

Zell-Material-Interaktion auf chemisch und topographisch modifizierten Biomaterialien

J. Barbara Nebe*, H. Rebl*, B. Finke#,
U. Beck, K. Schröder#, K.-D. Weltmann#

*Universität Rostock, Zentrum für Medizinische Forschung, AB Zellbiologie
Schillingallee 69, D-18057 Rostock

#INP Greifswald e.V., Felix-Hausdorff-Str. 2, D-17489 Greifswald

barbara.nebe@med.uni-rostock.de

Implantatbedarf:

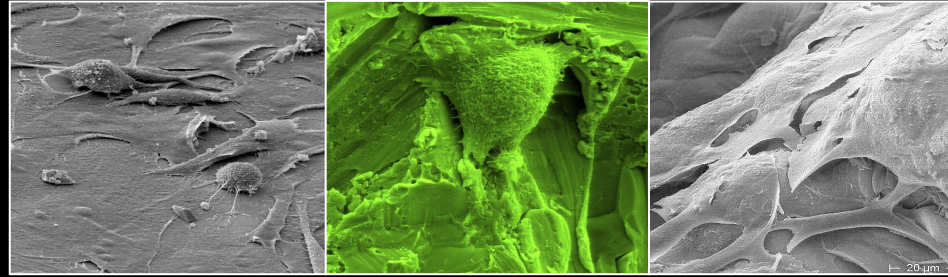
Künstliche Gelenke: 1.500.000 weltweit/Jahr
Künstliche Hüftgelenke: 200.000 in Deutschland/Jahr
Künstliche Kniegelenke: 150.000 in Deutschland/Jahr



Durchschnittliche Standzeit der Endoprothesen:
90 % nach 10 Jahren

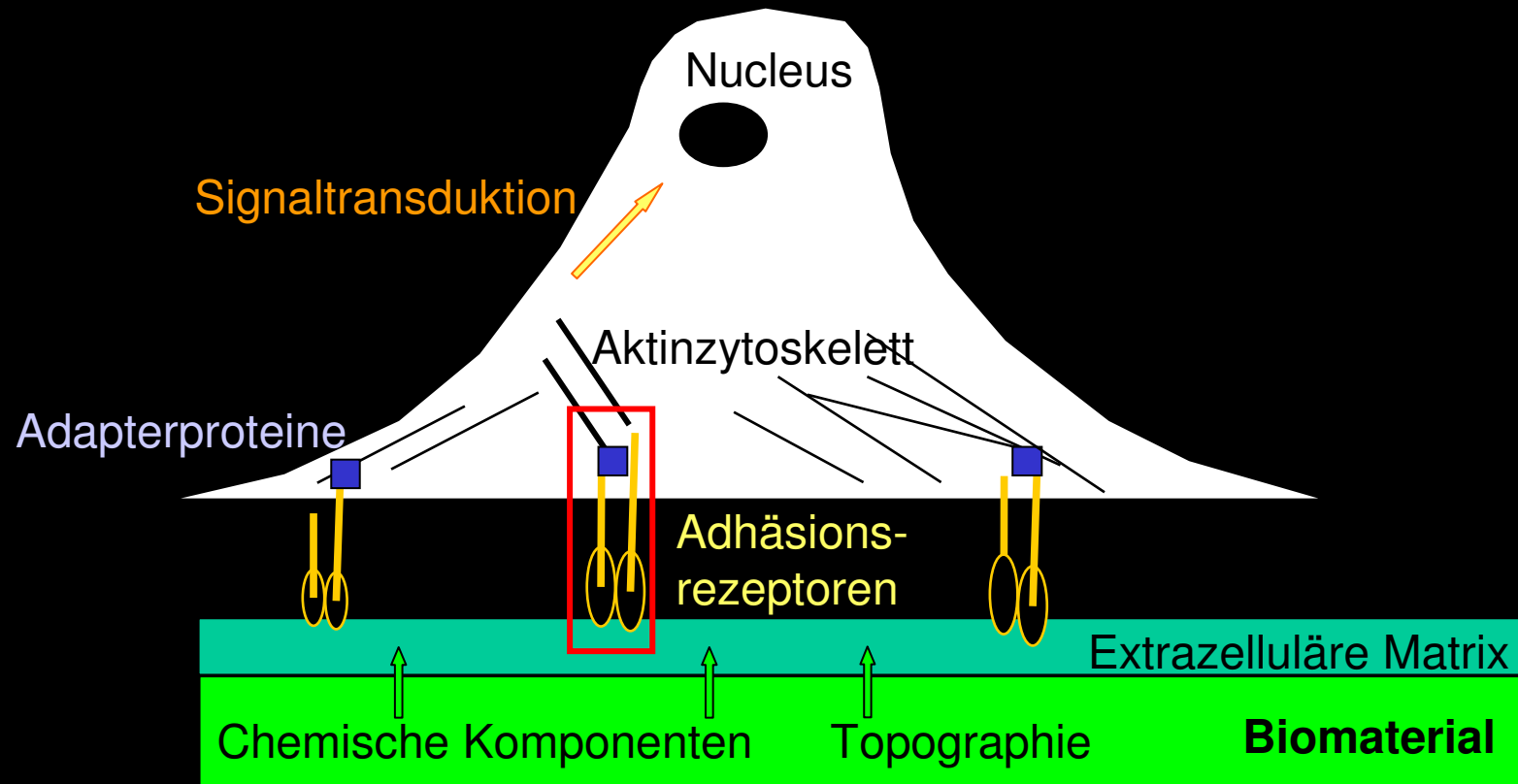


Revisions-Operationen: 20.000 - 30.000 pro Jahr



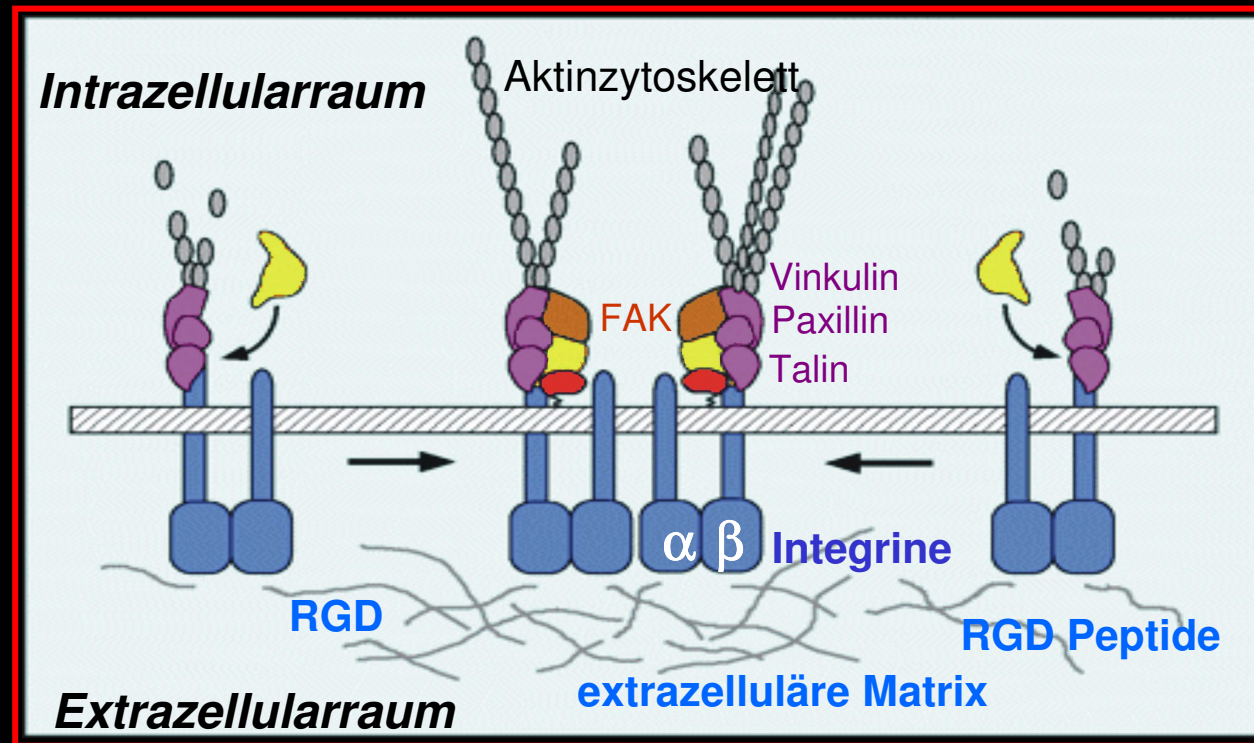
- ▶ **Interaktion zwischen Biomaterial und Zellen – entscheidend für klinischen Erfolg eines permanenten Implantates**
- ▶ **Zelluläre Mechanismen für Okkupation der Biomaterialoberfläche – Adhäsion, Spreading, Migration, Proliferation, Differenzierung**
- ▶ **Adhäsionsrezeptor-vermittelte Prozesse – Immobilisierung von Proteinen bisher als etablierte Methode (z.B. Garcia et al. 2005)**
- ▶ **Zellbiologie – Auffinden weiterer Adhäsionsmechanismen – führt zur Optimierung des Oberflächendesigns**

