

Mossellijm

*Zeemossel als model
voor medische lijm*

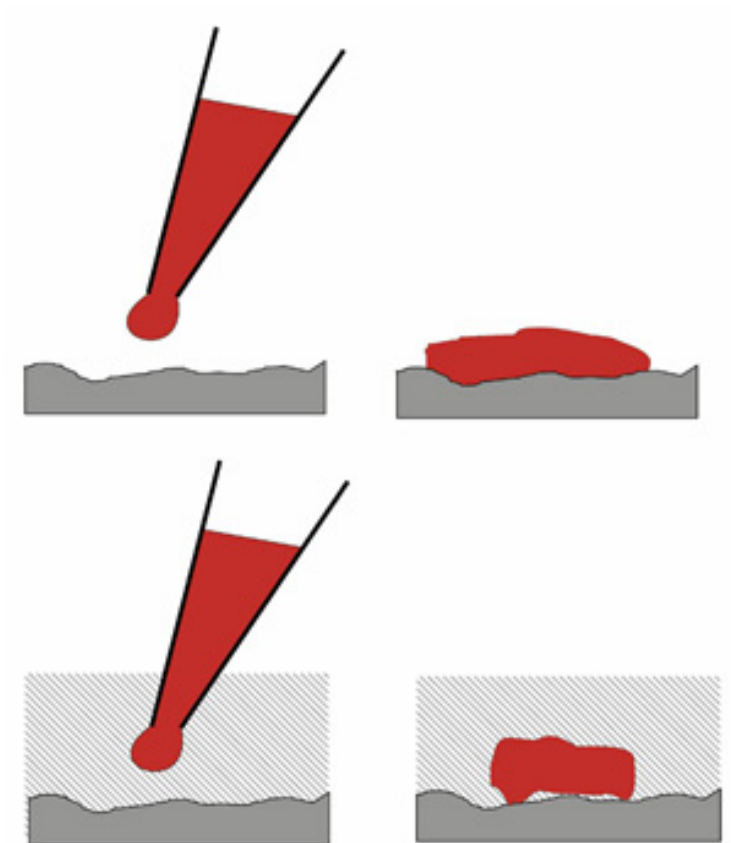




maarten van der sanden

De middelen om de mens weer op te lappen na een ongeluk of operatie worden steeds geavanceerder. Schroeven, pinnen, kunstgewrichten, bio-oplosbare hechtdraad, het hoort allemaal thuis in het arsenaal van de chirurg. Ook «eenvoudig» lijmen behoort tot de mogelijkheden. Op dit moment bestaat er alleen lijm die geschikt is voor het plakken van de buitenkant. Fysisch chemici dr. Mieke van der Leeden en ir. Sander Haemers, van de vakgroep Fysische Chemie,

De blauwe mossel *Mytilus Edulis* zoals die in Nederland wordt gevonden. Mosselen leven in voedselrijke getijden gebieden. Om bij vloed niet op het strand te spoelen of bij eb te worden meegesleurd in zee, hechten ze zich met draden aan vaste objecten, zoals palen en basaltblokken.



*faculteit
Technische
Natuurwetenschappen
en het
Hechtingsinstituut
van de tu delft,
ontwikkelen met
financiering van
STW een
synthetische
medische lijm die
ook inwendig kan
worden gebruikt.
Een lijm naar een
idee van de
blauwe zeemossel.*

'Botsplinters kunnen «plakken» is een veel gehoorde wens in de medische wereld', zegt Van der Leeden. 'Botsplinters van een verbrijzeld been kunnen op dit moment niet meer worden teruggeplaatst. Het enige dat rest is vlakschuren en dat kan leiden tot ontstekingsreacties.' Lijmen zou volgens medici een hele goede optie zijn. Ook het lijmen van inwendige kwetsuren of wonden na een operatie zou uitkomst bieden.

'Bij hechten van een inwendige wond kan er ook nog wel eens een lekkage ontstaan', zegt Van der Leeden. 'Lijmen, of de combinatie lijmen en hechten, verlaagt het risico op lekken.'

De huidige meest toegepaste medische lijmen zijn net als hobbylijmen gebaseerd op cyano-acrylaat. Dat is goed te gebruiken als lijm voor de huid bij snijwonden, maar inwendig leidt dat tot ontstekingen en andere problemen.' Bovendien moet je voor inwendig gebruik een lijm hebben die biologisch afbreekbaar en biocompatibel is', zegt chemicus Haemers.

Byssusdraden

Gelukkig zijn er mensen die goed om zich heen kijken. De natuur

Het aanbrengen van een dot lijm op een substraat in een droge omgeving is vrij makkelijk, maar wanneer het substraat zich onder water bevindt, lukt dat niet meer omdat water zich niet zo makkelijk door de lijm van het oppervlak laat verdringen.



De firma Johnson & Johnson brengt al een huidlijm op de markt onder de naam DERMABOND, Het actieve component van het product is octylacryaanacrylaat. Links wordt het gebruikt om een zogenaamde drain in een wond op zijn plek te houden. Bij de plastisch chirurgie wordt de huid direct na de ingreep dichtgelijmd.

heeft namelijk al een oplossing voor het probleem: plakken in een waterige en zoute oplossing. De blauwe zeemossel, *Mytilus edulis*, hecht zich zeer sterk aan tal van objecten die in het zeewater liggen, drijven of staan. In zeehavens bijvoorbeeld hangen hele trossen mosselen aan meerpalen. De mossel is een schelpdier dat zich vooral ophoudt in de getijdengebieden van de zee.

