch deutlich größer als Zellen, die innerhalb desselben Versuchs auf Deckgläsern erhalten worden waren.

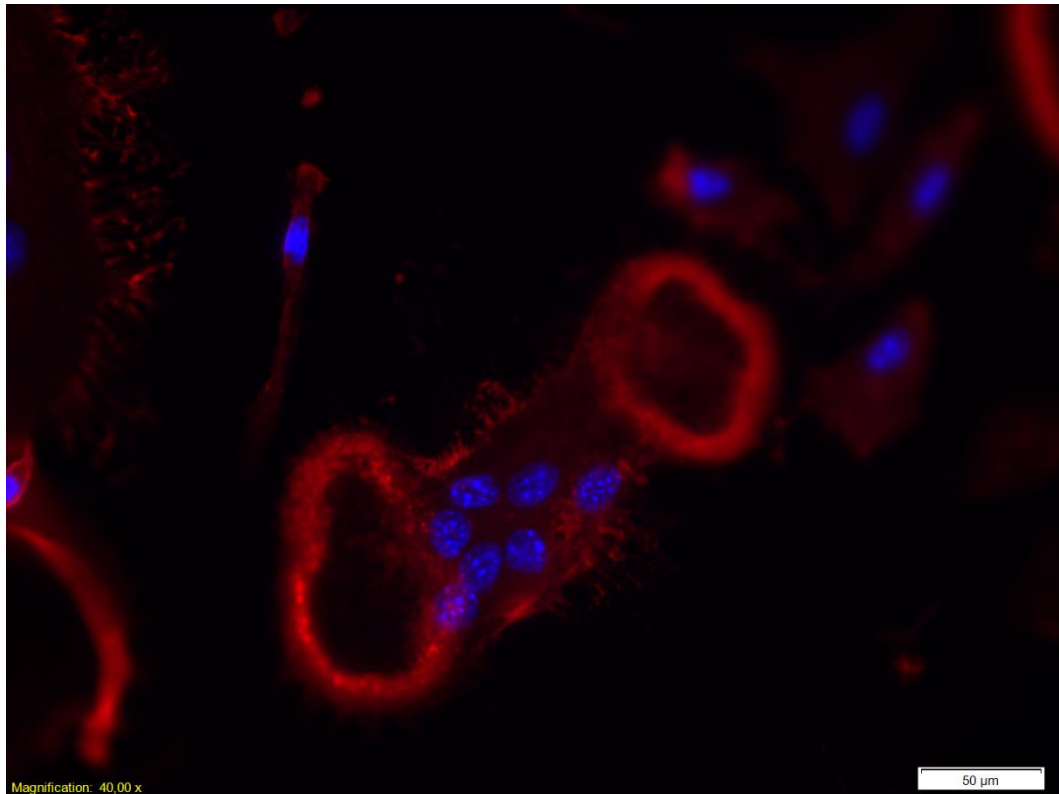


Abbildung 8: Maus-Osteoclast auf einem ELP-beschichteten Deckglas, verzweigt.

Nach eintägiger Kultur von Maus-OBs wurde Knochenmark aus Femur und Tibia einer Maus in die Wells eingebracht und das Kulturmedium mit Vit. D₃ und PGE₂ versetzt, um Osteoclasten zu erhalten. An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumtausch mit neuerlichem Zusatz dieser Substanzen und am fünften Tag der Kultur wurden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Alexa Fluor Phalloidin 546 und DAPI.

Einige der Osteoclasten auf ELP-Beschichtungen zeigten ebenfalls mehr als einen Ring innerhalb einer Zelle, was auf Deckgläsern nicht zu beobachten war, auf Knochenplättchen jedoch sehr häufig zu sehen war. Auch der abgebildete Osteoclast, der auf einer ELP-Beschichtung aus einer Co-Kultur von Maus-OBs und Maus-BMCs erhalten wurde, besitzt zwei Ringe und besitzt somit eine Morphologie, die in gewisser Weise zwischen der Morphologie liegt, die sonst auf unbeschichteten Deckgläsern und Knochenplättchen erhalten wurde, da sowohl Osteoclasten mit einem Ring, wie auch solche mit mehreren Ringe je Zelle beobachtet werden konnten. Der abgebildete Osteoclast könnte sich gerade in Bewegung befinden und deshalb zwei Aktinringe aufweisen, jedoch waren auf ELP-Beschichtungen weit mehr Osteoclasten mit mehr als einem Ring zu beobachten als auf unbeschichteten Deckgläsern. Bezüglich der beobachteten Größe waren auf ELP-Beschichtungen erhaltene Osteoclasten denen auf unbeschichteten Deckgläsern ähnlicher, sie tendierten als zu geringerer Größe als die auf Knochenstückchen beobachteten Osteoclasten.

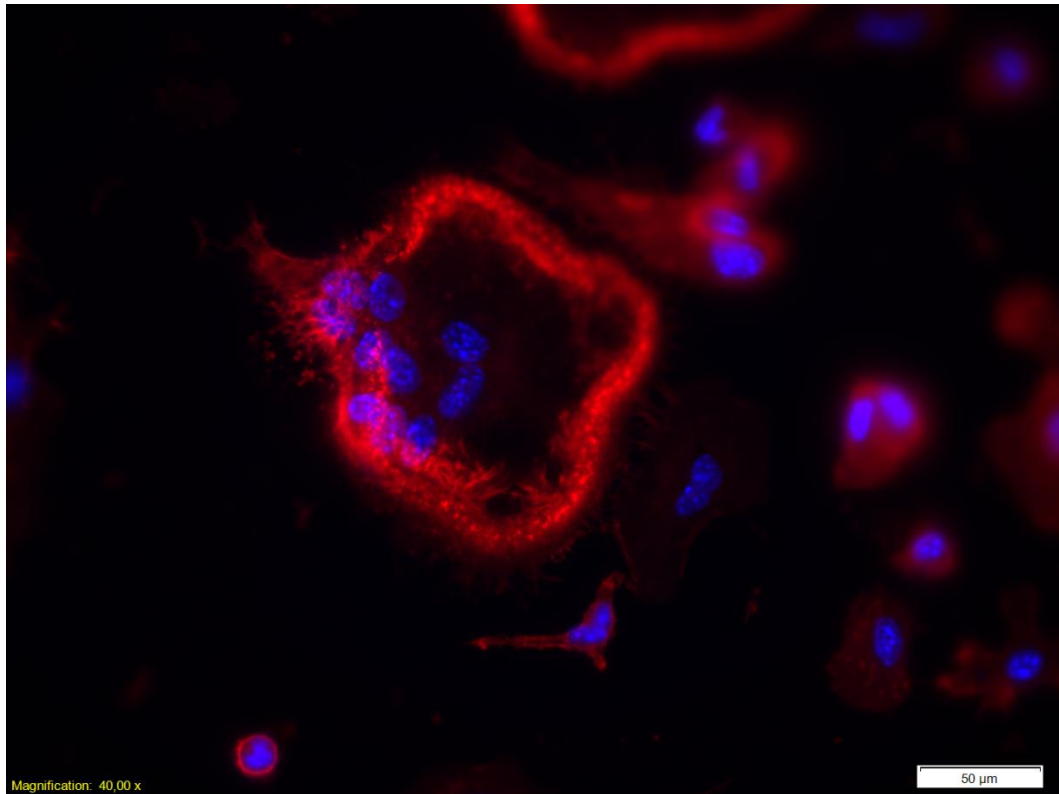


Abbildung 9: Maus-Osteoclast auf einem ELP-beschichteten Deckglas, rundlich.