Schema: Zelle-Biomaterial-Interaktion



*Hynes RO: Cell 69 (1992) 11-25.
Integrins: ...signaling in cell adhesion.*

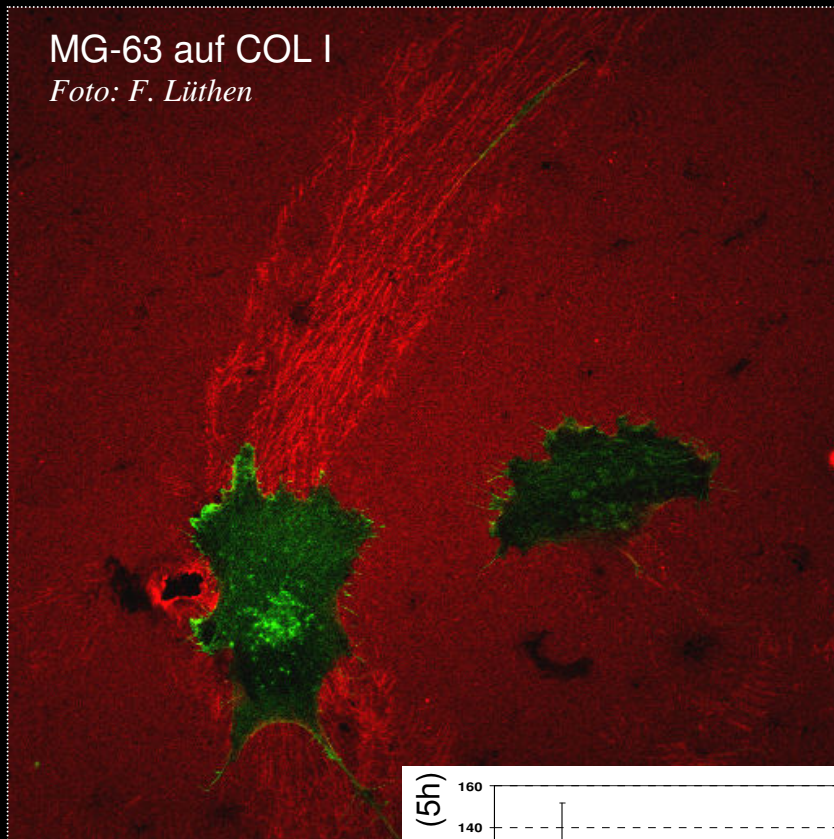
Assoziation der transmembranen Integrinrezeptoren mit intrazellulären Strukturen



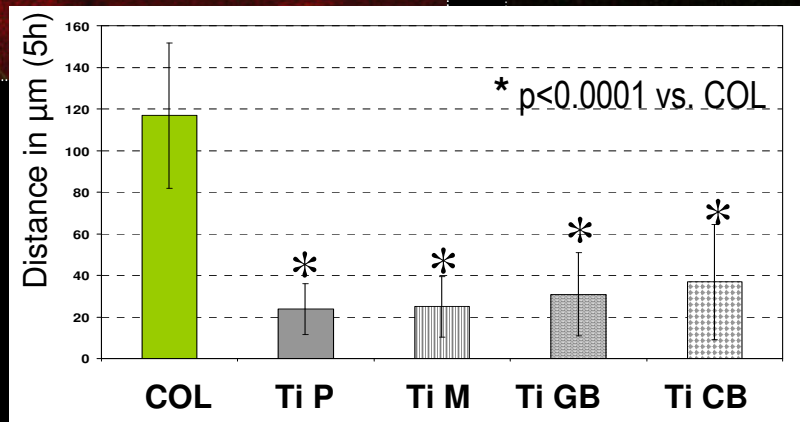
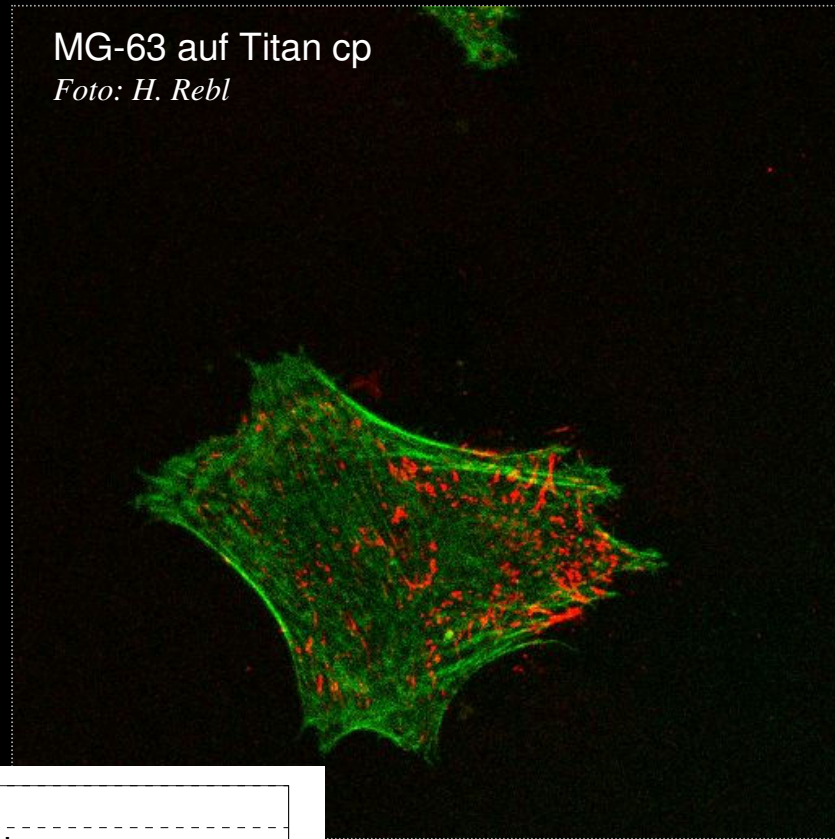
(RGD = Aminosäuren Arg-Glyc-Asp)

Kollagen I - Migration von Osteoblasten gesteigert

MG-63 auf COL I
Foto: F. Lüthen



MG-63 auf Titan cp
Foto: H. Rebl



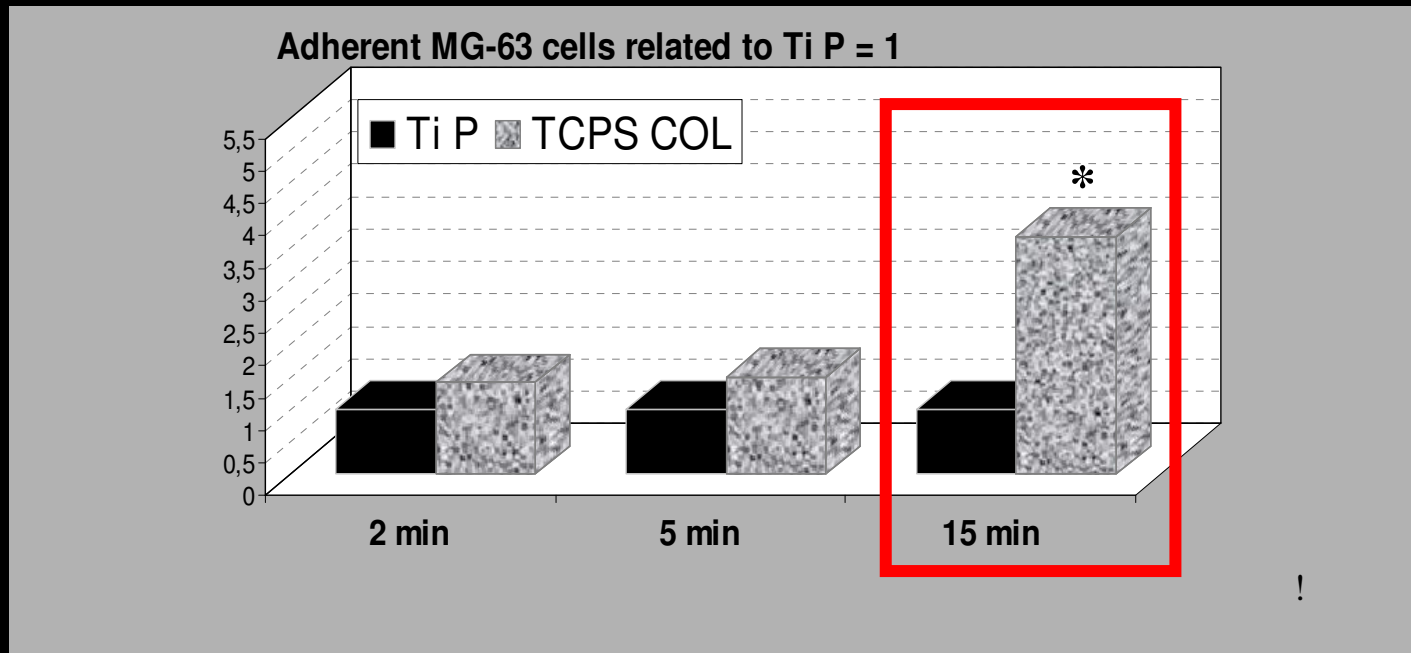
Kollagen

Titan (cp), strukturiert

MG-63, 24 h, DMEM+10%FCS
Aktin: grün, Fibronectin: rot
Analysezeit 5 h,
LSM 410, x20 Objektiv,
 $\bar{x} \pm s$, n=15, Student's t-Test

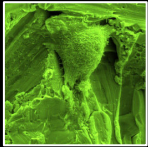
Nebe B, Lüthen F:
BIOMaterialien 5 (2004)

Zelladhäsion auf Titan vs. Kollagen I



↓
Zelladhäsion
initial 2 min
bereits 20% auf Titan!