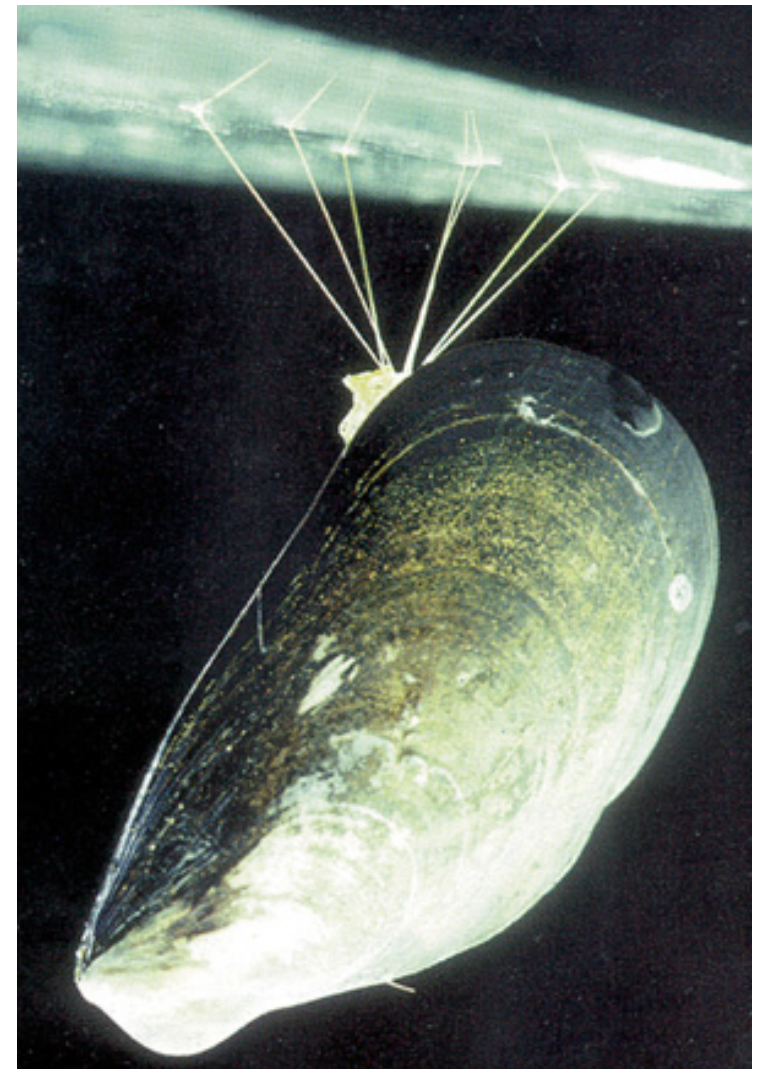
De mossel kan zich in deze turbulente omgeving handhaven door gebruik te maken van zogenaemde byssusdraden. Het schelpdier kan zich hiermee vasthechten aan bijvoorbeeld een meerpaal of een steen. Van der Leeden: 'Nu, deze byssusdraden, en eigenlijk het dotje lijm waarmee ze vastzitten aan een ondergrond (meerpaal of steen) is de sleutel tot een medische lijm voor inwendig gebruik. Het is een lijm met een goede hechtsterkte op een glad oppervlak in een zout en waterig milieu. De kracht van deze mosselijm en zijn fysische eigenschappen is precies wat medici nodig hebben.'

Wanneer de mossel zich bijvoorbeeld aan de meerpaal hecht, gebeurt het volgende. De mosselvoet, een donkerbruin boonvormig orgaan, komt uit de mossel, tast de ondergrond af, hecht zich vast, er ontstaat een eiwitdraad in het voetje die in eerste instantie naar de mossel toe groeit, de mossel laat los en hangt dus nu aan zijn eigen draad. Vervolgens zoekt het voetje weer het substraat om een tweede draad te maken, etc.

'Het maken van die draad door het voetje is eigenlijk een soort van spuitgietproces', vertelt Haemers. 'Je kunt het vergelijken met een pvc-buis met daaraan vast de verschillende injectienaalden die hun inhoud in de holte van de buis leegspuiten. Waarbij het uiteinde van de buis op het te lijmen oppervlak staat.'

De verschillende eiwitten zorgen voor de verschillende stappen in het aanhechten en de groei van de byssusdraad. Zo bestaan er eiwitten die het te lijmen oppervlak voorbehandelen, eiwitten die de lijm vormen en weer andere de byssusdraad. Een apart eiwit zorgt voor het «coaten» van de byssusdraad om deze te beschermen tegen afbraak door bacteriën. De eiwitten zijn in het geval van de zeemossel genummerd van 1 tot en met 5.

'Het eerste eiwit, Mefp-1, is ontdekt in 1981', zegt Haemers. Mefp staat voor *Mytilus edulis* foot protein.



Mossel in een zogenaamde hangcultuur, een van manieren waarop mosselen worden gekweekt. De byssusdraden zijn duidelijk zichtbaar.

Golgi-apparaat

De mossel maakt de lijm dus in verschillende stappen aan. Haemers: 'In de mossel wordt de lijm nog niet geactiveerd, pas op het moment dat het nodig is, krijgen de eiwitten die plakkende eigenschappen.' De eiwitten worden aangemaakt in het zogenaamde Golgi-apparaat van de cellen in de klieren van de mossel. Het Golgi-apparaat is een blaasjesstructuur in het cytoplasma van de cel dat in staat is de verschillende stoffen aan te maken.

'Wij denken dat het intern milieu van deze blaasjes zuur is, dus een lage pH-waarde heeft, waardoor het eiwit inactief blijft', zegt Haemers. 'Pas in combinatie met een hogere pH en de aanwezigheid van zuurstof (O₂) wordt het een plakkerige substantie.'

Het aanhechtingsproces van de mossel bestaat volgens de Delftse onderzoekers uit drie fasen:

- o fase 1 is de voorbehandeling van het oppervlak van het substraat;
- o fase 2 is het vormen van een dotje lijm waaruit de byssusdraad kan worden gevormd;
- o bij fase 3 is het moment waarop de mossel loslaat en de zojuist gevormde draadsubstraat en mossel met elkaar verbindt.

Van der Leeden en Haemers hebben vooral onderzoek gedaan naar fase 2.

