

Regenerative Medizin

Designte Spinnenseidenmaterialien für zellspezifische Interaktionen

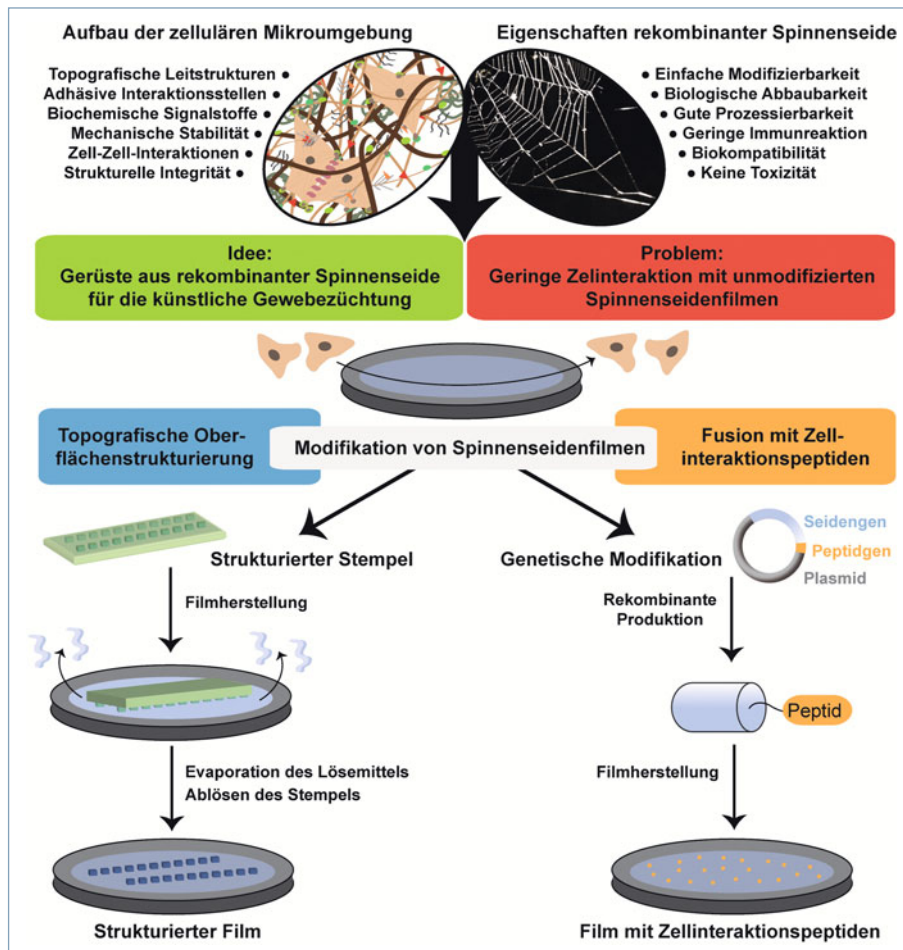
VANESSA T. TROSSMANN, THOMAS SCHEIBEL
LEHRSTUHL BIOMATERIALIEN, UNIVERSITÄT BAYREUTH

Spider silk films are promising for regenerative medicine and tissue engineering due to their biocompatibility. However, without modifications spider silk films often interact little with cells. Thus, we developed two modification strategies to enhance and guide specific cell interaction: 1) We introduced topographical surface patterns as cellular anchoring points. 2) We fused short cell adhesive peptide sequences to spider silk providing chemical interaction sites for cell receptors.

