

**Enzymatische Funktionalisierung von Kollagen für medizinische
Anwendungen**

Laufzeit	01.10.2011 - 30.09.2013
Forschungs- stelle 1	Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen Freiberg/Sachsen e.V.-FILK Meißner Ring 1 - 5 D - 09599 Freiberg
Projektleitung	Dr. Michael Meyer Dr. Michaela Schröpfer
Forschungs- stelle 2	Ludwig-Maximilians Universität München Department Pharmazie Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Butenandtstr. 5 D - 81377 München
Projektleitung	Prof. Dr. Wolfgang Frieß Sarah Kuchler Madelaine Witting
Forschungs- stelle 3	Technische Universität Graz Institut für Umweltbiotechnologie Petersgasse 12/I A - 8010 Graz
Projektleitung	Prof. Dr. Georg Gübitz Matthias Pretzler
Forschungs- stelle 4	CenTexBel, Belgian Textile Research Centre Avenue du parc 38 BE - 4650 Herve (Chaineux)
Projektleitung	Dr. Gregory Nolens
Förderung	Deutsche Projekte: Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) über die AiF Arbeitsgemein- schaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. Förderkennzeichen: 58 EBG



Problemstellung/Zielsetzung

Kollagen erfreut sich als Biomaterial für Drug Delivery Systeme (DDS), Scaffolds für zelluläres Wachstum und Ausgangsmaterial für Tissue Engineering sehr großer Beliebtheit. Ein Nachteil von vielen kollagenbasierten Materialien für derartige Anwendungen ist jedoch die relativ geringe thermische und mechanische Stabilität, vor allem in feuchter oder wässriger Umgebung. Um diese Eigenschaften zu verbessern, wird Kollagen vernetzt. Die üblicherweise benutzten chemischen Vernetzer können aber toxisch wirken, wenn sie nicht vollständig aus dem Material entfernt werden können, und eine Freisetzung gebundener toxischer Bestandteile im Zuge des Verdauens wird diskutiert. Durch eine enzymkatalysierte Vernetzung von Kollagen könnten diese Probleme eliminiert werden. Es soll deshalb nach Enzymen gesucht werden, die in der Lage sind, Modifikationen oder Quervernetzungen an Kollagen zu induzieren.

Für ein gut funktionierendes Zellträgersystem mit definierter gesteuerter Aktivierung durch Wirkstoffe sind Matrices mit definierten Porenstrukturen notwendig. Solche porösen Vliese können durch z.B. durch Gefriertrocknung oder ggf. auch durch Elektrospinnen erzeugt werden. Im Projekt sollen daher unter anderem mittels Elektrospinnen kollagenbasierte nicht gewebte Nanostrukturen hergestellt werden, die allein durch die Porenarchitektur Zellwachstum steuern können.

Ein weiteres Ziel soll die enzymatisch katalysierte kovalente Ankopplung von zwei verschiedenen Wachstumsfaktoren an kollagenbasierte Materialien sein: VEGF als Wachstumsfaktor für endotheliales Zellwachstum und TGF β , das die Differenzierung von Fibroblasten stimuliert. Nach erfolgreicher Kopplung der Wachstumsfaktoren an Kollagenmatrices soll die Wirksamkeit in geeigneten Zellexperimenten getestet werden.

Sachstand

Erste Screening-Experimente zum Modifizierungs- und Quervernetzungspotential verschiedener Enzyme an Kollagen wurden durchgeführt. Getestet wurden verschiedene Oxidoreductasen wie Tyrosinasen, Laccasen, eine Alkoholdehydrogenase und eine Galactoseoxidase sowie in der Klasse der Transferasen eine ω -Transaminase. Zunächst wurde das katalytische Potential der Enzyme an säurelöslichem Kollagen mit folgenden Methoden überprüft:

- Bestimmung der Denaturierungstemperatur mittels DSC
- Bildung hochmolekularer Anteile oder Spaltprodukten mittels SDS-Page
- Abreagierte Aminosäuren mittels Aminosäureanalyse
- Photometrische Verfolgung der Tyrosinase-katalysierten Oxidationen am Tyrosin.

Für eine Pilz-Tyrosinase und eine Laccase aus dem Pilz *Trametes versicolor* konnte eine katalysierte Vernetzung nachgewiesen werden. Wurde das Enzym Galactoseoxidase in Gegenwart von Galactose verwendet, so wurde ebenfalls eine Vernetzung festgestellt. Die ω -Transaminase und die Alkoholdehydrogenase zeigten dagegen keinerlei Aktivität an Kollagen, die vier anderen Laccasen zeigten zwar eine vernetzende Aktivität, gleichzeitig wurden aber Spaltungen am Kollagenmolekül beobachtet.

Zur Aufklärung der Wirkung der Tyrosinase an säurelöslichem Kollagen wurden LC-MS-Experimente durchgeführt, die eine große Bandbreite an Kupplungsprodukten des durch die Tyrosinase modifizierten Tyrosins mit verschiedenen Aminosäuren zeigten. Dies wurde durch Modellreaktionen mit einem N-geschützten Tyrosinanalogen (N-Boc-L-Tyr) mit Tyrosinase und verschiedenen Aminosäuren bestätigt. Es konnten Kupplungsprodukte mit Valin, Serin, Isoleucin und Arginin gefunden werden.

Die ersten Versuche zur Ankopplung von fluoreszenzmarkiertem BSA (als Modellsubstanz) an säurelösliches Kollagen unter Einwirkung von Tyrosinase zeigten, dass eine Bindung des BSA an das Kollagen unter milden Reaktionsbedingungen prinzipiell möglich war. Die Anbindung wurde dabei mittels Größenausschlusschromatographie verfolgt. Die angekoppelte Menge war abhängig von pH-Wert und Enzymmenge, insgesamt jedoch noch relativ gering.

Für das Elektrosplennen wurde eine entsprechende Apparatur installiert und erste Versuche mit Mischungen aus Kollagendispersionen und Polyethylenglycol durchgeführt. Dabei wurden Strukturen mit sehr feinen Poren und Porenwänden erzeugt, die aber noch einen zu geringen Anteil an Kollagen enthielten.

Projektbezogene Veröffentlichungen

Küchler S, Erlewein N, Witting M, Friess W.

Enzymatic Functionalization of Collagen for Medical Applications

Poster bei der "Strategies in Tissue Engineering" Conference, 23.-25. Mai 2012, Würzburg