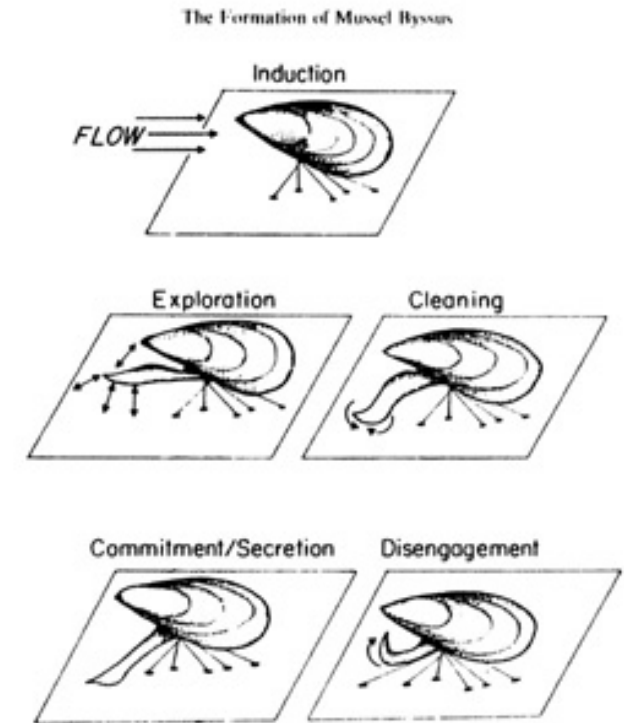
Fysica

De Delftse onderzoekers hebben gekeken naar de biologische fysica van de mosselijm. Haemers, die in 2002 hoopt te promoveren, heeft er zijn promotie-onderzoek aan gewijd.

'De biologische statica begrepen we wel, maar de fysica nog niet', zegt Haemers. 'We hebben vooral gekeken hoe de eiwitten zich aan het oppervlak hechten. Hoe zit die plaklaag vast aan het oppervlak?'

In wezen ging het de Delftse onderzoekers om de vraag wat de fysische eigenschappen en condities van het proces van hechten zijn. Hoe vindt bijvoorbeeld de cross-linking tussen de verschillende eiwitten plaats? Wat voor soort structuur ontstaat er?

'Dat soort zaken moet je weten als je deze biolijm wilt gaan gebruiken voor medische toepassingen', stelt van der Leeden. 'We



Wanneer een mossel zich op een bepaalde plaats wilt vasthechten, wordt het oppervlak eerst met de mosselvoet afgetast. Daarna zet de voet zich vast voor een periode van 1 tot 5 minuten, waarin een draad vanaf het oppervlak naar de mossel wordt gemaakt. De samenstelling van de lijm, waarmee het oersterke draadje onderwater aan het oppervlak wordt gelijmd, werd de focus van het onderzoek bij de sectie Fysische Chemie van de TU Delft, omdat de condities in het menselijk lichaam en van zeewater enigszins vergelijkbaar zijn.

hebben de eiwitten onderzocht die het meest interessant waren. We boden deze een hydrofiel model-oppervlak aan en keken hoe en waarom dit bindt.'

Haemers en Van der Leeden hebben vooral gekeken naar het Mefp-1 eiwit. Het eiwit zelf is heel eenvoudig. Het is een vrij lang molecuul zonder allerlei ingewikkelde 3D-structuren die ontstaan door waterstofbruggen tussen de verschillende groepen in het eiwitmolecuul. Het eiwit ziet eruit als een kluwen voordat het het substraat bereikt. Bovendien was dit eiwit het best gekarakteriseerd en verder is dit het enige mosseleiwit met een hoog molecuulgewicht, een essentiële eigenschap van een lijmstof.

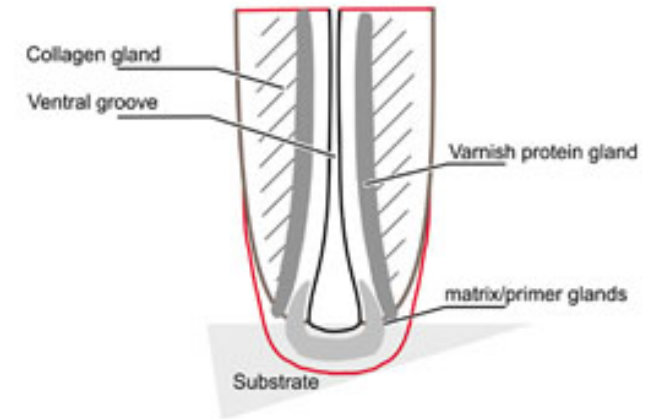
Haemers: 'Nadat het eiwit aan het oppervlak vastzit kan het zich uitstrekken. Als het eiwit niet aan het oppervlak kan hechten, blijft het eiwit een kluwen. Als het eiwit echter uitstrekt, blijven er wel lussen boven het oppervlak uitsteken, welke aangrijpingspunten vormen in de structuur van het eiwit. Die zijn nodig om een volgend eiwit zich daaraan te laten hechten zodat een structuur, het dotje, kan worden opgebouwd.'

Waterverdringen

Het Mefp-1 eiwit moet een sterkere interactie met het oppervlak van het substraat aangaan dan water kan. Het moet als het ware het water kunnen verdringen.

Haemers: 'Als je onder water zou moeten lijmen, weet je uit ervaring dat lijm een hele mooie parel vormt. Het kost veel energie om die parelstructuur op te heffen. De Mefp-1-component van mosselijm heeft dat opgelost door het inzetten van DOPA-groepen, dat is het aminozuur tyrosine met een extra OH-groep. Ook geladen lysine-groepen in het eiwit spelen een belangrijke rol. De DOPA-groepen kunnen heel sterk binden aan metaal-ionen in het oppervlak. Het zijn een soort contactpunten waaraan je een hele draadstructuur zou kunnen ophangen. De mossel heeft het op deze manier slim aangepakt, omdat hij dan maar op het niveau van één atoom het water hoeft te verdringen van het substraat. Hoe dat nu precies in zijn werk gaat weten we nog niet.'

Ook de positief geladen lysine-groepen in het eiwit dragen bij tot de



Doorsnede van de mosselvoet met verschillende klieren voor het maken van diverse componenten, zoals het draad en de lijmverbinding.

binding een het substraat. Volgens Haemers komt dat omdat de meeste oppervlakken in zeewater negatief geladen zijn.