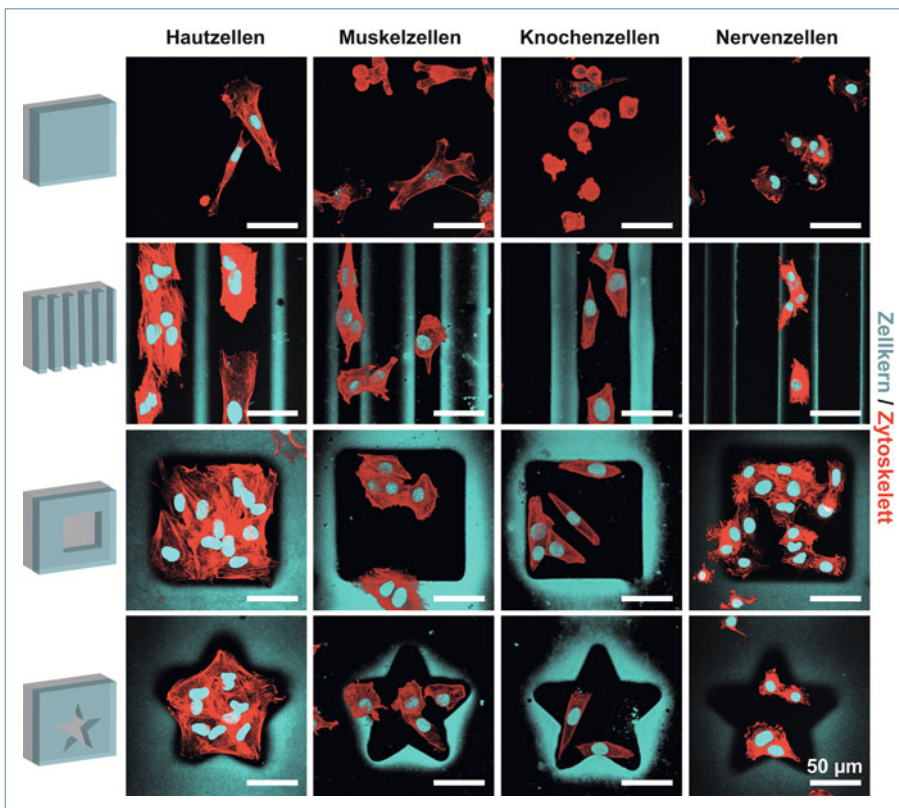
DOI: 10.1007/s12268-023-2026-4
© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Zellen sind in Geweben in eine charakteristische, komplexe, dreidimensionale (3D) Mikroumgebung integriert, die sich aus der extrazellulären Matrix (EZM), Nachbarzellen

und Signalmolekülen zusammensetzt [1]. Diese dynamische Mikroumgebung liefert den Zellen topografische, chemische und mechanische Trigger, die entscheidend für zelluläre Antworten und Funktionen sind [1, 2]. Dabei bietet die EZM den Zellen ein stabilisierendes und stimulierendes Gerüst mit Regulatoren, wie biochemische Interaktionsstellen, strukturelle Integrität sowie mechanische Stabilität, und übernimmt entscheidende Funktionen beim Aufbau und der Regeneration von Geweben [2, 3]. Nach Verletzungen und Gewebeschädigungen werden verschiedene Wundheilungs- und Regenerationsprozesse in der EZM aktiviert, um verlorene Funktionen wieder vollständig herzustellen [4, 5]. Daher befasst sich ein Forschungsbereich der regenerativen Gewebzüchtung (Tissue Engineering) mit der Entwicklung künstlicher Matrixmaterialien für Zellen [1, 6]. Da viele Biomaterialien die Adhäsion und das Wachstum von Zellen nicht ausreichend fördern, müssen sie für die Gewebzüchtung durch Oberflächenanpassungen und Beschichtungen modifiziert werden [1, 6–10]. Einerseits können Materialoberflächen mit topografischen Merkmalen, wie Rillen, modifiziert werden [11, 12]. Andererseits können zelladhäsive Peptidsequenzen aus EZM-Proteinen als biochemische Interaktionsliganden für Zellrezeptoren aufgebracht werden [6, 7, 9, 13]. Die bekannte



◀ **Abb. 1:** Herstellung modifizierter Spinnenseidenfilme. Im natürlichen Gewebe sind Zellen in eine komplexe Mikroumgebung eingebettet, die physikalische, chemische und strukturelle Interaktionsstellen bietet. Wegen ihrer natürlichen Eigenschaften eignen sich Materialien aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen grundlegend als künstliche Matrix. Da die Interaktion der von uns genutzten Spinnenseidenmaterialien mit Zellen jedoch sehr gering ist, wurden Designstrategien entwickelt, um die Zelladhäsion zu fördern. Einerseits wurden strukturierte Filme mittels eines Stempelverfahrens hergestellt, um den Zellen topografische Leitstrukturen anzubieten [16]. Andererseits wurden die Spinnenseidenproteine auf Genebene mit kurzen Peptidsequenzen fusioniert, die mit Zellrezeptoren interagieren sollten [17].