Nach eintägiger Kultur von Maus-OBs wurde Knochenmark aus Femur und Tibia einer Maus in die Wells eingebracht und das Kulturmedium mit Vit. D₃ und PGE₂ versetzt, um Osteoclasten zu erhalten. An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumtausch mit neuerlichem Zusatz dieser Substanzen und am fünften Tag der Kultur wurden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Alexa Fluor Phalloidin 546 und DAPI.

Der abgebildete Osteoclast zeigt eine Morphologie, die jener, die auf unbeschichteten Deckgläsern erhalten wurde, ähnlicher ist als die Gestalt mit mehr als einem Aktinring innerhalb einer Zelle. Auf ELP-Beschichtungen waren sowohl Zellen mit einem Ring zu sehen wie auch solche mit mehreren. Auf Knochen hingegen überwogen die Osteoclasten mehr mehreren Ringen, auf unbeschichteten Deckgläsern jene mit nur einem Ring. Die Morphologie der auf ELP-Beschichtungen erhaltenen Osteoclasten könnte somit zwischen diesen beiden Gestalten liegen, da beide zu beobachten waren, wenngleich die Anzahl der rundlichen Osteoclasten auf den ELP-Beschichtungen größer war als die der verzweigten Osteoclasten.

3.3 Ergebnisse in Kaninchenzellen

3.3.1 Osteoclasten

3.3.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

Auf ELP-Beschichtungen ist es prinzipiell gelungen, Osteoclasten aus wenigen Tagen alten Kaninchen zu kultivieren. Im Vergleich zu Mäusezellen hingegen zeigten die Osteoclasten eine deutlich andere Morphologie, sowohl auf den ELP-beschichteten wie auch auf den unbeschichteten Deckgläsern. Die Osteoclasten auf den Deckgläsern, beschichtet wie unbeschichtet, waren sehr groß, was aufgrund der Erfahrungen, die im Zuge der Arbeit gemacht worden waren, zu erwarten war, da sie aus Kaninchen isoliert worden waren, jedoch bildeten sie kaum ausgeprägte Aktinringe. Einige der Osteoclasten auf unbeschichteten Deckgläsern und ELP-Beschichtungen zeigten Aktinfasern, jedoch waren die Ringe nicht geschlossen und nur sehr dünn, meist waren die einzelnen Aktinfasern, welche den Aktinring bilden sollten, noch deutlich voneinander unterscheidbar und isoliert und zu erkennen. Sie bildeten demnach eine Podosomenstruktur. Diese eher lockeren Ansammlungen von Aktinfasern zeigten sich meist ebenfalls, wie auch bei den Mäuse-Osteoclasten, in den Anlagen zu einem großen Ring je Zelle. Auf den Knochenplättchen zeigten auch die Kaninchen-Osteoclasten eine deutlich geringere Größe als auf den Deckgläsern und ebenfalls meist mehrere Aktinringe pro Zelle, wobei diese auf den Knochenplättchen auch gut definiert und geschlossen waren.

Bei Knochenplättchen, die gemeinsam mit ELP-Beschichtungen inkubiert worden waren, zeigte sich bei Kaninchen-Osteoclasten kein Unterschied zu solchen Zellen, die nur auf Knochen kultiviert worden waren. Die Osteoclasten auf Knochenplättchen in Kombination mit ELP-Beschichtungen und ohne diese zeigten eine ähnliche Morphologie, die Zellen waren meist kleiner als jene auf beschichteten oder unbeschichteten Deckgläsern und hatten mehrere Aktinringe pro Zelle, die auch geschlossen und dicht waren, einzelne Aktinfasern konnten in diesen nicht erkannt werden, sie wirkten also gesund und wohlgeformt wie auf den zur Kontrolle herangezogenen Zellen auf Knochenplättchen.

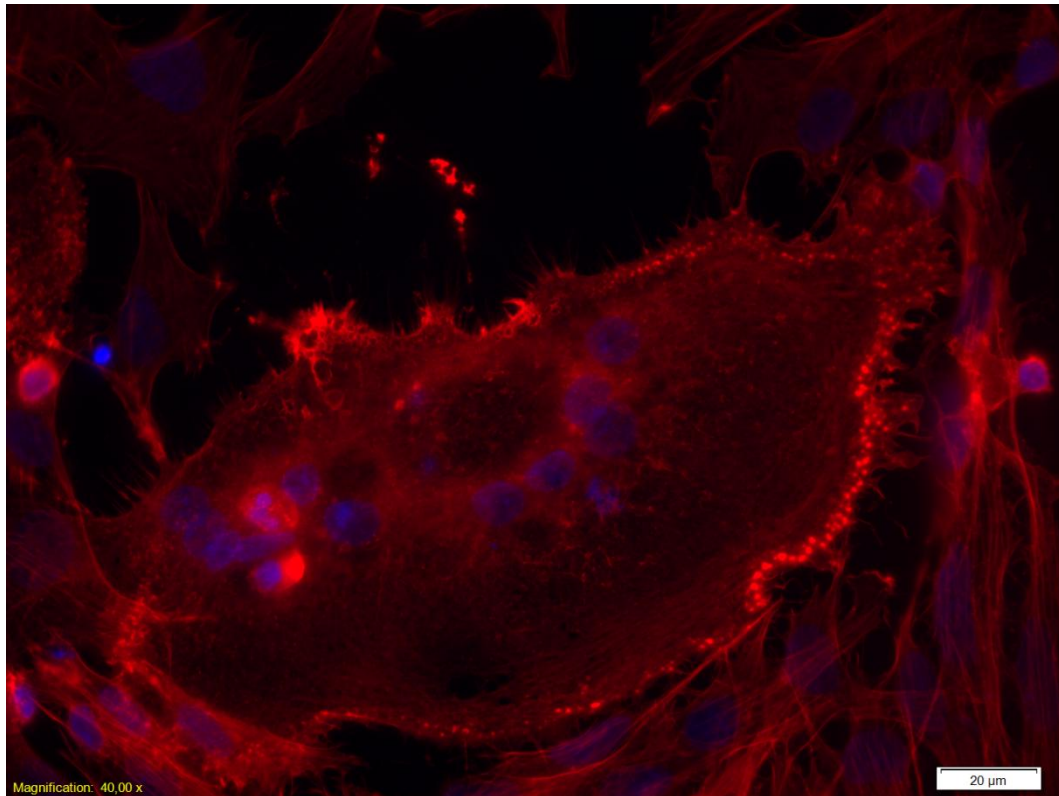


Abbildung 10: Kaninchen-Osteoclast auf einem unbeschichteten Deckglas.

Die aus Knochen weniger Tage alter Kaninchen gewonnene Zellsuspension wurde direkt auf die verwendeten Materialien wie Knochen, Glas und ELP-Beschichtung aufgetragen. Nach zweitägiger Kultur wurden die Zellen fixiert und anschließend mit Alexa Fluor Phalloidin 546 und DAPI gefärbt.

Die in den Versuchen mit Kaninchenzellen erhaltenen Osteoclasten waren größer als jene, die aus Maus-BMCs erhalten wurden. Die meisten Osteoclasten, die in Versuchen mit Kaninchenzellen kultiviert wurden, zeigten auf Deckgläsern – beschichtet wie unbeschichtet – keine durchgehenden Aktinringe, sondern zumeist lediglich vereinzelte Aktinfasern, wie auch der abgebildete Osteoclast. Einige der mehrkernigen Zellen zeigten überhaupt keine verdichteten Aktinfasern, die einer Anheftung an die Oberfläche des angebotenen Materials hätten dienen können, jedoch wäre es möglich, dass diese Zellen ohne Aktinring keine entwickelten Osteoclasten waren. Der Großteil der beobachteten Osteoclasten war nicht in der Lage, auf Deckgläsern einen Aktinring auszubilden, wobei der Grund hierfür noch unklar ist.