Dat de mosselijm goed plakt, hebben de Delftse onderzoekers gemerkt aan het schoonmaken van het glaswerk.

Haemers: 'Aan het glasoppervlak zitten altijd wel metaal-ionen. Het gevolg is dat je met een sterk basische oplossing een hele nacht moet spoelen om het mossel-lijmlaagje er weer af te krijgen. Dat zijn dus hele sterke krachten. Interessant om te weten is dat het eiwit op bijvoorbeeld een supergladde Teflon-laag zich niet kan uitstrekken en een kluwen zal blijven.'

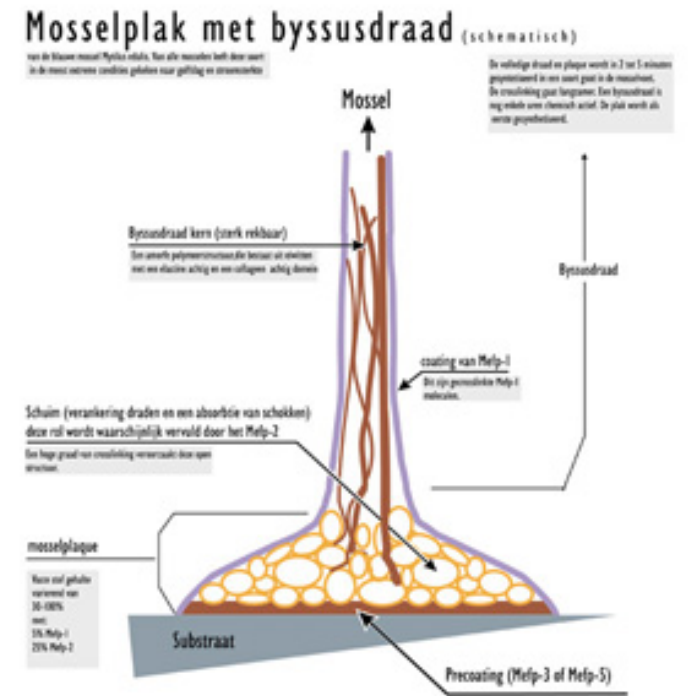
Lichtverstrooiing

Haemers heeft vooral in vitro onderzoek gedaan naar de verschillende condities waaronder de lijm zijn plakkende werking heeft. Hij maakt hierbij onder meer gebruik van zogeheten lichtverstrooiing. Deze methode wordt Photon Correlation Spectroscopy (PCS) genoemd. PCS is gebaseerd op het meten van de Brownse-beweging van deeltjes. Hoe kleiner de deeltjes hoe sneller zij bewegen. Monochromatisch laserlicht wordt verstrooid door een verzameling van deeltjes, de intensiteit van het licht dat wordt gemeten zal verschillen in de tijd. Uit de frequentie van de fluctuaties in de intensiteit van het licht kan de diffusie-coëfficiënt van de deeltjes worden afgeleid. Een enorme afname in de diffusie-coëfficiënt betekent dat er in de oplossing deeltjes aan elkaar plakken.

De Delftse onderzoekers gebruiken ook een andere techniek waarbij kleine veranderingen in de brekingsindex boven een oppervlak worden gemeten, deze techniek heet Surface Plasmon Resonance (spr). Daarmee kunnen ze zien hoeveel en hoe snel eiwitten aan een oppervlak hechten.

Haemers en Van der Leeden hebben door middel van deze experimenten ook aangetoond dat er een aantal condities is dat voor de plakeigenschappen van het Mefp-1 van groot belang is. Deze condities hebben met name grote invloed op de structuur van de lijmlaag. De bepalende factoren zijn: concentratie van het eiwit (Mefp-1), concentratie zuurstof (O₂) en de zuurgraad (pH).

Haemers: 'Als je één van die drie factoren niet goed controleert,



Schematische weergave van de mosselplak met byssusdraad.

schieten je lijmresultaten alle kanten op.'

De onderzoekers betrokken de mosseleiwitten voor de experimenten van Biopolymer Products uit Zweden.

Van der Leeden: 'Het probleem bij het opzuiveren van het eiwit uit de mossel is het feit dat het natuurlijk ook goed blijft plakken op de kolommen die worden gebruikt in het scheidingsproces.'

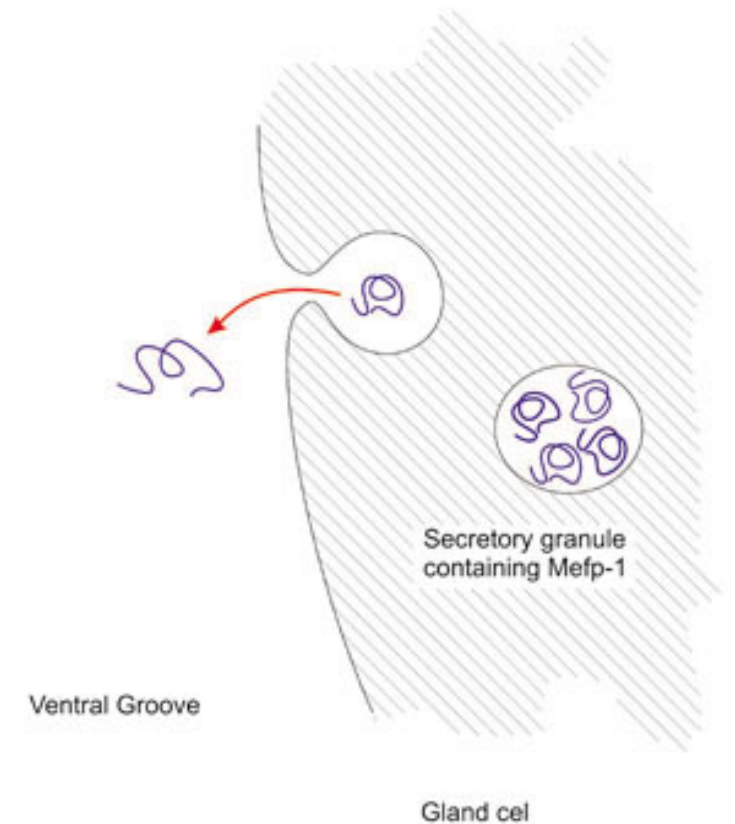
Hoewel de onderzoekers die erover gepubliceerd hebben precies uitleggen hoe het moet is het slechts weinigen gelukt het proces na te bootsen. 'Het gaat om goed vingergevoel en het gebruik van precies het goede kolommateriaal.'