▲ **Abb. 2:** Zelladhäsion auf strukturierten Spinnseidenfilmoberflächen. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskop-Aufnahmen bestätigten, dass die Oberflächentopografie physikalische Interaktionsstellen für Zellen bietet. Dabei adhärten Zellen aus verschiedenen Geweben (Haut, Muskel, Knochen und Nerven) unterschiedlich und richteten sich teilweise entlang der Strukturen aus. Rot: F-Aktin-Zytoskelett, türkis: Zellkerne. Die Abbildung wurde aus Referenz [16] modifiziert.

RGD-Sequenz (Arginin-Glyzin-Asparaginsäure) kommt in einigen EZM-Proteinen vor und interagiert mit vielen Integrin-Zellrezeptoren [13–15]. Durch die Identifikation weiterer Peptidsequenzen in EZM-Proteinen und den dazugehörigen Zellrezeptoren [13, 14] entstand ein komplexer Werkzeugkasten für die Modifikation von Biomaterialien [6, 7, 13].

Für die Anwendung in der regenerativen Medizin zeichnen sich Materialien aus rekombinanter Spinnseide basierend auf dem *Araneus diadematus Fibroin 4* aus, da sie geringe inflammatorische Eigenschaften und gute Biokompatibilität aufweisen [18]. Da das natürliche Protein jedoch keine zelladhäsiven Proteinsequenzen beinhaltet, interagieren Zellen nur gering mit Materialien, die aus diesem Protein bzw. rekombinanten Varianten davon hergestellt wurden [18, 19]. Dennoch können die Spinnseiden durch Modifikation sowie angepasste Prozessierung der zugrunde liegenden Proteine anwendungsspezifisch modifiziert werden [16–19]. Hier werden zwei Modifikationsrouten vorgestellt, um eine gerichtete Interaktion von Zellen mit

Spinnseidenoberflächen zu gewährleisten (Abb. 1, [16,17]). In der ersten Strategie wird die Oberflächentopografie von Spinnseidenfilmen durch geometrische Strukturen und Vertiefungen modifiziert [16]. Mittels Fotolithografie werden Abgussformen mit geometrischen Strukturgradienten, die sich in Form und Größe unterscheiden, hergestellt, um Stempel aus Silikon (PDMS) zu produzieren. Die strukturierten Stempel werden auf eine Spinnseidenlösung gegeben, wobei es durch Evaporation des Lösungsmittels zur Filmbildung und durch die Strukturen des Stempels zur Übertragung der Topografie auf die Filmoberfläche kommt. Nach Ablösen des Stempels bleibt ein strukturierter Spinnseidenfilm zurück [16]. In der zweiten Route wird das Spinnseidenprotein durch ein etabliertes Klonierungsverfahren bereits im Plasmid modifiziert [17, 19]. So können Gensequenzen von kurzen, zelladhäsiven Peptiden aus EZM-Molekülen, wie RGD oder KGD, an das Spinnseidengen fusioniert werden. Die modifizierten Spinnseidenproteine können anschließend rekombinant hergestellt, gereinigt, gelöst und in

Filme prozessiert werden. Die Peptide sind an der Filmoberfläche exponiert und dienen den Zellen als biochemische Interaktionsliganden (Abb. 1, [17]).