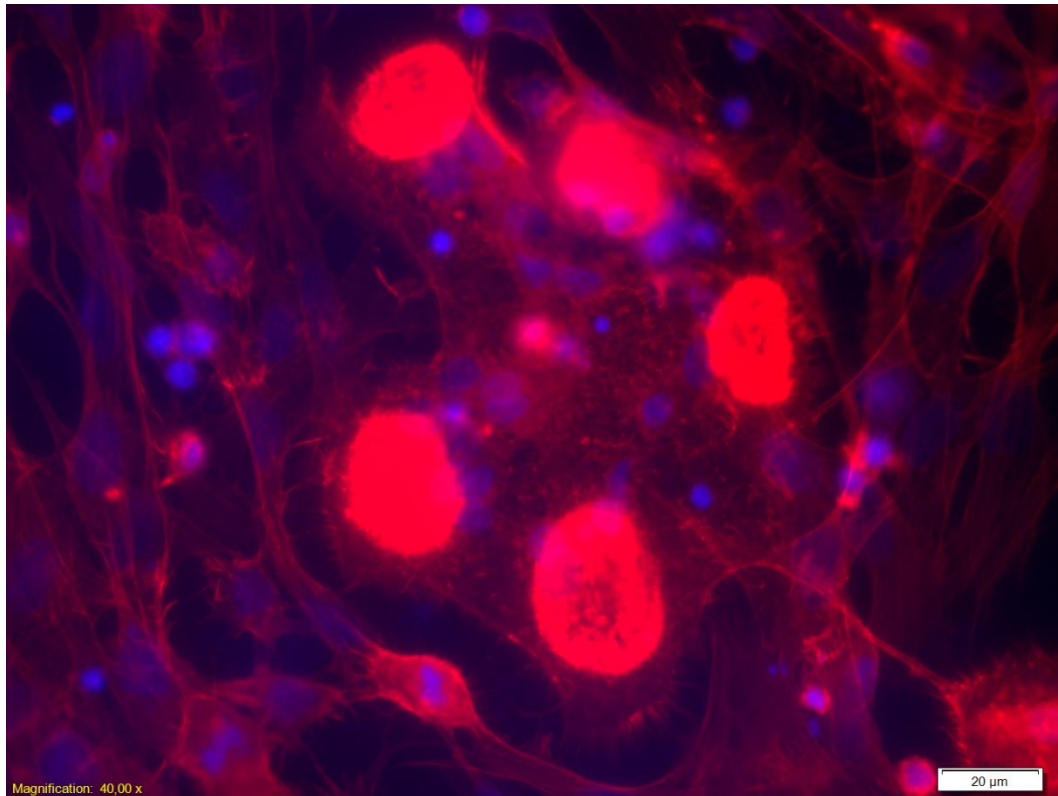


Abbildung 11: Kaninchen-Osteoclast auf Rinderknochen.

Die aus Knochen weniger Tage alter Kaninchen gewonnene Zellsuspension wurde direkt auf die verwendeten Materialien wie Knochen, Glas und ELP-Beschichtung aufgetragen. Nach zweitägiger Kultur wurden die Zellen fixiert und anschließend mit Alexa Fluor Phalloidin 546 und DAPI gefärbt.

Im Gegensatz zu auf Deckgläsern kultivierten Osteoclasten waren die auf Knochenplättchen ausgesäten Zellen sehr wohl in der Lage, dichte Aktinringe zu bilden und zeigten auch eine verzweigte Morphologie, wie sie zuvor auch schon in den Versuchen mit Mäusezellen beobachtet worden war, was für gesunde Kaninchen-Osteoclasten auf den angebotenen Knochenstückchen spricht. Der abgebildete Osteoclast besitzt mehrere Aktinringe, die auch sehr dicht sind, sowie eine Größe, die für eine aus einem Kaninchen gewonnene Zelle dieser Art durchaus zu erwarten war.

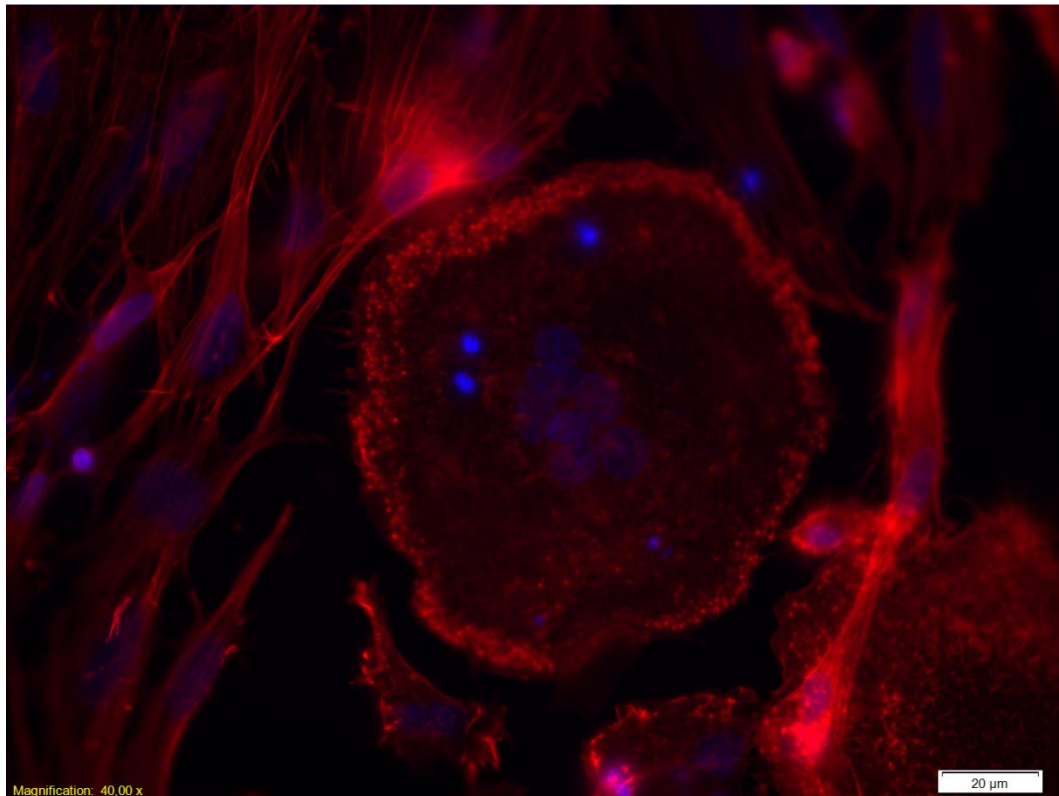


Abbildung 12: Kaninchen-Osteoclast auf einem ELP-beschichteten Deckglas.

Die aus Knochen weniger Tage alter Kaninchen gewonnene Zellsuspension wurde direkt auf die verwendeten Materialien wie Knochen, Glas und ELP-Beschichtung aufgetragen. Nach zweitägiger Kultur wurden die Zellen fixiert und anschließend mit Alexa Fluor Phalloidin und DAPI gefärbt.