Reactiemechanisme

Haemers: 'In de literatuur kwamen wij nogal wat uitspraken tegen die niet klopten met onze experimentele resultaten. Op de eerste plaats beschreef men dat het ontstaan van aggregaten van eiwitten een kwestie was van uren, maar wij ontdekten dat de eiwitten aan elkaar plakten binnen enkele minuten. Daarnaast hebben ons inziens wetenschappers zich tien jaar vast gebeten op het verkeerde reactiemechanisme. Men dacht dat zogenaamde geoxideerde DOPA-groepen in het eiwit zouden reageren (cross-linken) met lysine-groepen in hetzelfde eiwit. Maar lysine-groepen kunnen pas reageren met geoxideerd DOPA als ze niet geprotoneerd zijn, dat wil zeggen wanneer er geen H⁺-ion aan het N-atoom zit. Bij een zuurgraad van pH 8, zoals in zeewater, is dat slechts het geval voor één procent van de lysine-groepen. Onze resultaten lieten snelle cross-linking zien die nooit kon worden verklaard met het in de literatuur beschreven reactiemechanisme. Nadat we onze resultaten hadden ingestuurd voor publicatie in een wetenschappelijk tijdschrift ontdekten we dat andere onderzoeksgroepen tot eenzelfde conclusie waren gekomen. Men denkt nu, net als wij, dat het DOPA oxideert en terugreageert naar nog niet-geoxideerde DOPA.'

De Delftse onderzoekers hebben deze reactiestappen aannemelijk gemaakt door al het zuurstof te vervangen door een oxidator (jodide) waarvan ze nauwkeurig de concentratie konden regelen. Bij hele lage concentraties oxidator vindt dan geen crosslinking plaats.

Eén van de punten die ook een rol speelt, is het feit dat de structuur



Detail-uitsnede van de ventrale holte van de byssusvoet met daarin de opslag en secretie van de hechtende eiwitten. Opvallend is dat eiwitten in de granule (Golgi-systeem) niet met elkaar verkleven, maar na uitscheiding gebeurt dat wel.

van de eiwitten die gecrosslinked zijn heel ijl blijft; er blijven holten bestaan tussen de eiwitten.

Haemers: 'Dat is natuurlijk heel slim van de mossel, je kunt niet al het water verdringen, dat kost te veel energie. Nee, je laat je vasthechten aan een punt, bouwt vervolgens een ijle structuur en sluit het water gewoon in. If you can't beat them, join them!' Dat is één van de mosselideeën die de onderzoekers graag willen meenemen in een vervolgonderzoek.

Japan

Het promotie-onderzoek van Haemers was de eerste fase van de twee fasen van het onderzoeksproject. De volgende fase is een ontwikkelfase voor het maken van een synthetische lijm naar een idee van de lijm van de blauwe zeemossel. Van der Leeden: 'Nu we de condities kennen van de lijm, de structuur en de manier waarop het vastplakt aan het oppervlak, komen we stappen dichterbij bij het maken van een synthetische vorm hiervan. We zijn van plan binnenkort een vervolgvorstel in te dienen bij STW.'

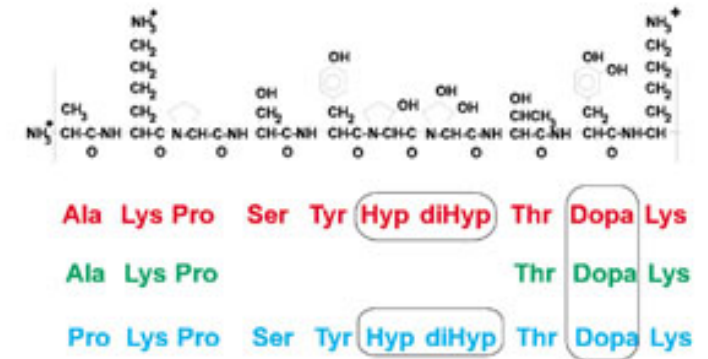
Het onttrekken van het eiwit aan de mossel is ondoenlijk. Er zijn problemen met het opzuiveren en bovendien zou de medische lijm ook veel te duur worden.

Haemers: 'Biotechnologisch is het ook niet eenvoudig om het eiwit na te maken. Na overschrijving (transcriptie en translatie) van het dna wordt het eiwit door de mossel nog gemodificeerd (er worden extra OH-groepen geïntroduceerd). Tevens zijn kunstmatige eiwitten veel korter dan de natuurlijke tegenhanger; een rechtstreeks gevolg van de structuur van het eiwit.'

Een Japanse onderzoeksgroep heeft geprobeerd het eiwit organisch synthetisch te maken. Die gebruikte hiervoor een vorm van een eiwit met alleen maar DOPA en Lysine.

Volgens Van der Leeden is het probleem echter dat een dergelijk molecuul wel waterstofbruggen vormt waardoor er een ingewikkelde 3D-structuren kunnen ontstaan wat de toepassing nog gecompliceerder maakt. De machinerie van de mossel helemaal namaken is niet nodig of zelfs niet gewenst.

Haemers: 'De mate van complexiteit van het synthetische eiwit is



Het mossel-eiwit is bijzonder, omdat het voor een groot deel is opgebouwd uit tien zich in volgorde herhalende animozuren (blauw en rood). De groene reeks bestaat uit maar zes animozuren. De omcirkelde animozuren Hyp, diHyp en DOPA worden na transcriptie van het DNA door de mossel voorzien van extra OH-groepen, waardoor het eiwit beter oplosbaar is in water.

omgekeerd evenredig met de hoeveelheid die je kunt maken.'