Der stempelbasierte Ansatz [16] zur Modifikation der Oberflächentopografie von Spinnseidenfilmen bietet den Vorteil, dass die Vorlagen und die Silikonstempel wiederverwendbar sind. Neben Rillen unterschiedlicher Breite (6–57 µm) wurden Größengradienten (ca. 40–100 µm) von sieben weiteren Strukturen mit verschiedenen Winkeln, Ecken und Rundungen erstellt. Mikroskopaufnahmen bestätigten die erwarteten Strukturgrößen mit Flächen im Mikrometer- und Höhen im Nanometerbereich. Zur systematischen Analyse der Zellinteraktion wurden acht verschiedene Zelllinien getestet. Nach vier Stunden wurden nicht adhärenente Zellen abgewaschen und das Adhäsionsverhalten anhaftender Zellen analysiert. Dafür wurden das F-Aktin-Zytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin und die Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Da DAPI ebenfalls mit dem rekombinanten Spinnseidenprotein interagiert, wurden auch die Seidenstrukturen sichtbar. **Abbildung 2** zeigt einen ausgewählten Teil der CLSM-Aufnahmen. Hautzellen adhärten unabhängig von der Form innerhalb der vorgegebenen Strukturen und richteten ihre Zellmorphologie gemäß der vorhandenen Struktur aus. Da den Muskelzellen vor allem Ecken und Kanten als Anhaftungspunkte dienten, richteten sie sich vor allem entlang der Längsfurchen aus. Obgleich Knochenzellen keine Strukturpräferenzen zeigten, schienen vorhandene Kanten die Adhäsion und Kontaktführung zu unterstützen. Nervenzellen hafteten in den Vertiefungen an und orientierten sich entlang der vorgegebenen Struktur. Zu viele Ecken oder runde Formen hinderten jedoch die Zellinteraktion und Ausrichtung. Dieser Zelltyp bevorzugte daher quadratische, hexagonale oder dreieckige Formen. Bei vielen Zellen konnte auch eine Korrelation zwischen Zell- und Strukturgröße beschrieben werden. Während in den kleineren Strukturen manchmal nur eine Zelle die komplette Struktur ausfüllte, adhärten mehrere Zellen in den flächenmäßig größeren Vertiefungen [16].

Durch die Modifikation von Spinnseidenproteinen mit kurzen Peptiden [17] sollte bestimmten Zellrezeptoren spezifische, biochemische Interaktionsliganden zur Verfü-

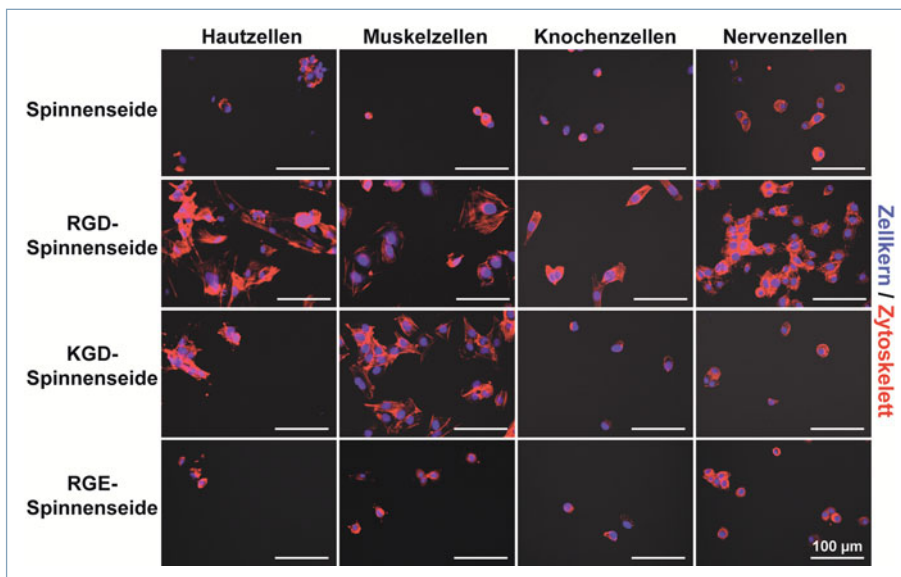


Abb. 3: Zelladhäsion auf Peptid-modifizierten Spinnenseidenfilmoberflächen. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen bestätigten, dass Zellinteraktionspeptide als Anheftungsstellen auf Spinnenseidenfilmen für Zellen dienten. Im Vergleich zu nicht modifizierten oder mit dem RGE-Peptid modifizierten Kontrollfilmen (wenige, runde Zellen), adhärten und spreiteten alle untersuchten Zelllinien auf RGD-modifizierten Spinnenseidenfilmen. KGD-modifizierte Spinnenseidenfilme zeigten überraschend eine Spezifität für Muskelzellen, wobei andere Zelllinien nicht adhärten. Rot: F-Aktin-Zytoskelett, blau: Zellkerne. Die Abbildung wurde aus Referenz [17] modifiziert.

gung gestellt werden. Neben der zelladhäsiven RGD- und der inaktiven RGE-Variante [19] wurde das Spinnenseidenprotein u. a. mit der KGD-Sequenz aus Kollagen [20] funktionalisiert [17]. Das Adhäsionsverhalten von elf verschiedenen Zelllinien wurde dann nach vier Stunden Inkubationszeit systematisch untersucht. **Abbildung 3** zeigt einen ausgewählten Teil von Mikroskopieaufnahmen Fluoreszenz-gefärbter Zellen. Anhand der Zellzahl und des Spreitverhaltens wurden die Spinnenseidenoberflächen in zelladhäsiv und nicht zellbindend kategorisiert. Interessanterweise war die mit KGD-modifizierte Variante selektiv für Muskelzellen, während die anderen Zellen nur sehr schlecht adhärten (**Abb. 3**). Diese Selektivität wurde nachfolgend in einem Ko-Kultur-Experiment mit Nervenzellen bestätigt [17].