In den Versuchen mit Kaninchenzellen ähnelte die Morphologie der auf ELP-Beschichtungen beobachteten Osteoclasten der von Zellen, die auf unbeschichteten Deckgläsern erhalten wurden. Auf mit ELPs beschichteten Deckgläsern tendierten die Kaninchenzellen eher zu einer rundlichen Morphologie und zur Ausbildung eines einzigen Aktinrings, jedoch waren zumeist nur die Ansätze eines solchen Ringes erkennbar, keine durchgehenden und dichten Ringe, welche einen Abschluss des von der Zelle eingeschlossenen Gebiets ermöglicht hätten. Der Großteil der beobachteten Osteoclasten zeigte lediglich vereinzelte Aktinfasern, wie sie auch auf diesem Bild zu sehen sind.

4 Zusammenfassung

Elastin-artige Polymere sind eine noch recht junge und in vielerlei Hinsicht vielversprechende Stoffklasse. Die große Vielseitigkeit dieser Materialien lässt viele mögliche Anwendungen zu, durch die jedoch erst kurze Dauer der Erforschung ihrer Eignung bleiben noch viele Fragen offen und viele Theorien erst zu untersuchen. ELPs sind unterhalb einer bestimmten Transitionstemperatur, die von den spezifischen Eigenschaften des Materials abhängig ist, in wässriger Lösung löslich. Wird diese Temperatur allerdings überschritten, kommt es durch hydrophobe Faltung der Protein-Polymere zu einer Aushärtung und somit zu einer Ausbildung einer Hydrogel-artigen Konsistenz der Protein-Polymere. Dieses Hydrogel kann auch auf Oberflächen zu einer Beschichtung genutzt werden, wie es in dieser Arbeit mit den Oberflächen von handelsüblichen, zuvor sterilisierten Deckgläsern durchgeführt wurde. Durch die Möglichkeit, in die Primär-Sequenz von ELPs spezielle Aminosäure-Abfolgen zu integrieren, die von Zellen erkannt werden, wie etwa die Sequenz RGD, die von Osteoblasten zur Verankerung genutzt wird, liegt eine Anwendung der ELPs in der Zellkultur nahe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung von ELPs als Beschichtungsmaterial für Deckgläser in einer Kultur von Knochenzellen von Mäusen sowie Kaninchen getestet, mit besonderem Augenmerk auf die Morphologie der kultivierten Zellen, da diese Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen zulässt und zeigt, ob sie in der Lage waren, auf dem angebotenen Material zu adhären und zu wachsen. Dies ist nicht nur für eine Anwendung in vitro entscheidend, sondern könnte, wenn sich die ELPs in weiterführenden Studien als funktionell erweisen, auch Einzug in das Gebiet des tissue-engineering oder der regenerativen Medizin halten und gerade Osteoblasten und Osteoclasten sind auf eine Adhäsion an das zur Verfügung gestellte Material angewiesen um zu überleben und ihre Funktionalität beizubehalten.

- In den durchgeführten Versuchen zeigten die ausgesäten und auf ELP-Beschichtungen kultivierten Mäusezellen eine unauffällige Morphologie, die mit der von Zellen auf unbeschichteten Deckgläsern vergleichbar war. Die Osteoblasten waren auch befähigt sich anzuheften und zu teilen. Ob das in die Primärstruktur des verwendeten ELPs integrierte RGD-Motiv tatsächlich einen Einfluss auf die Verteilung der Osteoblasten nimmt und diese zu einer regelmäßigen Anordnung tendieren lässt, verbleibt noch zu klären.
- Osteoclasten, die aus einer Co-Kultur von Maus-Osteoblasten und aus Mäusen isolierten Knochenmarkszellen auf der Beschichtung selbst erst entstanden, zeigten ebenfalls eine Morphologie, die mit den Kontrollgruppen vergleichbar war, jedoch wiesen sie auf der ELP-Beschichtung nicht nur Ähnlichkeit zu Osteoclasten auf unbeschichteten Deckgläsern auf, sondern einige auch zu solchen Zellen, die auf Plättchen aus Rinderknochen kultiviert worden waren. Auf unbehandelten Deckgläsern zeigten die Osteoclasten meist nur einen großen Aktinring, der sich beinahe über den gesamten Umkreis der Zelle erstreckte, auf Knochen hingegen wiesen sie meist mehrere Aktinringe pro Zelle auf, die meist kleiner, aber auch dichter waren als auf Glas. Auf der ELP-Beschichtung jedoch waren beide Gestalten aufzufinden, sowohl mit einem als auch mit mehreren Aktinringen innerhalb eines Osteoclasten. Möglicherweise beeinflusst die gemeinsame Inkubation von mit ELPs beschichteten Deckgläsern und Knochenplättchen die Osteoclasten-Anzahl positiv, jedoch ist eine eingehendere Untersuchung dieser Theorie noch ausständig.

- Kaninchen-Osteoclasten zeigten sowohl auf den beschichteten wie auch den unbeschichteten Deckgläsern eine Morphologie, die sich deutlich von derjenigen auf den Knochenplättchen unterschied. Auf Knochen konnten die Osteoclasten deutliche und dichte Aktinringe ausbilden, auf den Deckgläsern jedoch nicht. Die Osteoclasten überstanden die Kultur, zeigten jedoch nur selten Aktinringe, deren Fasern meist noch isoliert zu erkennen waren. Auf Knochenplättchen hingegen waren die Aktinringe gut ausgebildet.
- Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ELP-Beschichtungen als Oberfläche für eine Kultur von Knochenzellen durchaus geeignet sind, wobei die Adhäsion bereits reifer Osteoclasten scheinbar weniger effektiv erfolgt als jene von Osteoclasten, die im Rahmen einer Co-Kultur erst auf der beschichteten Oberfläche entstehen.

5 Summary

Elastin-like polymers are a rather young and in various ways promising group of compounds. Their versatility allows many different applications but due to the young research field there are still many unanswered questions and theories remain to be inspected regarding their future use. Below a certain transition temperature, that is determined by the specific characteristics of the material, ELPs are soluble in aqueous solution, but as soon as the temperature rises above this certain transition temperature, hydrophobic folding of the protein-polymers occurs and they solidify and gain a consistency comparable to those of hydrogels. The hydrogels obtained this way can be used to fashion coatings, as it was done within this thesis on the surfaces of commercially available glass cover slips. Due to the possibility of integrating specific sequences of amino acids, that are recognized by cells, like for example the sequence RGD, which osteoblasts can use for adhesion, into the primary structure of ELPs, the application of ELP-coatings in cell culture offers a promising future. With this diploma thesis the suitability of ELP-coatings for glass cover slips as surface for culture of bone cells derived from mice or rabbits was investigated. Special attention was out on the morphology of the cultivated cells, allowing further conclusions about the cells' condition and their ability to adhere to and to proliferate on the provided material. Adhesion is not only important for an application in vitro, but could also allow ELPs to find their way into tissue-engineering and regenerative medicine if the protein-polymers prove to be functional, since osteoblasts and osteoclasts are especially dependent on adhesion to the provided material in order to survive and function.

In the experiments performed mural cells cultivated on ELP-coating displayed a good morphology, comparable to the one shown on uncoated cover slips and the osteoblasts were able to adhere and to proliferate. Whether the RGD-motif, that was integrated into the primary structure of the used ELP actually had an influence on the arrangement of the

osteoblasts and induces a regular pattern in the growth of them yet remains to be explored further.