De Delftse onderzoekers hebben nog een groot aantal stappen te gaan, maar de weg ligt open voor een lijm die toepasbaar is om bijvoorbeeld complexe breuken te lijmen.

Van der Leeden: 'Sander is erin geslaagd enkele losse eindjes van ander onderzoek aan elkaar te knopen. Het gaat om een combinatie van biochemie en fysische chemie. En ja, een synthetische lijm zal niet eenvoudig zijn, maar het is zeker haalbaar. En gezien de problemen waar men nu medisch mee heeft te kampen, moeten we deze stappen nu ook echt zetten.'

Voor nadere informatie over dit onderwerp kunt u contact opnemen met

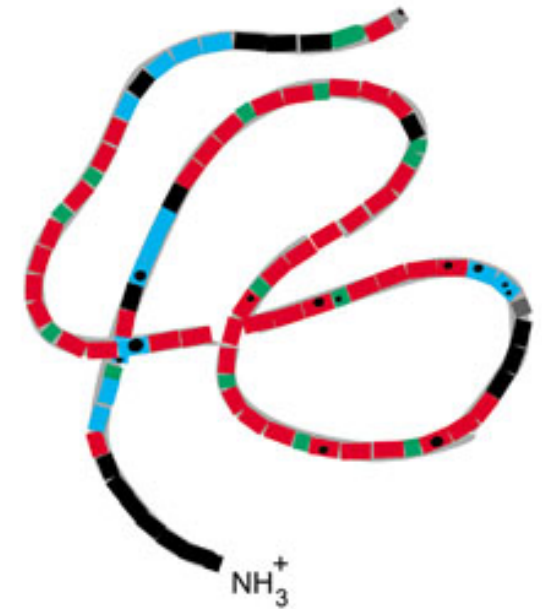
ir. Sander Heamers, tel.: (015) 278 2638,

e-mail: s.haemers@tnw.tudelft.nl

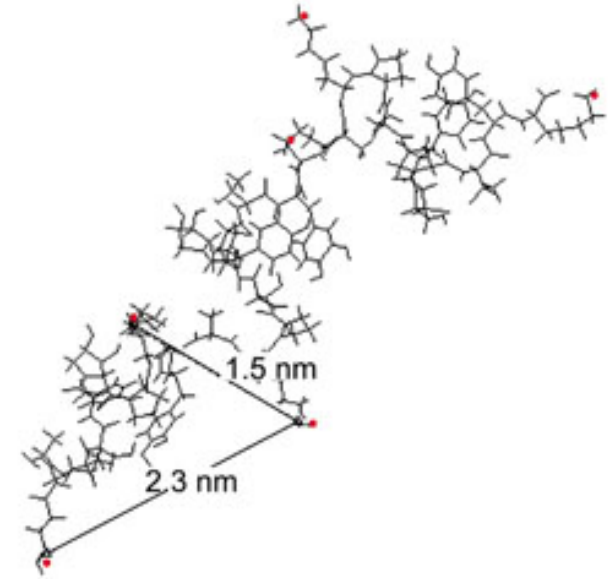
of met:

dr. Mieke C. van der Leeden, tel.: (015) 278 2636,

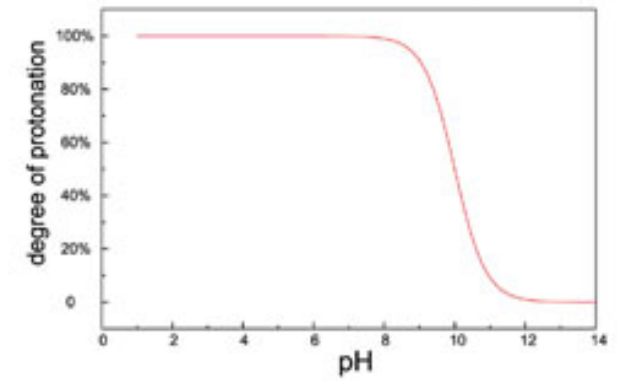
e-mail: m.c.vanderleeden@tnw.tudelft.nl



De lokatie van de belangrijkste reeksen (blauw en rood en groen) in de keten van het mosselhechtende eiwit. De getekende vorm hier is echter fictief, het eiwit heeft namelijk geen vaste vorm (secondaire structuur).



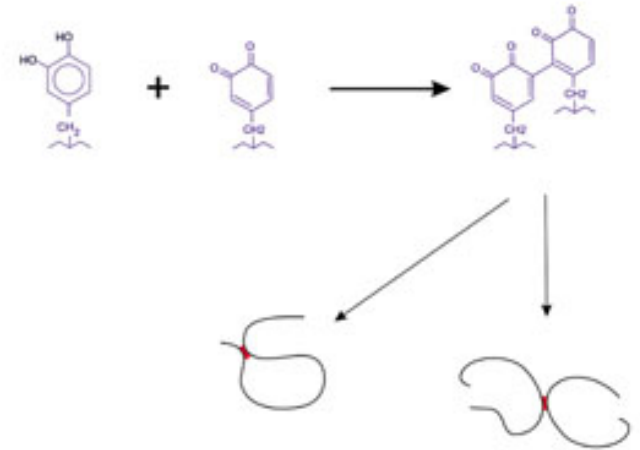
Ruimtelijke structuur van drie van de tachtig bouwstenen van het Mefp-1-eiwit (*Mytilus Edulis* foot protein-1). De pijlen geven de afstanden weer tussen de geladen lysine-groepen (LYS) in het eiwit. De afstanden zijn belangrijk om te bepalen of de positieve ladingen van de lysine-groepen elkaar beïnvloeden. Dit is belangrijk om het protonatiegedrag te kunnen voorspellen.



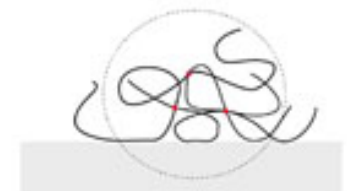
Het voorspelde protonatiegedrag als functie van de zuurgraad.