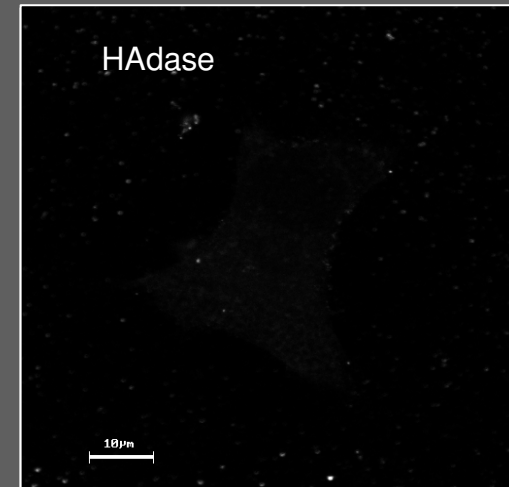
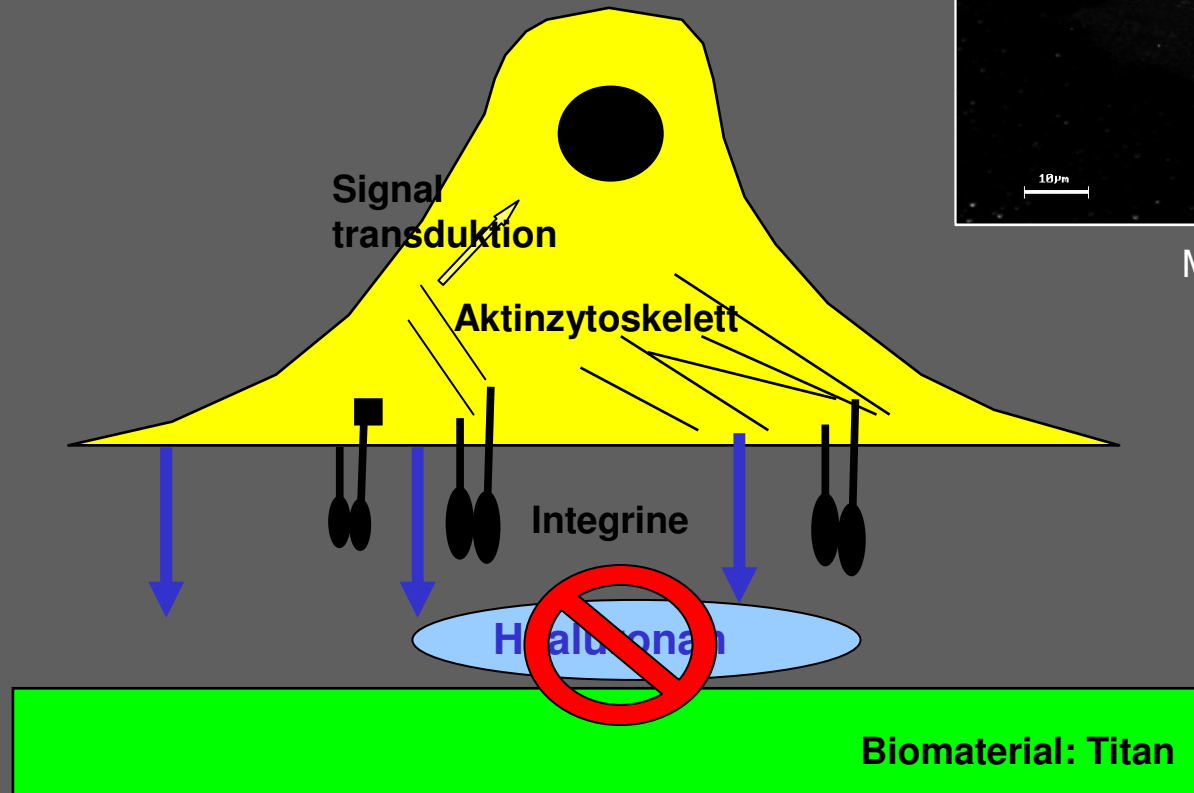
Nebe B et al., Biomol Eng 24 (2007)



Initiale Zelladhäsion auf Metalloberflächen - Erklärungslücke !

→ Titan: Oberfläche ohne Liganden für Rezeptorbindung!

Initiale Zelladhäsion - welcher Mechanismus?

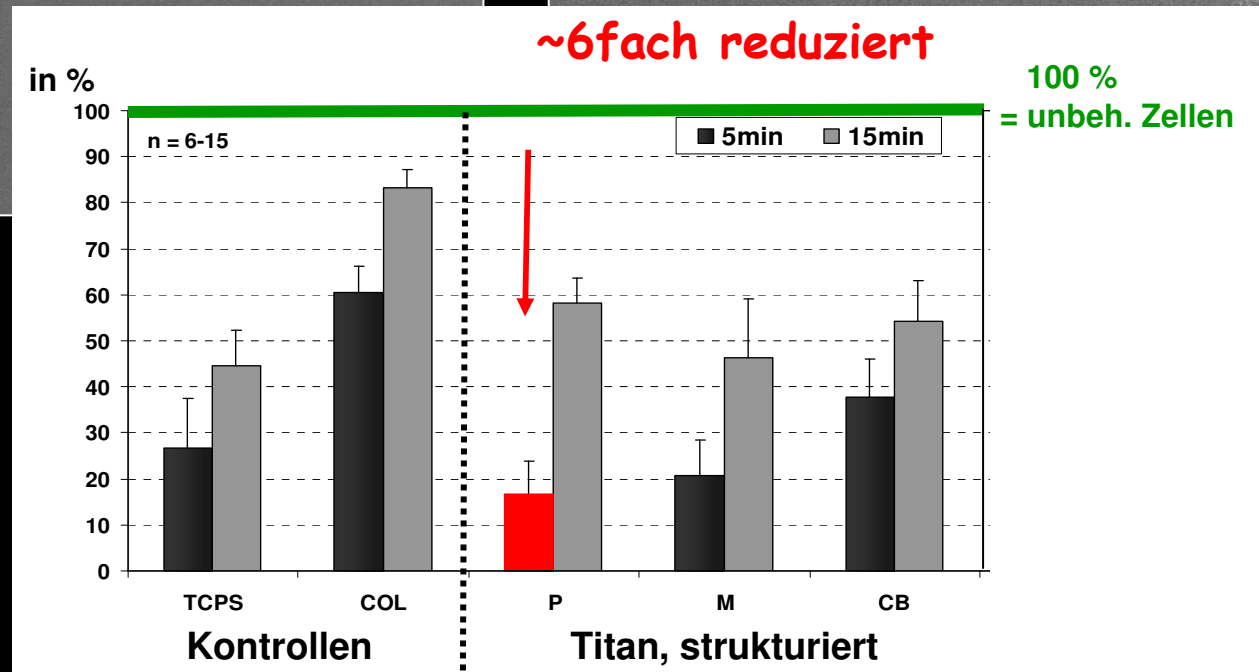
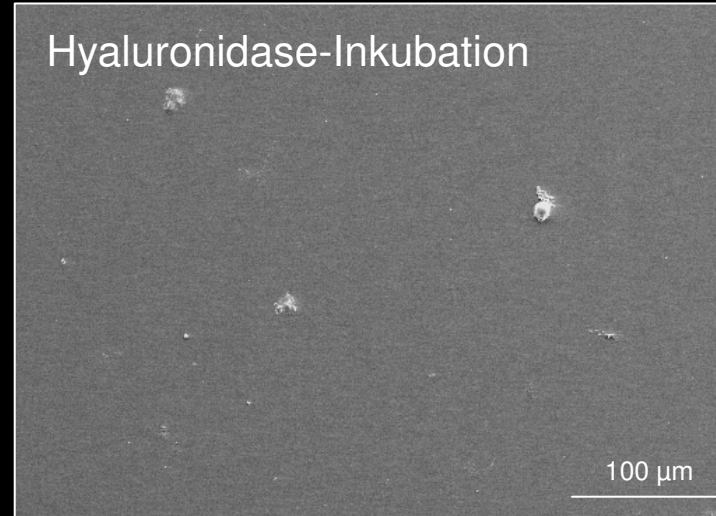
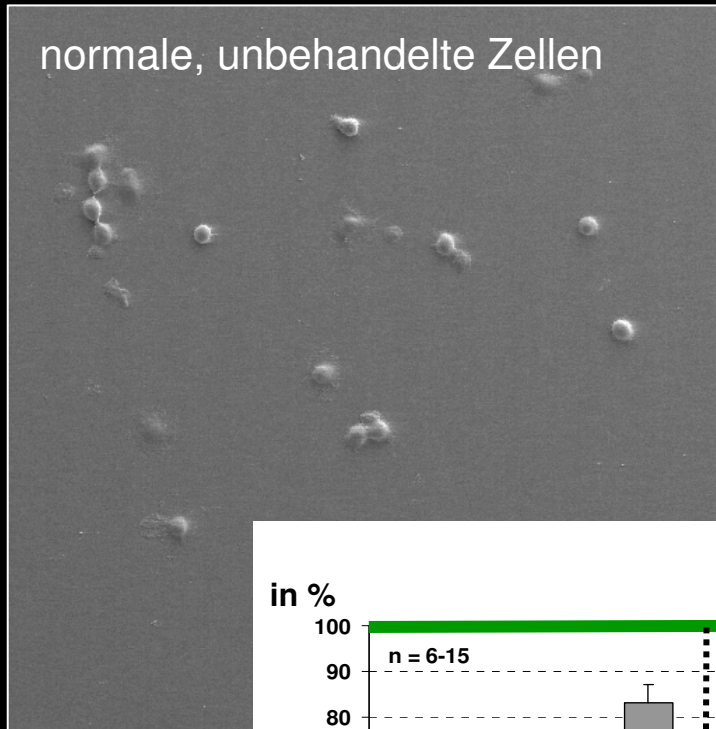