Osteoclasts that were generated in a co-culture of mural osteoblasts and isolated bone marrow cells of mice directly on an ELP-coating, showed a similar morphology comparable to those of cells in the control groups but they showed resemblances to both osteoclasts on uncoated glass cover slips and to cells cultivated on slices of bovine bone. On uncoated cover slips most osteoclasts developed one single big actin-ring that was almost spread across the entire circumference of the cell. On bone, in contrast, they usually built multiple actin-rings within one cell, which were smaller and also tighter than those on glass. On the ELP-coatings, both forms of actin-rings were present. A combined incubation of ELP-coated cover slips with bone slices potentially increased the number of osteoclasts, but a closer examination of this theory is still needed.

Rabbit-osteoclasts on both coated as well as uncoated cover slips displayed a clearly different morphology than on bone slices. On bone they were able to develop distinct and tight actin-rings, but not on cover slips. The osteoclasts survived the time of culture, but scarcely built actin-rings, and if they did, the rings' filaments were clearly distinguishable from each other. On bone slices, on the contrary, the actin-rings were formed tightly.

In summary it can be stated that ELP-coatings are suitable for the use as a surface-coating in the culture of bone cells, although the adhesion of already mature osteoclasts seems to be less effective than the adhesion of osteoclasts that were generated directly on the ELP-coating within a co-culture.

6 Diskussion

Die Stoffklasse der ELPs wurde in den 1980er Jahren entdeckt und seither ständig weitererforscht und weiterentwickelt. (Rodríguez-Cabello, et al. 2009) Durch die Tatsache, dass sie eine Abwandlung des in vielen Säugetieren vorkommenden Proteins Elastin sind, gibt es keine Berichte über Unverträglichkeiten in vivo, da die ELPs von einem Immunsystem nicht als Fremdstoff klassifiziert werden. (Bessa, et al. 2010), (Herrero-Vanrell, et al. 2005) Weiters ergibt sich durch die Herstellung über Gentechnik und Fermentation die Möglichkeit, ELPs genau nach den Anforderungen für den geplanten Einsatz maßzuschneidern. Je nach Variation der Primärstruktur kann die Transitionstemperatur eines ELPs verändert werden, es können spezifische Aminosäure-Sequenzen eingefügt werden, wie etwa Erkennungssequenzen, Schnittstellen für proteolytische Enzyme oder gar biologisch aktive Peptide, was die Eigenschaften eines ELPs bis ins kleinste Detail modulierbar macht. (Herrero-Vanrell, et al. 2005), (Meyer und Chilkoti 2004) Die gute Verträglichkeit und die vielseitigen, wandelbaren Eigenschaften der ELPs lassen viele Anwendungen zu, die zum Teil bereits umgesetzt sind oder eifrig erforscht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung von ELPs für eine Anwendung auf dem Gebiet der Zellkultur von Knochenzellen aus Mäusen und Kaninchen untersucht mit besonderem Augenmerk auf die Morphologie der Zellen, die ihren Gesamtzustand verrät, und die Überlebensfähigkeit der Zellen. Die bisherigen Berichte über die Verträglichkeit der ELPs legten bereits vor Beginn der Arbeit nahe, dass die Zellen durch das verwendete ELP keinen Schaden nehmen würden, die genauen Auswirkungen des ELPs konnten jedoch nicht vorhergesehen werden, da – unseres Wissens nach – ELPs bislang noch nicht in Verbindung mit Knochenzellen eingesetzt worden waren. (Meyer, et al. 2001)

Erwartungsgemäß zeigten die verwendeten Zellen auf den ELP-Beschichtungen ein gutes Wachstum und eine gesunde Morphologie, was

darauf schließen lässt, dass es zu keinem negativen Einfluss durch das Beschichtungsmaterial gekommen ist. Generell schien die Anzahl an Zellen auf den ELP-Beschichtungen etwas geringer zu sein als auf den Vergleichsproben Glas oder Knochen. Morphologisch gesehen zeigten sich jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppen, sodass ein guter Gesamtzustand der kultivierten Zellen auf dem Probenmaterial beobachtet wurde, was sich mit den Berichten über die Verträglichkeit von ELPs deckt. Durch die Kompatibilität von Zellen mit diesem Material ergeben sich zahlreiche neue Wege, Facetten der ELPs oder Anwendungen zu erforschen, da nach bisher veröffentlichten Arbeiten und den bisherigen Erkenntnissen nichts gegen eine Verwendung dieser Peptidpolymere in Kombination mit Säugetierzellen spricht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur einige wenige grundlegende Erkenntnisse über ein spezifisches ELP in Verbindung mit Knochenzellen gewonnen werden, sodass noch viele Fragen ungeklärt bleiben und zahlreiche weitere Theorien erst noch überprüft werden müssen, besonders in Anbetracht der Tatsache, dass die Stoffklasse der ELPs äußerst vielseitig ist.

6.1 Ergebnisse in Mäusezellen

6.1.1 Osteoblasten

Auf Beschichtungen des verwendeten ELPs kultivierte Osteoblasten waren in der Lage, sich an die angebotene Oberfläche anzuheften und in vergleichbarer Geschwindigkeit zu wachsen, wie auch auf den Kontrollproben. Die ELP-Beschichtungen wurden ebenso wie die Kontrollmaterialien mit FCS-haltigem Kulturmedium vorinkubiert, was den in FCS gelösten Proteinen die Zeit gab, sich auf der Oberfläche abzusetzen und auf diese Weise eine günstige Oberfläche für das Wachstum der Osteoblasten zu bilden. (Vagaska, et al. 2010) Jedoch wurde auch ein Einfluss des ELPs beobachtet. In die Primärstruktur des verwendeten ELPs war die Aminosäure-Sequenz RGD integriert worden, welche von Osteoblasten erkannt und zur Verankerung genutzt werden kann. Es existieren Berichte, in denen die Sequenz REDV genutzt worden war, um die Adhäsion von Endothelzellen an das angebotene ELP zu

erhöhen. (Di Zio und Tirrell 2003) Auch im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich ein Effekt der spezifischen Aminosäure-Sequenz, da die auf ELP-Beschichtungen kultivierten Osteoblasten in ihrem Wachstum ein nahezu regelmäßiges Muster zeigten, während Vergleichsproben auf Glas eine zufällige Anordnung der Zellen zeigte.

In einem weiteren Versuch konnte diese Regelmäßigkeit nicht zweifelsfrei bewiesen werden, doch eine Möglichkeit, die Orientierung der kultivierten Zellen durch integrierte Aminosäure-Sequenzen zu beeinflussen, ist ein interessanter Ansatz, der weitere Beachtung verdient. Demnach wären weitere Untersuchungen zu den genauen Effekten einer spezifischen Erkennungssequenz innerhalb der Primärstruktur eines ELPs wünschenswert.

Es wurde nicht untersucht, ob die Osteoblasten in der Lage gewesen wären, sich auch ohne die Zugabe von FCS auf der ELP-Beschichtung abzusetzen. Ein derartiger Versuchsaufbau hätte eventuell zu genaueren Erkenntnissen über den Einfluss der ELP-Primärstruktur geführt, wäre jedoch in Bezug auf die Vergleichsproben problematisch geworden, da eine Kultur auf Glas ohne das Angebot von Proteinen aus Serum nur mäßig erfolgreich ist. Allerdings wäre eine genauere Beobachtung, welche Auswirkung die Primärstruktur der für die Beschichtung verwendeten ELPs auf das Wachstum der kultivierten Zellen hat, gewiss interessant.