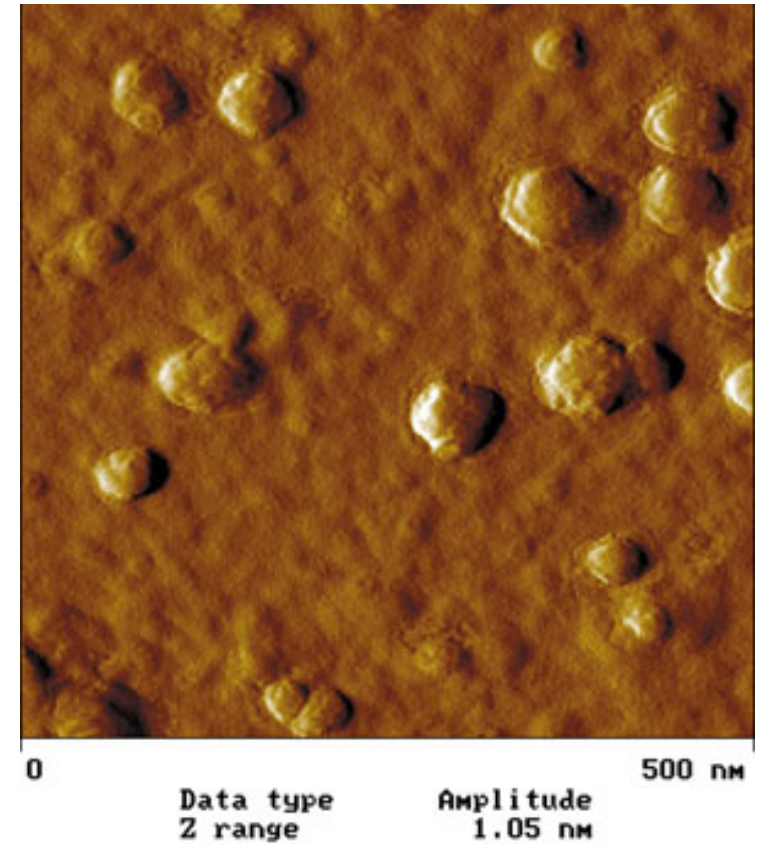
Typische manier waarop een (lineair) ketenmolecuul zich bij adsorptie aan een oppervlak hecht. In de cirkel is hetzelfde molecuul in oplossing.



De DOPA-groep kan in geoxideerde en niet-geoxideerde vorm bestaan. Beide vormen kunnen met elkaar reageren. Wanneer dat gebeurt, kan het leiden tot het vormen van zogenaamde cross-links, waarbij verschillende ketens aan elkaar worden gekoppeld of een keten aan een deel van zichzelf wordt gekoppeld. Een belangrijk gevolg hiervan is dat de structuur verandert van een lineaire naar een vertakte vorm.



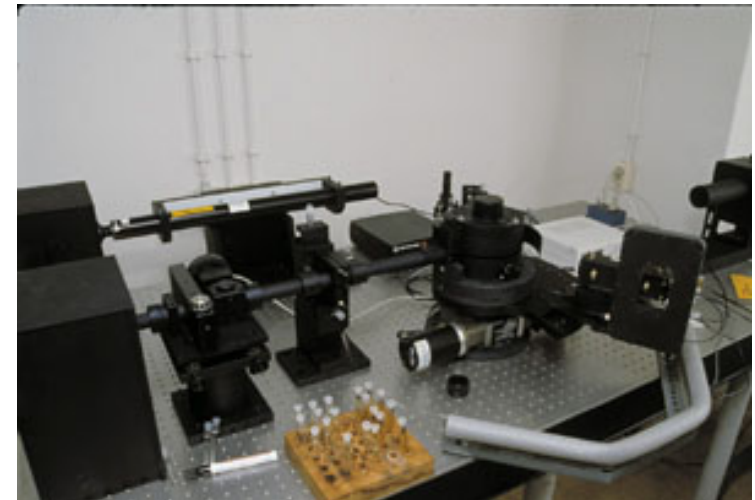
Typische manier waarop een vertakt ketenmolecuul zich bij adsorptie aan een oppervlak hecht. Ook hier is in de cirkel hetzelfde molecuul in oplossing weergegeven.



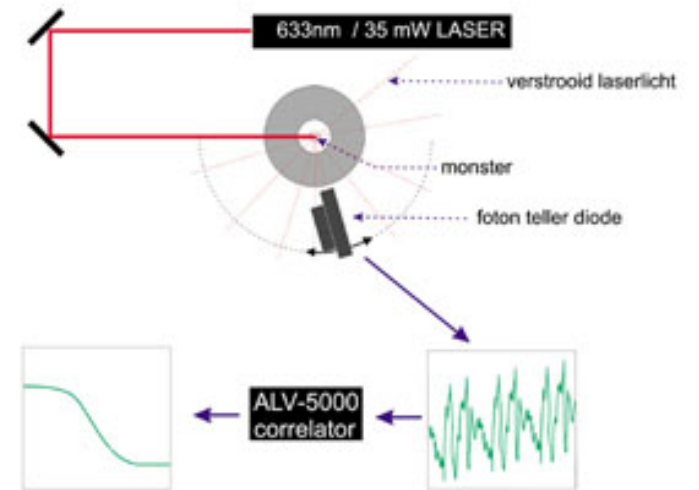
Opname met een zogenaamde Atomic-Force-microscopie van op glas geadsorbeerde, door crosslinking vertakte mossel-eiwitketens. Opvallend is dat de moleculen zich door de vertakking niet meer op het oppervlak kunnen strekken, maar de bolvorm behouden die ze ook hebben wanneer ze in oplossing zijn.