MG-63 Osteoblast

Zaidel-Bar & Geiger 2004

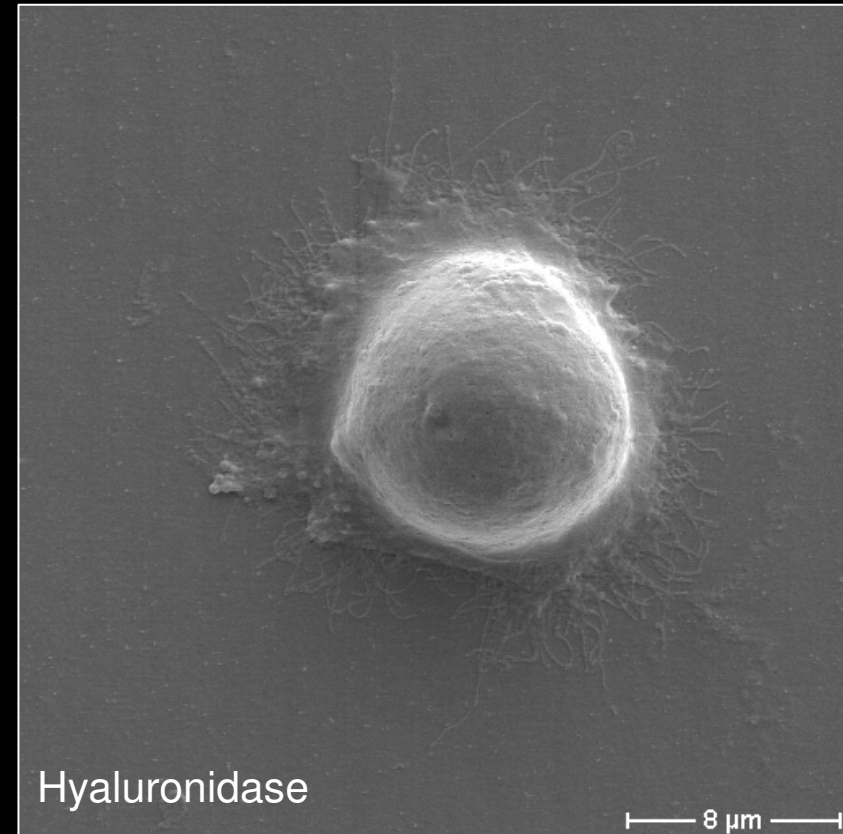
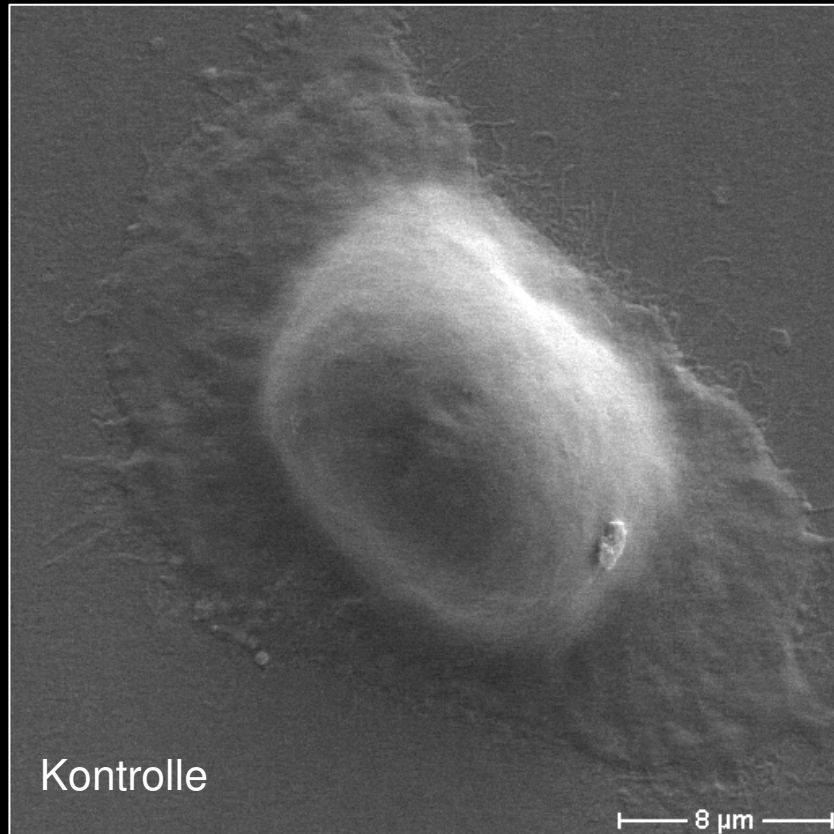
Nebe & Lüthen et al. 2008, in: *Metallic Biomaterial Interactions*

Adhäsion von Osteoblasten - abhängig von Matrixhülle



Finke et al.
Biomaterials
2007

Spreading von Osteoblasten - abhängig von der extrazellulären Matrixhülle aus Hyaluronan



↪ Fläche 4 x kleiner
nach Inkubation mit HAdase



Erkenntnis

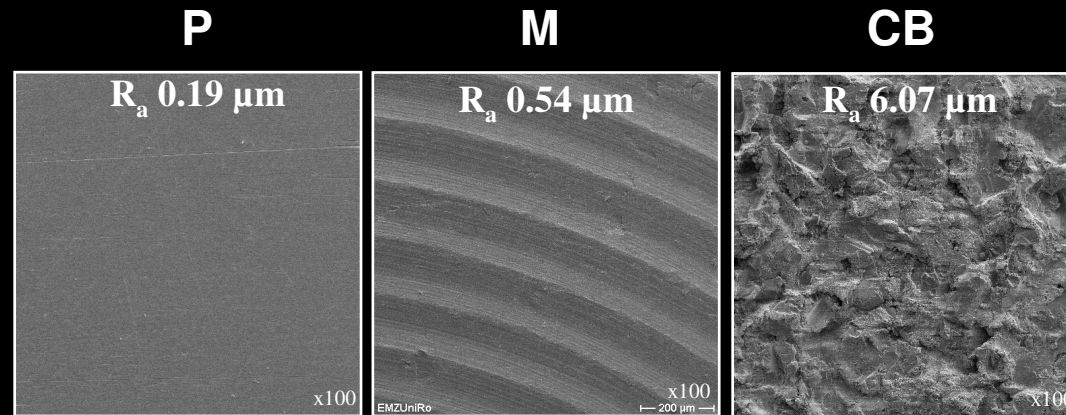
Die negativ geladene Hyaluronsäure-Hülle der Zellen ist beteiligt an Zellanhaftung und Spreading.



Resultierende Fragestellung

Ist eine chemisch funktionalisierte Titanoberfläche allein mit positiven Ladungsträgern effizient für eine Verstärkung der initialen Adhäsion der Knochenzellen ?

Strukturiertes Titan für die plasmachemische Modifikation



Ti cp, Grad 2 (DOT GmbH, Rostock):

poliert

maschiniert

Korund
gestrahlt

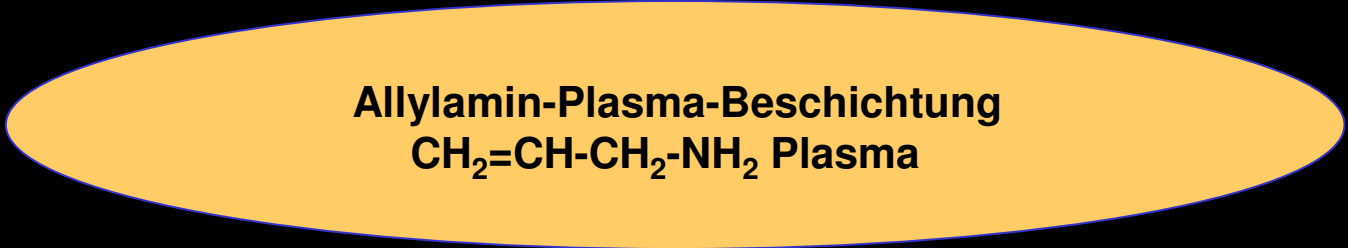
Aminofunktionalisierung der Titanoberflächen

Ti mit nativem Oxidfilm

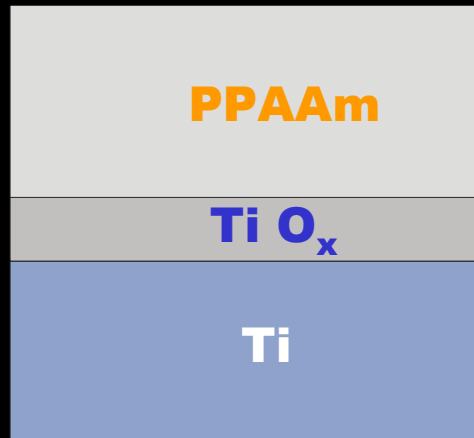


Wasser-Kontaktwinkel
 $77,7 \pm 3,4^\circ$ (Digidrop, GBX, Romans, France)

XPS:
O:Ti = 2:1 (TiO₂)