Auf ELP-Beschichtungen wurde eine leicht verringerte Zellzahl beobachtet, doch diese wurde nicht eindeutig nachgewiesen. Weitere Untersuchungen, in denen eindeutige Daten über die Zellzahl gesammelt werden, empfehlen sich demnach, um profunde Beweise für diese Beobachtung zu erhalten. Eine Erklärung für diese scheinbar verringerte Zellzahl konnte bisher nicht gefunden werden, es wäre jedoch möglich, dass auf ELP-Beschichtungen das Wachstum der Zellen etwas verlangsamt abläuft. Dies ist bislang jedoch lediglich eine Theorie und bedarf noch weiterer Untersuchungen, um ein verlangsamtes Wachstum bestätigen oder widerlegen zu können oder gar eine Erklärung für die scheinbar verringerte Zellzahl auf den ELP-Beschichtungen zu finden.

Der durchgeführte MTS-Test auf mitochondriale Aktivität der Zellen ergab lediglich, dass lebensfähige Zellen vorhanden waren, allerdings waren die Ergebnisse nicht eindeutig auswertbar. In wells mit ELP-Beschichtung zeigte sich eine verringerte Aktivität, jedoch war aus den Ergebnissen der MTS-Tests alleine nicht erkennbar, ob diese geringeren Messwerte durch eine geringere Zellzahl im Vergleich zu der in den Kontrollwells bedingt war, oder ob die Zellen in den ELP-beschichteten wells geringere Aktivität aufwiesen. Um den MTS-Test zu ergänzen und die Ergebnisse interpretierbar zu machen, wurde noch eine Protein-Bestimmung parallel zu einem MTS-Test durchgeführt, da die in den wells vorhandenen Proteinmengen Rückschlüsse auf die Menge an vorhandenen Zellen zulassen. Die Kombination dieser beiden Versuche sollte Aufschluss darüber geben, ob die Zellzahl in wells mit ELP-Beschichtung geringer war als in den Kontrollwells, oder ob die Aktivität der Zellen verringert war. Jedoch konnte die Protein-Bestimmung keine verlässlichen Ergebnisse liefern. Aus bisher unbekanntem Grund unterschieden sich die Messwerte der Protein-Bestimmung in den einzelnen wells nicht signifikant voneinander, sodass keine Aussage zu treffen war. Die Bestimmungsmethode reagiert hauptsächlich auf fünf Aminosäuren, nämlich vor allem Tyrosin und Tryptophan, in geringerem Maße auch auf Cystein, Cystin und Histidin. Keine dieser fünf Aminosäuren war in dem verwendeten ELP vorhanden weshalb in den wells ohne Zellen keine Reaktion zu erwarten war. Dies erklärt allerdings nicht, weshalb sich die Messwerte, die in wells mit ausgesäten Zellen erhalten wurden, nicht von jenen in wells ohne Zellen unterscheiden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zelllyse, welche vor Beginn dieser Protein- Bestimmung durchgeführt werden muss, erfolglos war, jedoch konnte keine Begründung dafür gefunden werden. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Zellzahl in den verwendeten 96-well-Platten nicht groß genug war, um eine Proteinmenge zu erzeugen, für deren Nachweis die Empfindlichkeit der verwendeten Bestimmungsmethode ausgereicht hätte, jedoch ist der exakte Grund für die nicht signifikanten Messwerte bisher nicht bekannt. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet erschienen in den mit

ELPs beschichteten wells weniger Zellen, als in den unbeschichteten, jedoch wurde keine Zellzahl erhoben, sodass die Theorie, dass in beschichteten wells eine geringere Anzahl Zellen vorhanden war, bisher nicht bestätigt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit bleibt also unklar, ob die Anzahl der Zellen auf ELP-Beschichtungen verringert ist oder ob die Zellen weniger aktiv sind als in den unbeschichteten wells.

6.1.2 Osteoclasten

Osteoclasten aus Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit durch eine Co-Kultur von Maus-Osteoblasten und Knochenmarkszellen erhalten. Die meisten Osteoclasten in diesem Versuchsaufbau zeigten eine gesunde Morphologie mit mehreren Kernen je Zelle und gut definierten Aktinringen. Auch die Zellzahl betreffend zeigte sich auf den ELP-Beschichtungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen kein deutlicher Unterschied, was in Kombination mit der gesundwirkenden Morphologie der Zellen auf eine gute Verträglichkeit des Materials schließen lässt. Die Aktinringe der Osteoclasten erschienen auf den ELP-Beschichtungen meist ähnlich denen auf unbeschichteten Deckgläsern, also mit nur einem großen Ring pro Zelle, der beinahe den gesamten Umfang des Osteoclasten umspannte, jedoch war ein kleiner Anteil der Osteoclasten auf den ELPs auch denen auf Knochenplättchen ähnlicher. Auf Knochen zeigten die meisten Osteoclasten mehrere, dafür eher kleine Aktinringe innerhalb einer Zelle und auch auf den ELP-Beschichtungen waren einige Zelle mit dieser Morphologie zu finden. Es wäre selbstverständlich denkbar, dass Osteoclasten mit mehreren Aktinringen lediglich beobachtet werden konnten, da sie sich zu Zeitpunkt der Zellfixierung gerade in Bewegung befanden. Allerdings waren auf den ELP-Beschichtungen wesentlich mehr dieser verzweigten Zellen zu finden als auf unbeschichteten Deckgläsern, sodass angenommen werden kann, dass die Morphologie der auf ELP-Beschichtungen erhaltenen Zellen entweder zwischen jener liegt, die auf unbeschichteten Deckgläser vorherrscht und jener, die auf Knochenplättchen zu finden ist, allerdings wäre es auch denkbar, dass Osteoclasten auf ELP-beschichteten Oberflächen größere Mobilität zeigen

und somit häufiger in Bewegung wären, wodurch sich die größere Anzahl an Zellen mit mehr als einem Aktinring ebenfalls erklären ließe. Wodurch diese variable Gestalt der Osteoclasten auf den ELP-Beschichtungen hervorgerufen wurde, ist noch unklar, jedoch stellt sie einen interessanten Effekt der Kultur auf ELPs dar, der weitere Untersuchungen verdient. Es wäre rein theoretisch möglich, dass die Oberflächenstruktur einer ELP-Beschichtung für die Zellen größere Ähnlichkeit zu der natürlichen Oberfläche eines Knochens besitzt und durch diesen Umstand diese verzweigte Gestalt mit mehreren Aktinringen bedingt, die auf unbeschichteten Deckgläsern innerhalb dieser Arbeit nicht gefunden werden konnte. Die genaue Ursache ist noch unklar, jedoch wäre sie für die weitere Erforschung der ELPs sehr interessant, denn sollte die Oberflächenstruktur der des Knochens tatsächlich ähneln, könnte dies die Grundlage zur Erforschung vieler möglicher Anwendungen der ELPs in Bezug auf Knochen bilden.