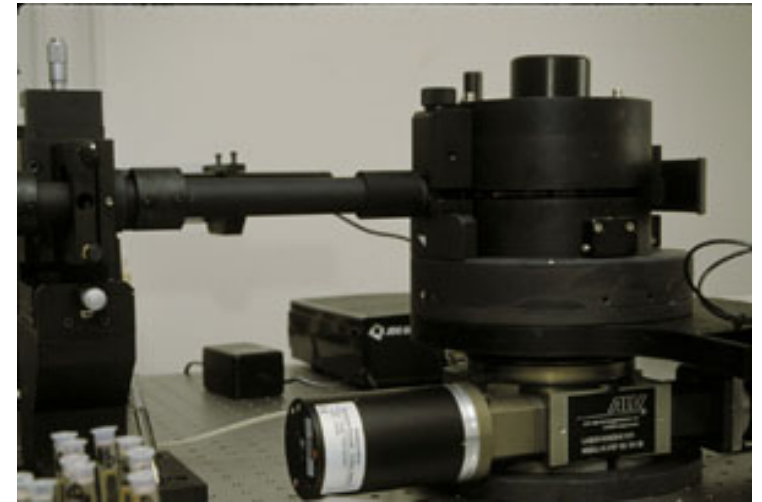
Drie effecten van cross-linken op de structuur van geadsorbeerde mossel-eiwitten: A) de lineaire, gestrekte keten (zonder cross-links, dus geen effect), B) het effect van de gevormde vertakkingen (zie boven), C) cross-links kunnen er toe leiden dat twee eiwitten bovenop elkaar vastkoppelen, en D) wanneer cross-links zich vormen na adsorptie kunnen ze de structuur plattrekken.



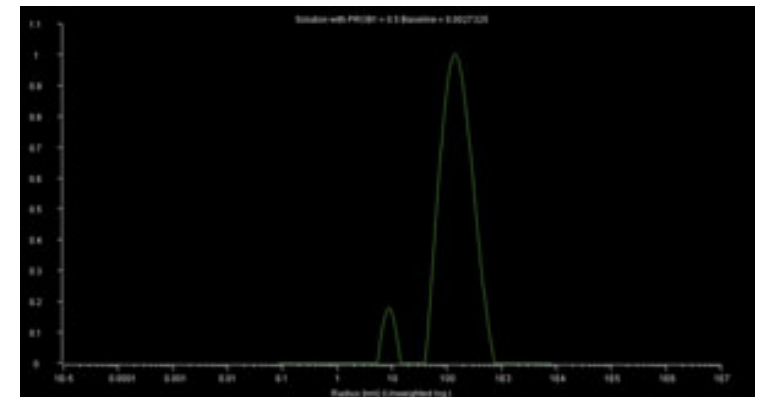
Om het gedrag van mossel-eiwitten in oplossing te bestuderen, wordt een lichtverstrooiings-opstelling gebruikt. Daarbij wordt het monster beschenen door een laser. De behuizing uiterst rechts bevat een spiegel en wordt gebruikt voor het uitlijnen van de laserbundel.



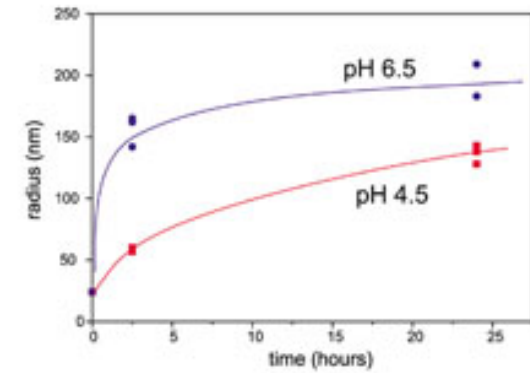
Schematische weergave van de opstelling voor meten van lichtverstrooiing met een helium-neon-laser. Een diode meet het aantal fotonen per seconden dat op het monster verstrooit. Uit de fluctuaties van de stroom fotonen kan een zogenaamde correlatie-plot worden gemaakt. De helling van de curve representeert de grootte van de deeltjes in oplossing en is (kort door de bocht) een mate voor de verkleiving.



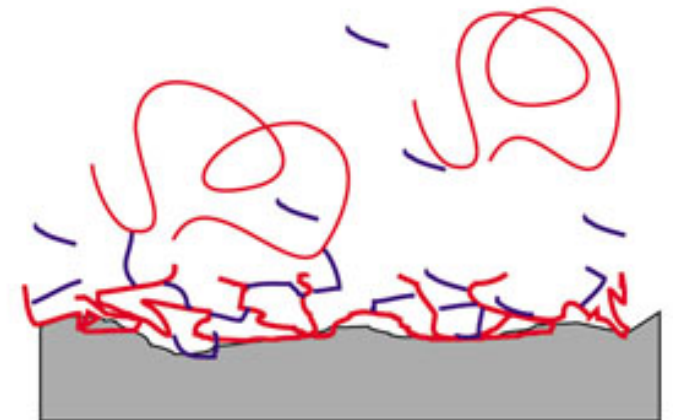
Bovenin het monsterhuis is een reageerbuis met het mossel-eiwit geplaatst. De laser schijnt door de oplossing en de daarin opgeloste deeltjes verstrooien de bundel. In de huidige opzet wordt de intensiteit van het verstrooide licht gemeten als functie van de tijd, bij een specifieke temperatuur.



De deeltjesgrootteverdeling van mossel-eiwitten in oplossing. Door verkleefing hebben zich deeltjes van 100 nm grootte gevormd. De kleine piek geeft de niet-verkleefde oorspronkelijke eiwitten met een grootte van ongeveer 10 nm weer.



De toename van de deeltjesgrootte als gevolg van cross-linking en bij twee verschillende zuurgraden. Uit de curves is duidelijk zichtbaar dat de verkleving bij een lagere pH-waarde langzamer verloopt.



Op basis van voorgaande studie vermoedt Sander Haemers dat de lijmlaag wordt opgebouwd uit een mix van grote en kleine mossel-eiwitten, waarbij de kleine eiwitten extra bruggen vormen tussen de grote eiwitten.



Het resultaat is een structuur die niet zozeer het water heeft verdrongen, maar heeft opgenomen in een soort open structuur. Zie ook de afbeelding van de mosselplak.