Ti nach Reinigung mit Sauerstoffplasma und Beschichtung mit Plasmapolymer



ca. 100 nm dünner Polymerfilm

Wasser-Kontaktwinkel
 $48,2 \pm 3,4^\circ$

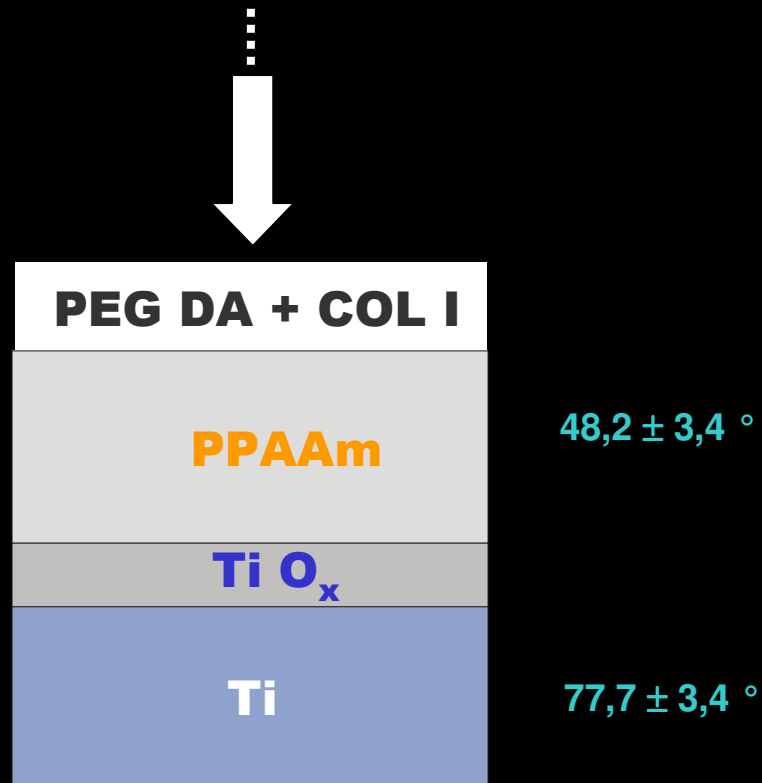
Meyer-Plath et al.
Vacuum 71 (2003)



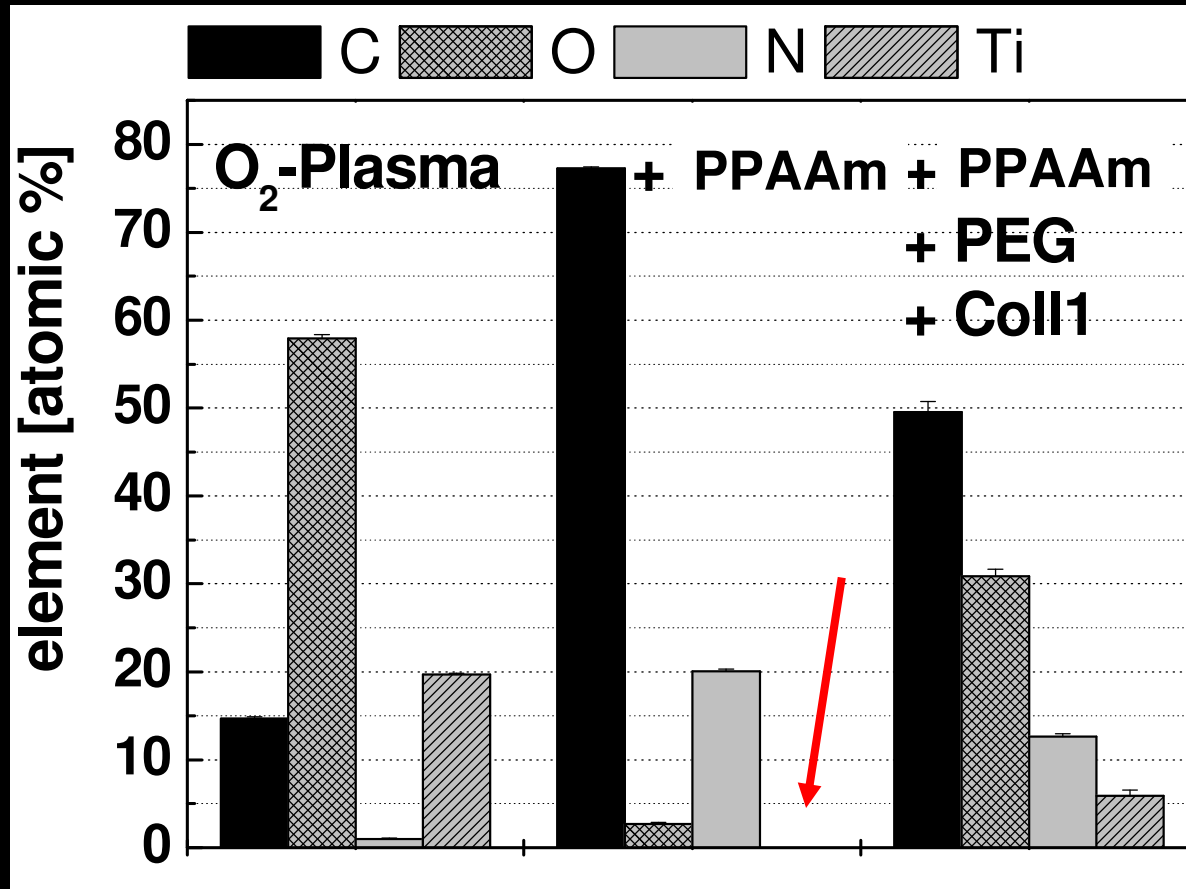
Finke et al.
Biomaterials 28 (2007)



Fortsetzung Schichtaufbau: Titan mit Allylamin und Immobilisierung von Kollagen I



Charakterisierung des Polymerfilms



XPS Analyse:

kein Ti Signal

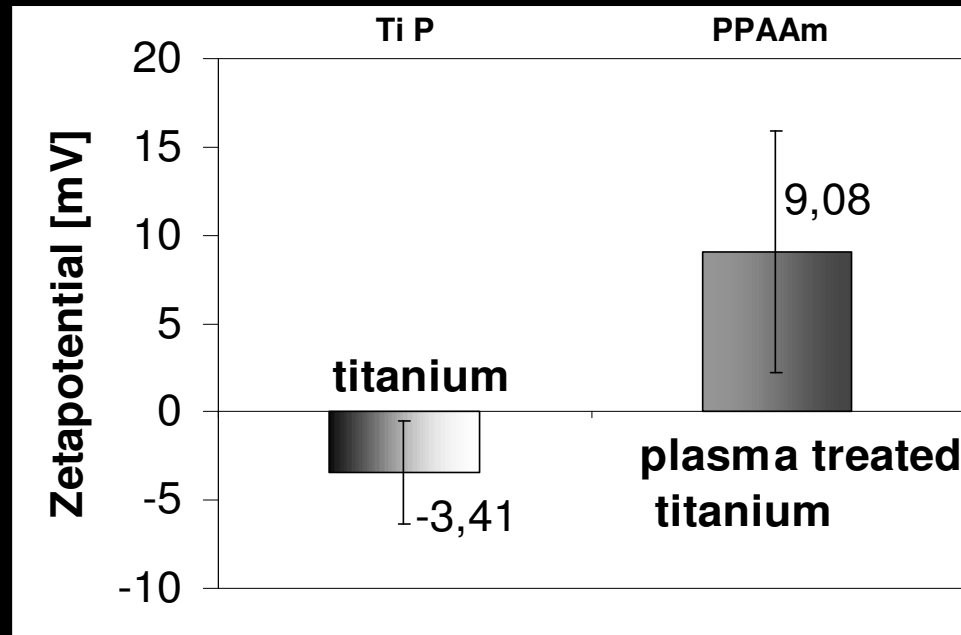
N/C = 25-30 %

Schröder
Finke

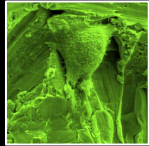


CAMPUS
PlasmaMed

Charakterisierung des Polymerfilms: Zetapotenzial



Zetapotenzial-Messung:
positiv geladene Titan-Oberfläche durch PPAAm
(Plasma polymerisiertes Allylamin)



Zelluläre Untersuchungen:

Adhäsion

Zellarchitektur

Morphologie

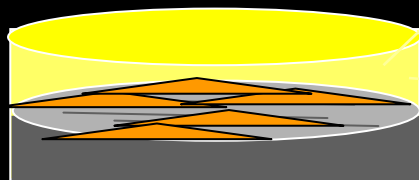
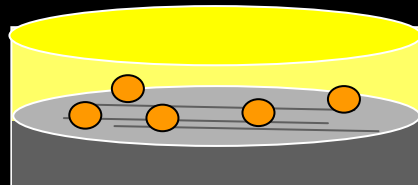
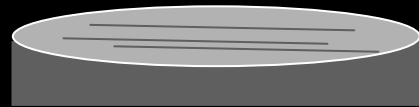
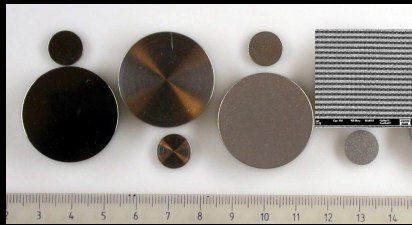
Aktinzytoskelett