Zusammenfassend zeigte sich, dass das selektive Adhäsionsverhalten verschiedener Zellen auf Spinnenseidenfilmen eine gewebespezifische Anpassung von Implantatmaterialien zur Förderung der Regeneration ermöglicht [16, 17]. Es bietet sich daher an, die spezifischen, zellulären Reaktionen auf biochemische Liganden [17] und vorhandene

Oberflächenstrukturen [16] in Seidenfilmen in Zukunft beim Design von Gerüsten für die Geweberegeneration zu nutzen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) – Projektnummer 326998133-TRR225 (gefördertes Subprojekt: C01).

Literatur

- [1] Huang G, Li F, Zhao X et al. (2017) Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment. *Chem Rev* 117: 12764–12850
- [2] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C et al. (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97: 4–27
- [3] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123: 4195–4200
- [4] Diller RB, Tabor AJ (2022) The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics* 7: 87
- [5] Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE (2004) Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1031–1037
- [6] Spiller S, Clauder F, Bellmann-Sickert K et al. (2021) Improvement of wound healing by the development of ECM-inspired biomaterial coatings and controlled protein release. *Biological Chemistry* 402: 1271–1288
- [7] Pagel M, Beck-Sickinger AG (2017) Multifunctional biomaterial coatings: synthetic challenges and biological activity. *Biol Chem* 398: 3–22
- [8] Kyzioł K, Kaczmarek Ł, Kyzioł A (2017) Surface Functionalization of Biomaterials. In: Thakur VK, Thakur MK, Kessler MR (Hrsg.) *Handbook of Composites from Renewable*

Materials. Scrivener Publishing LLC, Beverly, Massachusetts, 457–490

- [9] Pacelli S, Manoharan V, Desalvo A et al. (2016) Tailoring biomaterial surface properties to modulate host-implant interactions: implication in cardiovascular and bone therapy. *J Mater Chem B* 4: 1586–1599
- [10] Amani H, Arzaghi H, Bayandori M et al. (2019) Controlling Cell Behavior through the Design of Biomaterial Surfaces: A Focus on Surface Modification Techniques. *Adv Mater Interfaces* 6: 1900572
- [11] Ermis M, Antmen E, Hasirci V (2018) Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioact Mater* 3: 355–369
- [12] Nguyen AT, Sathe SR, Yim EKF (2016) From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J Phys: Condens Matter* 28: 183001
- [13] Huettner N, Dargaville TR, Forget A (2018) Discovering Cell-Adhesion Peptides in Tissue Engineering: Beyond RGD. *Trends Biotechnol* 36: 372–383
- [14] Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697–715
- [15] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* 339: 269–280
- [16] Lentz S, Trossmann VT, Scheibel T (2023) Selective Topography Directed Cell Adhesion on Spider Silk Surfaces. *Adv Mater Interfaces* 10: 2201936
- [17] Trossmann VT, Scheibel T (2023) Design of Recombinant Spider Silk Proteins for Cell Type Specific Binding. *Adv Healthc Mater* 12: 2022660
- [18] Salehi S, Koeck K, Scheibel T (2020) Spider Silk for Tissue Engineering Applications. *Molecules* 25: 737
- [19] Wohlrab S, Müller S, Schmidt A et al. (2012) Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* 33: 6650–6659
- [20] Nykvist P, Tasanen K, Viitasalo T et al. (2001) The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism. *J Biol Chem* 276: 38673–38679

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Vanessa T. Trossmann und Thomas Scheibel

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Thomas Scheibel
Lehrstuhl Biomaterialien
Universität Bayreuth
Prof.-Rüdiger-Bormann-Straße 1
D-95447 Bayreuth
thomas.scheibel@uni-bayreuth.de