Ein weiterer interessanter Effekt, der sich während der Kultur von Mäuse-Osteoclasten auf ELP-Beschichtungen zeigte, war, dass bei einer gemeinsamen Inkubation von mit ELPs beschichteten Deckgläsern und einem Knochenplättchen, sich auf in dieser Weise behandelten Knochenstücken in einem Versuch weit mehr Osteoclasten gebildet hatten als auf den Knochenplättchen, die als Kontrollgruppe ohne den Zusatz von ELPs inkubiert worden waren. In einem weiteren Versuch konnte dieser Effekt zwar nicht wiederholt werden, jedoch wäre eine genauere Untersuchung dieses Effekts und eindeutige Hinweise, ob die ELPs einen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Osteoclasten haben, ein wünschenswertes Unterfangen. Es wäre denkbar, dass innerhalb der Zeit einer Kultur durch das wässrige Medium einige Bestandteile aus dem ELP gelöst worden wären, da die mechanische und hydrolytische Stabilität eines ELPs stark von der Primärstruktur des Proteinpolymers abhängig ist. (Rodriguez-Cabello 2005) Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete ELP besitzt keine spezifischen Aminosäure-Sequenzen, die von proteolytischen Enzymen erkannt werden sollten, dennoch ist es zumindest möglich, dass einzelne Aminosäuren aus dem Verband des

Proteinpolymers gelöst wurden. Allerdings bleibt noch zu klären, ob dies tatsächlich so ist und ob dies auch einen Effekt auf die Anzahl an Osteoclasten hat, die in der Co-Kultur gebildeten.

6.2 Ergebnisse in Kaninchenzellen

6.2.1 Osteoclasten

Die aus Kaninchen gewonnenen Osteoclasten waren zu Beginn der Kultur bereits reife Zellen, da in den wenigen Tagen alten Tieren durch das rasche Wachstum viele Umbauvorgänge am Skelett ablaufen und hierfür auch Osteoclasten benötigt werden. Die beobachteten Zellen zeigten zwar mehrere Kerne, jedoch waren kaum Aktinringe erkennbar, meist nur einzelne Podosomen, jedoch keine geschlossenen Ringe wie sie in den Versuchen mit Mäusezellen erhalten wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die im Unterschied zu den Experimenten mit Mäusen abgeänderte Handhabung der Präparate sein. Die Aussaat der Zellsuspension von Kaninchenosteoclasten erfolgte auf sterilem Material, das auf sterilem Parafilm lag, die von Knochenmarkszellen aus Mäusen hingegen direkt in den well-Platten, in denen zuvor bereits die Osteoblasten kultiviert worden waren. Durch diesen Umstand war die Gesamtmenge an Zellen je Präparat geringer als in den Co-Kulturen und auch die Menge an zur Verfügung stehendem Medium für die kritische Phase des Absetzens der Zellen war weitaus geringer, nämlich nicht 1,5 ml je Präparat, sondern nur 100 µl, was für eine Kultur etwas erschwerte Bedingungen darstellt. Wiewohl in früheren Experimenten des Labors auch diese Methode der Aussaat erfolgreich war und Zellen mit dichtem Aktinringen hervorgebracht hat, so zeigten die Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit dieser Methode Osteoclasten mit sehr lockeren Aktinringen, die meist nicht geschlossen waren und auf dem Großteil der beobachteten Zellen waren keine ausgebildeten Aktinringe zu sehen, sondern hauptsächlich einzeln stehende Aktinfasern, Podosomen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Reife der eingesetzten Osteoclasten, die auf das Probenmaterial aufgebracht werden, ebenfalls Einfluss auf die Morphologie der Zellen nimmt. Es wäre also denkbar,

dass reife Osteoclasten, wie sie in den Versuchen mit Kaninchen zum Einsatz kamen, mit einer ELP-Beschichtung weniger gut zurechtkommen als die Osteoclasten aus den Versuchen mit Knochenmarkszellen aus Mäusen, da diese erst in der Kultur direkt auf dem Material aus ihren Vorläuferzellen entstehen. Dies würde jedoch nicht erklären können, weshalb auch auf den zum Vergleich inkubierten unbeschichteten Deckgläsern keine geschlossenen Aktinringe beobachtet werden konnten, auf den Knochenplättchen, die ebenfalls als Kontrollgruppe dienten, hingegen sehr wohl. Möglicherweise wirken sich die etwas erschwerten Bedingungen durch geringere Zellzahl und weniger Kulturmedium auf den Deckgläsern und ELP-Beschichtungen stärker aus als auf Knochen, allerdings ist eine genaue Klärung der Hintergründe noch ausständig.

Abschließend lässt sich sagen, dass die ELP-Beschichtungen von den kultivierten Zellen gut vertragen wurden und somit für eine Anwendung auf dem Gebiet der Zellkultur geeignet scheinen. Der Prozess der Beschichtung ist recht langwierig und konnte in den bisher durchgeführten Experimenten keinen Vorteil gegenüber einer Kultur auf den handelsüblichen Zellkulturplatten zeigen, deren Polystyren-Oberfläche eine gute Grundlage für das Wachstum von Knochenzellen darstellt. Allerdings ergibt sich durch die Umkehrbarkeit der Verfestigung von ELPs die Möglichkeit, diese Beschichtung wieder aufzulösen, was genutzt werden könnte, um empfindliche Zellen schonend von der Oberfläche, auf der sie kultiviert wurden, wieder abzulösen. Sobald ELPs ihre Transitionstemperatur erreichen, verfestigen sie sich und erreichen die Konsistenz eines Hydrogels, doch bei Kühlung der Beschichtung unterhalb dieser Transitionstemperatur beginnt sich die verfestigte Konsistenz der Proteinpolymere wieder zu verflüssigen. Je nach den spezifischen Eigenschaften des verwendeten ELPs kann dies mit einer gewissen Verzögerung einhergehen, es kommt zu einem Hysteresis-Verhalten, das ein Absenken der Temperatur noch etwas weiter unterhalb des Wertes der Transitionstemperatur nötig machen könnte, doch die Umkehr der Verfestigung ist möglich. (Trabbic-Carlson, et al. 2003) Auf diese Weise wäre nach Abkühlen der Zellen auf der ELP-Beschichtung ein

Verflüssigen der ELPs machbar und die Oberfläche, auf der die Zellen verankert waren, wäre aufgelöst, sodass ein Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche ohne den Einsatz von Trypsin oder ähnlichen Enzymen möglich wäre. Derartige Methoden sind auch bereits erforscht worden, jedoch noch nicht mit ELPs als thermoresponsivem Material. (Kushida et al., 2005) Eine solche Methode müsste zwar noch genauer Testung unterzogen werden, doch die Möglichkeit bietet eine günstige Gelegenheit, deren Untersuchung wünschenswert wäre, da eine Zellernte ohne den Einsatz potentiell schädlicher Enzyme gewiss von Vorteil wäre.

7 Literaturverzeichnis

- Alhadlaq A, Mao J 2003 Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *Journal of dental research* **82**(12):951.
- Anderson J, Rodriguez A, Chang D 2008 Foreign body reaction to biomaterials, vol. 20. Elsevier, pp 86-100.
- Anselme K 2000 Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**(7):667-681.
- Aubin J, Lian J, Stein G 2006 Bone Formation: Maturation and Functional Activities of Osteoblast Lineage Cells. American Society for Bone and Mineral Research.
- Bessa P, Machado R, Nürnberger S, Dopler D, Banerjee A, Cunha A, Rodríguez-Cabello J, Redl H 2010 Thermoresponsive self-assembled elastin-based nanoparticles for delivery of BMPs. *Journal of controlled release* **142**(3):312-318.
- Chilkoti A, Dreher M, Meyer D 2002 Design of thermally responsive, recombinant polypeptide carriers for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **54**(8):1093-1111.
- Costa R, Custódio C, Testera A, Arias F, Rodríguez Cabello J, Alves N, Mano J 2009 Stimuli Responsive Thin Coatings Using Elastin Like Polymers for Biomedical Applications. *Advanced functional materials* **19**(20):3210-3218.
- Crueger W, Crueger A 1989 Substrate für die industrielle Fermentation Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Oldenbourg-Verlag, pp 56-59.
- Dempster D 2006 Anatomy and Functions of the Adult Skeleton. American Society for Bone and Mineral Research.
- Di Zio K, Tirrell D 2003 Mechanical properties of artificial protein matrices engineered for control of cell and tissue behavior. *Macromolecules* **36**(5):1553-1558.
- Dreher M, Raucher D, Balu N, Michael Colvin O, Ludeman S, Chilkoti A 2003 Evaluation of an elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate for cancer therapy. *Journal of controlled release* **91**(1-2):31-43.
- El-Amin S, Lu H, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan R, Laurencin C 2003 Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on

- biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* **24**(7):1213-1221.
- Gerstenfeld L, Einhorn T 2006 Fracture Healing: The Biology of Bone Repair and Regeneration. American Society for Bone and Mineral Research.
- Ghandehari H, Cappello J 1998 Genetic engineering of protein-based polymers: potential in controlled drug delivery. *Pharmaceutical research* **15**(6):813-815.
- Girotti A, Reguera J, Rodriguez-Cabello J, Arias F, Alonso M, Testera A 2004 Design and bioproduction of a recombinant multi (bio) functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15**(4):479-484.
- Herrero-Vanrell R, Rincon A, Alonso M, Reboto V, Molina-Martinez I, Rodriguez-Cabello J 2005 Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *Journal of controlled release* **102**(1):113-122.
- Ho C 2009 A review of contemporary materials in implantology. *Australian Dental Practice*.
- Huebsch N, Mooney D 2009 Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* **462**(7272):426-432.
- Hutmacher D 2000 Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**(24):2529-2543.
- Kushida A, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T 2005 A noninvasive transfer system for polarized renal tubule epithelial cell sheets using temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater* **10**:23-30.
- Lowman A, Morishita M, Kajita M, Nagai T, Peppas N 1999 Oral delivery of insulin using pH responsive complexation gels. *Journal of pharmaceutical sciences* **88**(9):933-937.
- Meyer D, Chilkoti A 2004 Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* **5**(3):846-851.
- Meyer D, Kong G, Dewhirst M, Zalutsky M, Chilkoti A 2001 Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia. *Cancer research* **61**(4):1548.

- Nagapudi K, Brinkman W, Leisen J, Thomas B, Wright E, Haller C, Wu X, Apkarian R, Conticello V, Chaikof E 2005a Protein-based thermoplastic elastomers. *Macromolecules* **38**(2):345-354.
- Nagapudi K, Brinkman W, Thomas B, Park J, Srinivasarao M, Wright E, Conticello V, Chaikof E 2005b Viscoelastic and mechanical behavior of recombinant protein elastomers. *Biomaterials* **26**(23):4695-4706.
- Oursler M, Bellido T 2003 Bone Cells, vol. 2011. American Society for Bone and Mineral Research.
- Puleo D, Nanci A 1999 Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* **20**(23-24):2311-2321.
- Ratner B, Bryant S 2004 Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**:41-75.
- Robey P, Boskey A 2006 Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone. American Society for Bone and Mineral Research.
- Rodriguez-Cabello C 2005 Developing functionality in elastin--like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach. *Progress in polymer science* **30**(11):1119-1145.
- Rodríguez-Cabello J, Martín L, Alonso M, Arias F, Testera A 2009 "Recombinamers" as advanced materials for the post-oil age. *Polymer* **50**(22):5159-5169.
- Ross F 2006 Osteoclast Biology and Bone Resorption. American Society for Bone and Mineral Research.
- Rubin C, Rubin J 2006 Biomechanics and Mechanobiology of Bone. American Society for Bone and Mineral Research.
- Salinas C, Anseth K 2008 The influence of the RGD peptide motif and its contextual presentation in PEG gels on human mesenchymal stem cell viability. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2**(5):296-304.
- Santavirta S, Böhler M, Harris W, Konttinen Y, Lappalainen R, Muratoglu O, Rieker C, Salzer M 2003 Alternative materials to improve total hip replacement tribology. *Acta orthopaedica Scandinavica* **74**(4):380-388.
- Schinke T, Karsenty G 2002 Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation and Function. In: John P. Bilezikian Lgr, Gideon A. Rodan (ed.) *Principles of Bone Biology*, vol. 1. Academic Press.

- Shoichet M 2009 Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules* **43**(2):581-591.
- Singh A, Sharma P, Garg V, Garg G 2010 Hydrogels: A Review.
- Swierczewska M, Hajicharalambous C, Janorkar A, Megeed Z, Yarmush M, Rajagopalan P 2008 Cellular response to nanoscale elastin-like polypeptide polyelectrolyte multilayers. *Acta Biomaterialia* **4**(4):827-837.
- Trabbic-Carlson K, Setton La, Chilkoti A 2003 Swelling and mechanical behaviors of chemically cross-linked hydrogels of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* **4**(3):572-580.
- Urry D, Haynes B, Zhang H, Harris R, Prasad K 1988 Mechanochemical coupling in synthetic polypeptides by modulation of an inverse temperature transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**(10):3407.
- Vaananen H, Laitala-Leinonen T 2008 Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**(2):132-138.
- Vagaska B, Bacakova L, Filova E, Balik K 2010 Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol. Res* **59**:309-322.
- Wright E, Conticello V 2002 Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences. *Advanced drug delivery reviews* **54**(8):1057-1073.
- Wright E, Mcmillan R, Cooper A, Apkarian R, Conticello V 2002 Thermoplastic elastomer hydrogels via self-assembly of an elastin-mimetic triblock polypeptide. *Advanced functional materials* **12**(2):149.

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen	Bezeichnung	Seite
Abbildung 1	Maus-OB auf einem unbeschichteten Deckglas	86
Abbildung 2	Maus-OB auf einem ELP-beschichteten Deckglas	87
Abbildung 3	Maus-OB auf einem Stück Rinderknochen	88
Abbildung 4	Maus-OB auf einem unbeschichteten Deckglas, abgebildet mit geringerer Vergrößerung	89
Abbildung 5	Maus-OB auf einem ELP-beschichteten Deckglas, abgebildet mit geringerer Vergrößerung	90
Abbildung 6	Maus-OC auf einem unbeschichteten Deckglas	95
Abbildung 7	Maus-OC auf einem Stück Rinderknochen	96
Abbildung 8	Maus-OC auf einem ELP-beschichteten Deckglas, verzweigt	97
Abbildung 9	Maus-OC auf einem unbeschichteten Deckglas, rundlich	98
Abbildung 10	Kaninchen-OC auf einem unbeschichteten Deckglas	100
Abbildung 11	Kaninchen-OC auf einem Stück Rinderknochen	101
Abbildung 12	Kaninchen-OC auf einem ELP-beschichteten Deckglas	102
Tabellen		
Tabelle 1	Ergebnisse des MTS-Tests	91
Tabelle 2	Ergebnisse des Protein-assay	93

9 Curriculum Vitae

Name: Corinna Nagelreiter

Geburtsdatum: 30.10.1987

Geburtsort: Wien

Schulbildung:

September 1994 – Juni 1998 Volksschule Diesterweggasse 30; 1140
Wien

September 1998 – Juni 2006 Realgymnasium Goethegymnasium;
Astgasse 3, 1140 Wien; Abschluss mit
ausgezeichnetem Erfolg am 9. Juni 2006

Studium:

September 2006 – heute Diplomstudium Pharmazie, Universität Wien