Zellfunktion

mRNA Expression

Protein

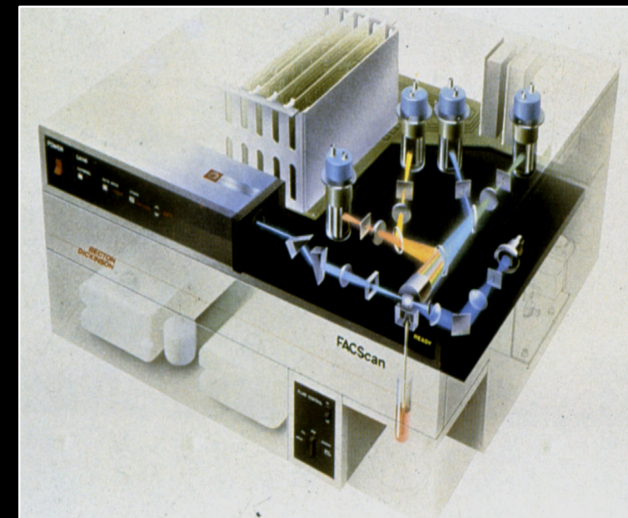
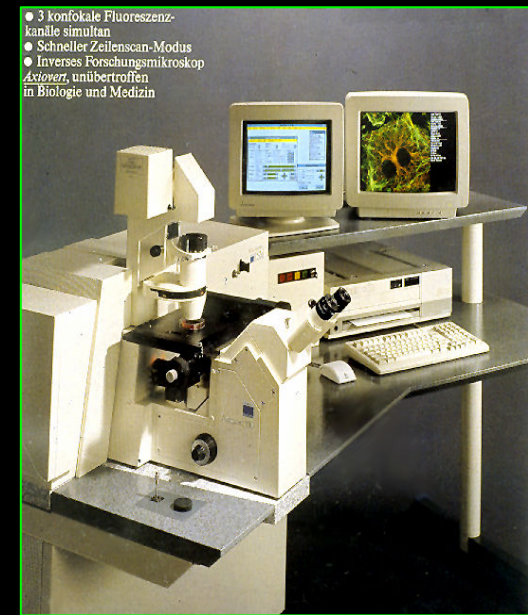
Experimenteller Ansatz *in vitro*



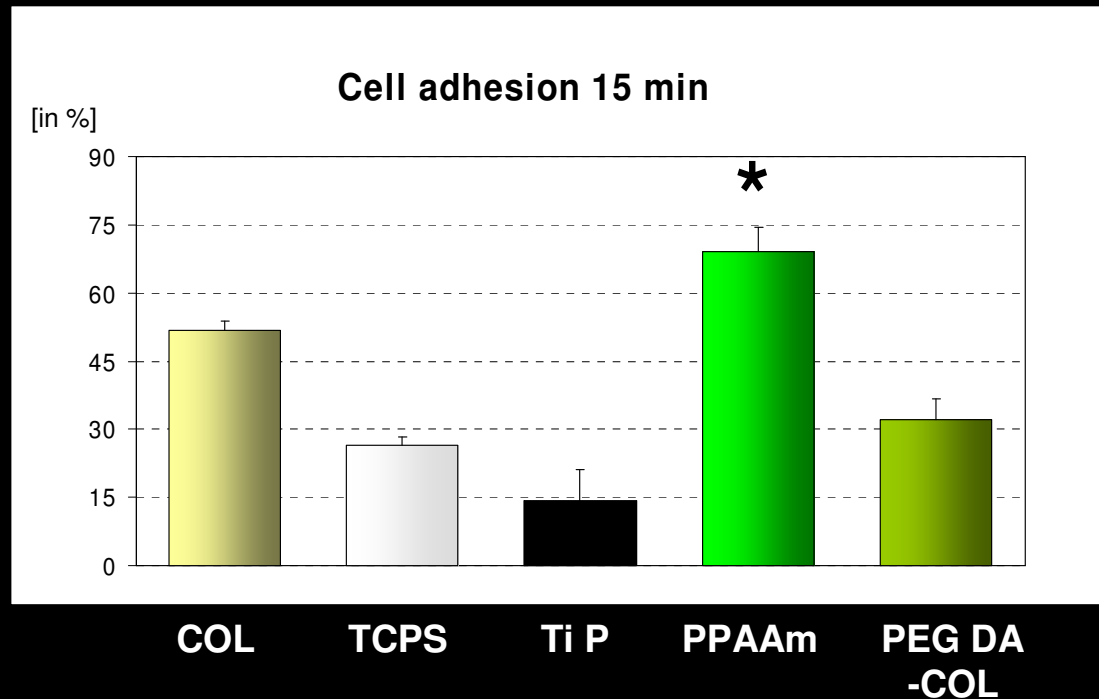
Fluoreszenzfärbung



Zellzahl



Die initiale Adhäsion der Osteoblasten ist verstärkt auf amino-funktionalisiertem Titan (PPAAm)



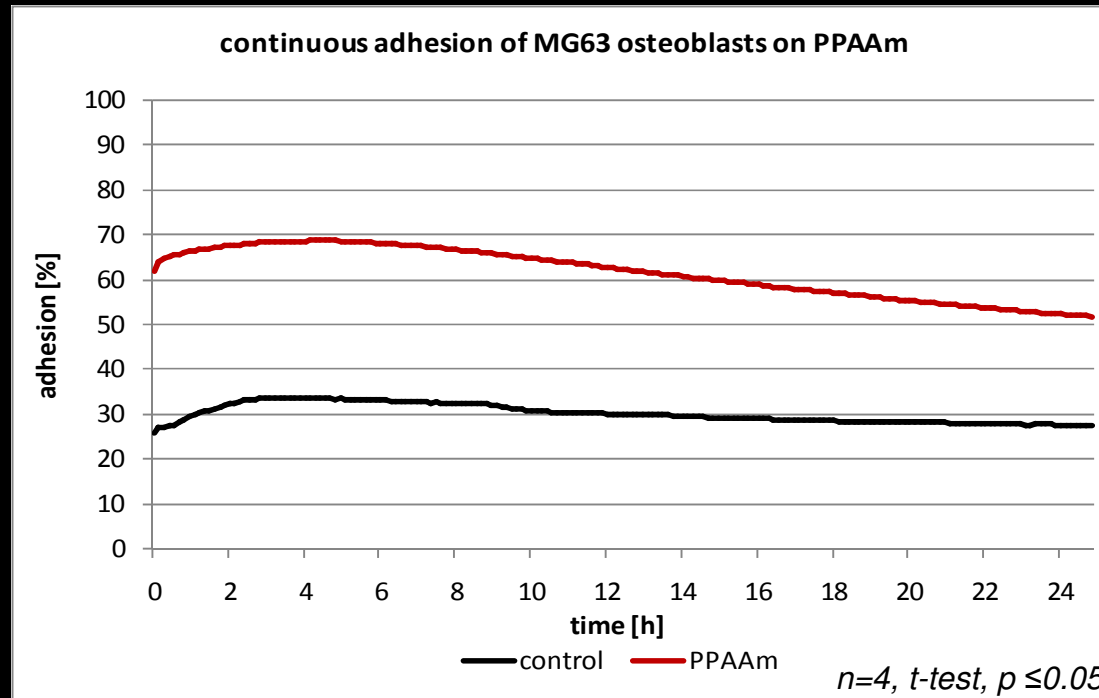
n=4
mean+SEM
t-test paired:
* PPAAm : PEG DA-COL
Ti P
TCPS
*p<0.01



Aminofunktionalisierung der Titanoberfläche –
positiv für die initiale Adhäsion -
verglichen mit zusätzlicher Collagen-Immobilisierung

Zeitverlauf der Adhäsion über 24h: Vitale Osteoblasten

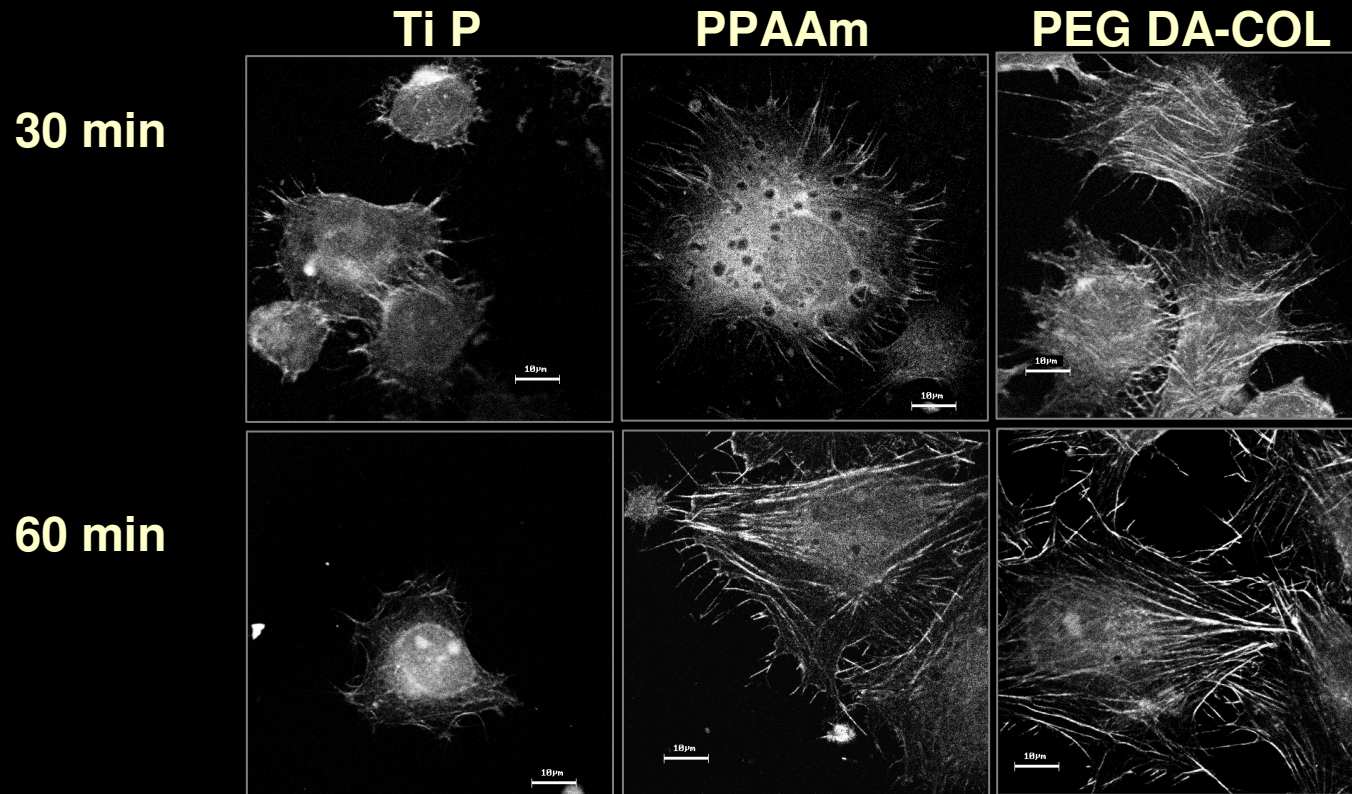
1 h cell cultivation
before start



Osteoblasten signifikant stärker adhären auf PPAAm!

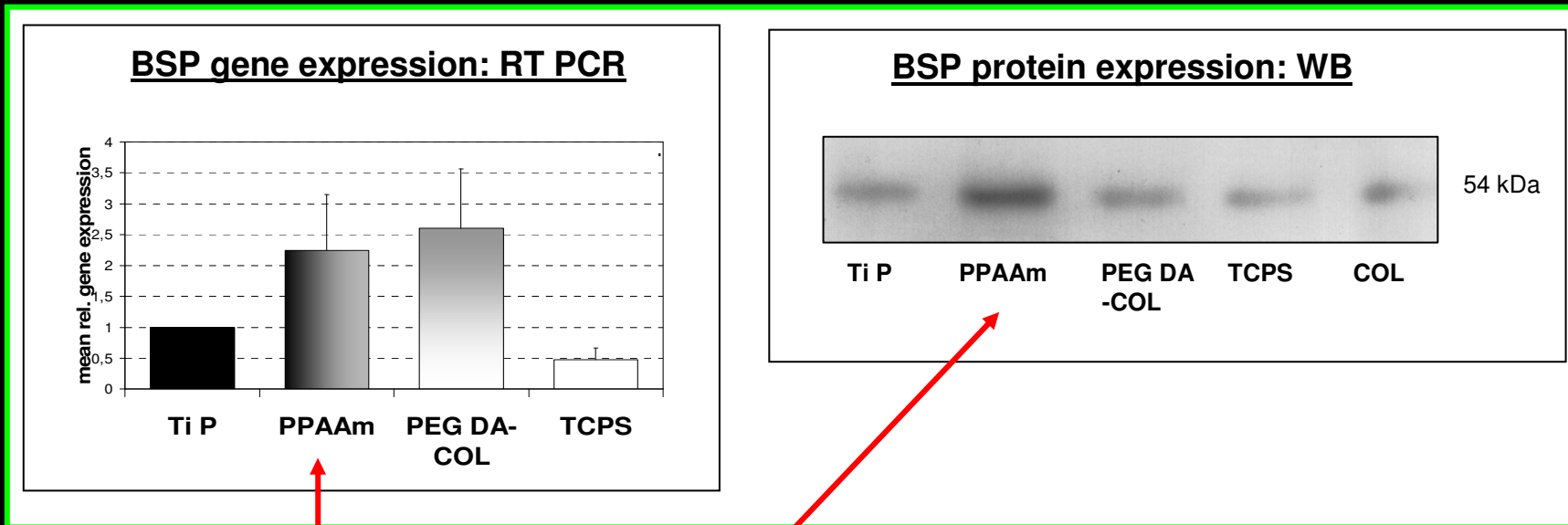
Bionas® SC 1000 sensor chip
(Interdigitated Electrode Structure)

Aktinfilamente der Osteoblasten - gut organisiert durch Aminofunktionalisierung des Titans - vergleichbar mit COL



↻ Auf purem Titan Aktinfilamente dagegen schwach organisiert nach 30 und 60 min!

Expression des Differenzierungsmarkers BSP - erhöht durch Aminofunktionalisierung des Titans

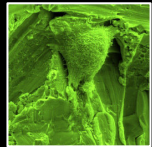


Hochregulation von Bone Sialo Protein (BSP) auf dem Transkriptions- und Translationslevel durch die positiven Ladungsträger (PPAAm)!

C. Bergemann, P. Müller

*Biomol Eng 24 (2007) Nebe et al.
Biomaterials 28/30 (2007) Finke et al.*

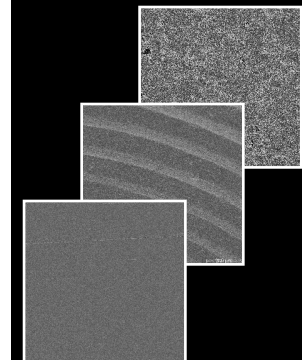
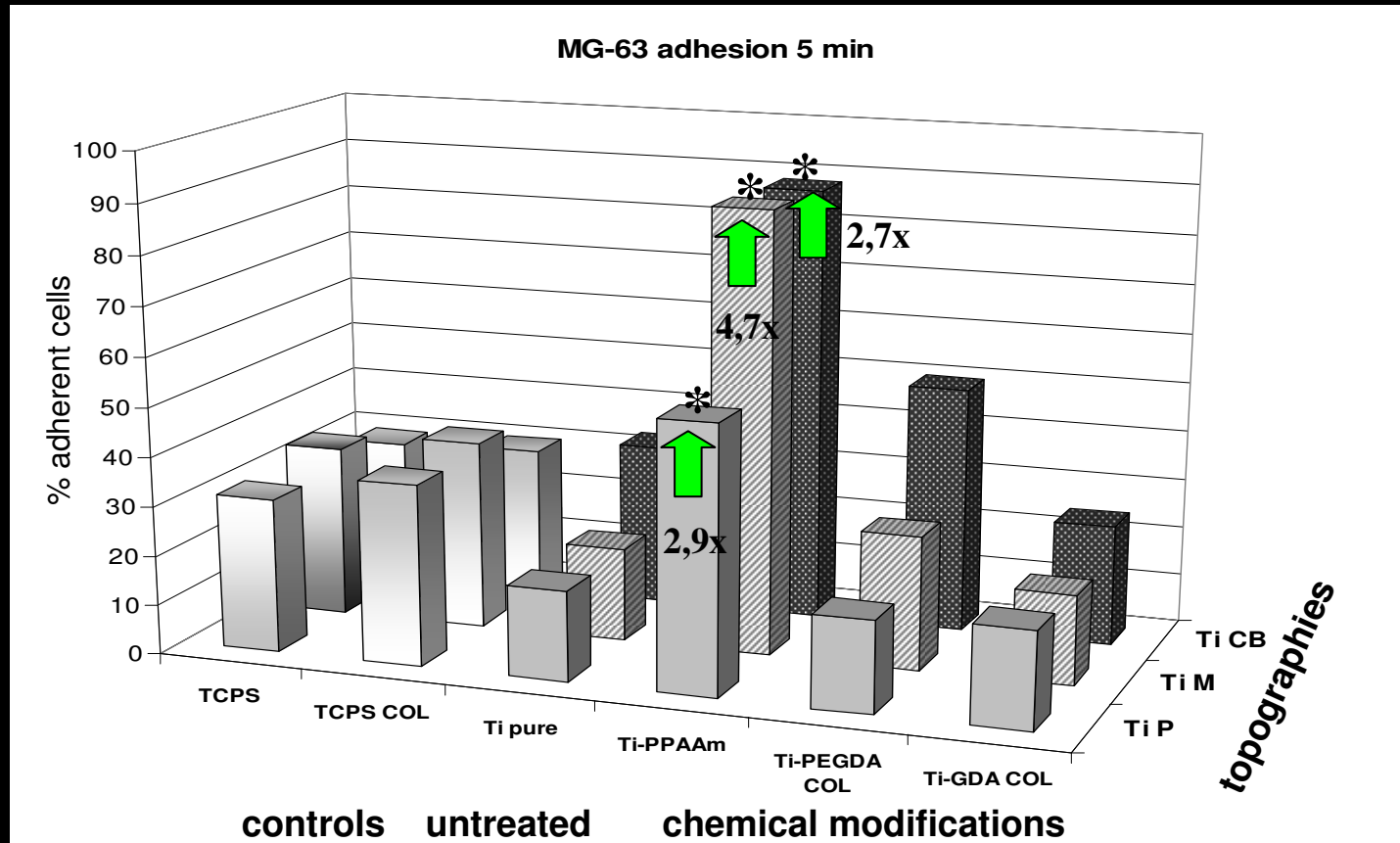
Resultat



Ladungsgegensätze Metalloberfläche vs. Zelloberfläche
sind effizient für die initiale Adhäsion der Zellen!

→ ... Bedeutung der Kombination
Topographie & Chemie?

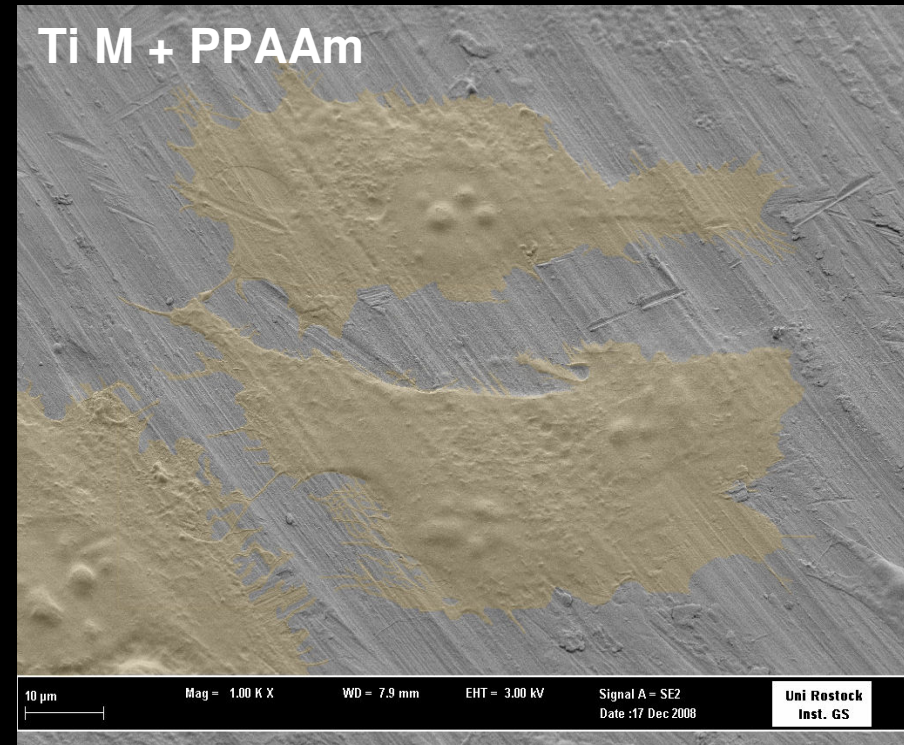
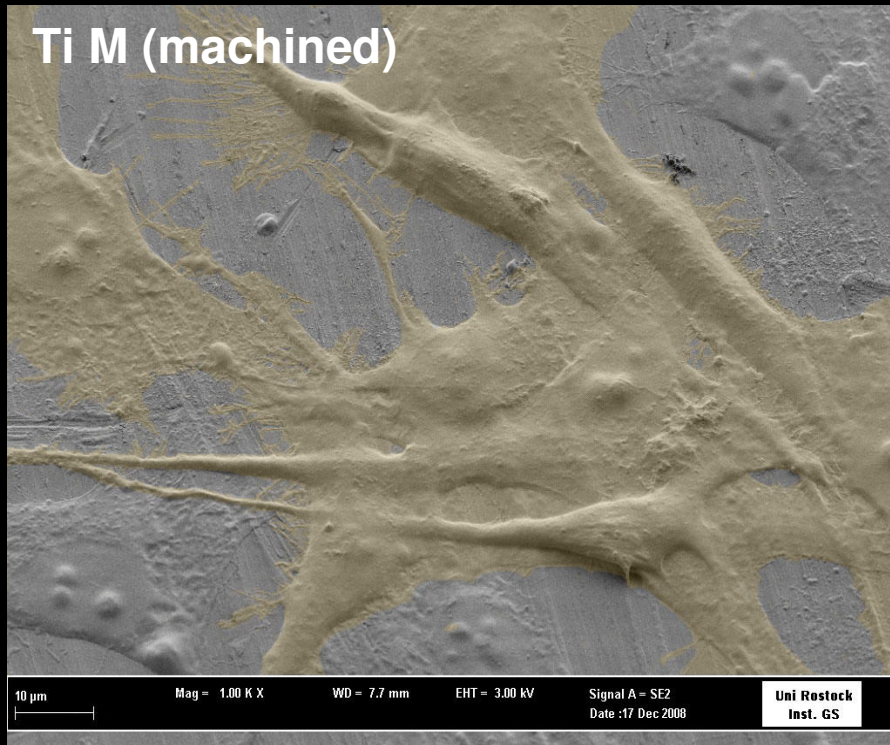
Kombinatorischer Effekt: Topographie und Chemie - initiale Adhäsion (5 min) von Osteoblasten



Aminofunktionalisierung der strukturierten Ti-Oberfläche erhöht Zelladhäsion um ca. 3-5x!

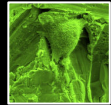
Kein vergleichbarer Effekt durch Immobilisierung von Kollagen I.

Zell-Titan (Ti)-Kontakt verstärkt durch Plasmapolymer-Schicht

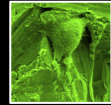


↻ Zellen verschmelzen mit der Struktur des maschinieren Titans - die Zellränder sind kaum von Oberfläche unterscheidbar!

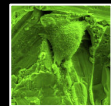
Schlussfolgerungen



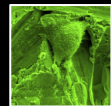
Plasma modifizierte Titanoberflächen (PPAAM) verbessern zelluläre Adhärenz!



Bei PPAAM - durch sehr engen Zellkontakt am Interface zum strukturierten Titan — Verbesserung des “bone bondings” erwartet!



Werden Biomaterial-Oberflächen unter Berücksichtigung zelleigener Adhäsionsmechanismen modifiziert, könnte zelluläre Akzeptanz des Implantats gesteigert werden!



Das Wissen über zelluläre Adhäsionsmechanismen — entscheidend für neue Strategien der Oberflächenmodifikation von Biomaterialien.

Kooperation



Plasmapolymer

B. Finke, K. Schröder, INP Greifswald



Titan

DOT GmbH, Rostock



Zetapotenzial

M. Frant, K. Liefeith, iba Heilbad Heiligenstadt



REM

EMZ Uni Rostock

FE-SEM + R_a Ti

U. Beck, R. Lange, H. Rebl, Uni Rostock

RT-PCR, WB

C. Bergemann, P. Müller, Uni Rostock

Techn. Assistenz

U. Kellner, INP Greifswald,

J. Wenzel, Uni Rostock



Finanzen



DFG Graduiertenkolleg, 1505/1

DFG, NE 560/7-1



BMBF, Pilotprojekt Campus PlasmaMed, No. 13N9779



Land M-V, VOCELL, EFRE: V220-630-08-TFMV-F-009

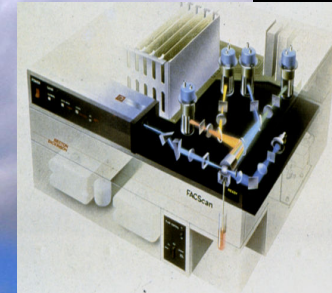


Biomedizinisches Forschungszentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Zellkulturlabore



Durchflusszytometrie



Western Blot



real-time RT PCR



Konfokale Laser
Raster Mikroskopie





AB Zellbiologie: Apparative Ausstattung:

- Konfokales Laser Raster Mikroskop LSM 410 (Carl Zeiss Jena)
- Durchflusszytometer FACSCalibur mit Macintosh Computer (Quadra 650) (BD Biosciences)
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35 mit Digitalkamera Intas
- Fluoreszenzmikroskop, Axio Scope. A1, aufrecht, Carl Zeiss mit Digitalkamera Axioacam MRC
- Lichtmikroskop Axiovert 25 mit Digitalkamera Canon
- Zellkultureinrichtung: Laminarboxen, Brutschränke
- Gelelektrophoreseapparaturen mit Blot Vorrichtung
- Sequence Detection System ABI 7000 (Applied Biosystems) real time RT-PCR (TaqMan)
- PCR Workstation (2x) (NUNC)
- Spektralphotometer Genesys 10 Bio (Thermoelektron) für mRNA/DNA-Quantifizierung
- Fluoreszenzreader v. ANTHOS für Colorimetr. Best. ALP, MTS
- Zellcounter CASY Model DT Vers. 2.2 D (Schärfe Systeme)
- BioPlex Gerät von BioRad, Bead-basiert für Signalproteine
- Molecular Imager (Western Blot) von BioRad

...Fortsetzung Apparative Ausstattung:

zentrale Forschungsgeräte der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock:

Konfokales LSM Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsysteme)

- Raster-Elektronenmikroskop (DSM 960 A, Carl Zeiss)

- Transmissions-Elektronenmikroskop (Liebra 120, Carl Zeiss)

AB Zellbiologie: Zellbiologische Analysen:

- Morphologie: über REM, Transmission, Lichtmikroskop, Membranfärbung (PKH-26)

- Attachment: Adhäsion, Spreading

- Proliferation: Zellzyklusphasen (in %), BrdU Inkorporation, PCNA, KI-67, Cykline

- Apoptose: sub G1-Peak (in %), Annexin V, Bax Translokation, Caspase-Aktivierung, Oligonukleotid-Abspaltung

- Expression: Integrine (z.B. $\alpha 2\beta 1$ für Kollagen I); CD44

- Zelladhäsion: Aktinzytoskelett, Integrine, Vinkulin, Paxillin, Tensin, ZO-1, Cadherine

- Signalproteine: Fokale Adhäsionskinase, MAPK, ERK $\frac{1}{2}$, I κ B-alpha, Akt
intrazelluläre Ca²⁺ -Mobilisierung

- Differenzierung: ALP, BSP, OCN, OP, Kollagen: Transkriptions- und Translationslevel

AB Zellbiologie: Primäre Zellen und Zelllinien – Besitz und Erfahrung:

- Epithelzellen:
 1. Linsenepithelzellen (human) HLE-B3
 2. Mammaepithelzellen MCF-7, MCF-12 (ATCC) (human) und primäre, humane Mammaepithelzellen
 3. Hepatozyten mHepR1 (Maus)

- Fibroblasten: L-929 (ATCC)
- Stammzellen: human, mesenchymal (Lonza)
- Gingiva-Zellen:
 1. HGF-1
 2. Ca9-22

- Osteoblasten:
 1. MG-63 (human, ATCC – *American Type Culture Collection*)
 2. SAOS-2 (human)
 3. U-2 OS (human)
 4. HOB-p (humane, primäre Osteoblasten von PromoCell) oder primäre Zellen von Patienten der OUK

- Osteoklasten: Progenitorzellen, human (Lonza)