

Passgenaue Attraktivität

Chemisch maßgeschneiderte Grenzschichten steuern Prozesse

Ob wir uns zu einem anderen Menschen hingezogen fühlen oder von ihm abgestoßen werden, entscheidet sich oft aufgrund des ersten visuellen Eindrucks. Das Gesicht, der Körper, Gestik und Mimik fesseln oder langweilen uns. Oberflächliche Eindrücke. Nicht anders ist das in der Materialwissenschaft. Auch hier entscheiden Oberflächen über die Art und die Stärke ihrer Wechselwirkungen mit der Umgebung. Bei vielen Anwendungen im Bereich der Lebenswissenschaften müssen solche Wechselwirkungen minimiert werden. Das Ziel sind hier Oberflächen, die nicht zu Verunreinigungen führen und biologisch inaktiv sind. Diese Eigenschaften werden auch als *non-fouling* und *bioinert* bezeichnet. Für Biomaterialien, die im Kontakt mit Zellen oder Geweben angewendet werden, benötigt man dagegen *biokompatible* oder *bioaktive* Oberflächen, welche bestimmte Substanzen binden, andere jedoch abweisen. Auch Wege zur gesteuerten und starken Bindung von Substanzen, zum Beispiel Biomolekülen, an der Oberfläche von Materialien sind von größtem Interesse. Hier wird das Ziel verfolgt, *affine*, für bestimmte Verbindungen geeignete Oberflächen herzustellen, wobei Art und Stärke der Wechselwirkungen gezielt eingestellt werden sollen.

Solche Affinitätstechnologien basieren auf der spezifischen und umkehrbaren Bindung eines Moleküls an einen Rezeptor, welcher sinnvollerweise an der Oberfläche eines festen Trägers fixiert ist. Auf diese Weise können in komplexen Gemischen ganz bestimmte Moleküle dadurch erkannt werden, dass nur sie an der Trägeroberfläche haften bleiben. Dieses Verfahren lässt sich für den analytischen Nachweis oder für die präparative Reinigung nutzen (Abb. 1). Eine sehr attraktive Alternative zu biologischen Rezeptoren sind die in den letzten Jahren entwickelten funktionellen nanoskaligen Kavitäten, so genannte molekulare Abdrücke in molekular geprägten Polymeren (MIPs) – also Kunststoffverbindungen. Die Synthese von MIPs aus synthetischen Bausteinen (Monomeren oder Polymeren) mit funktionellen Haftgruppen erfolgt in Gegenwart eines Templates, einer Art molekularer Schablone, und führt zu einem Polymernetzwerk oder Festkörper mit spezifischen Bindungsstellen für das Templat. Diese stabilen synthetischen Materialien funktionieren ähnlich wie Antikörper (*Plastic Antibodies*) oder Enzyme (*Plastic Enzymes*).

Proteine spielen im Zusammenhang mit bioinerten, bioaktiven oder affinen Oberflächen eine Schlüsselrolle. Proteine lagern sich an nahezu allen Oberflächen an und ändern dabei ihre dreidimensionale Struktur. Daraus ergibt sich meist eine verringerte biologische Aktivität. Bei

der Isolierung und Identifizierung oder der biotechnologischen Herstellung und Reinigung kommen Proteine zwangsläufig mit Oberflächen in Kontakt. Dies kann durch die oben beschriebenen Eigenschaften zu ungewollten Veränderungen oder Verlusten wertvoller Substanzen führen. Eine weitere unerwünschte Konsequenz von Proteinadsorptionsprozessen ist das so genannte Proteinfouling, also die Verunreinigung

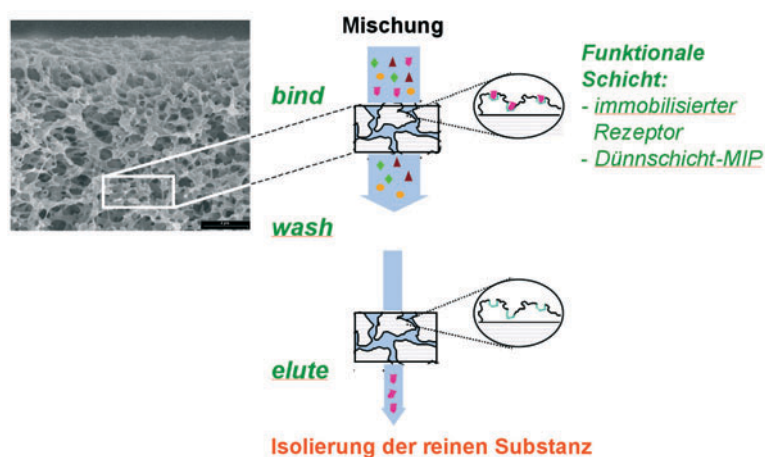
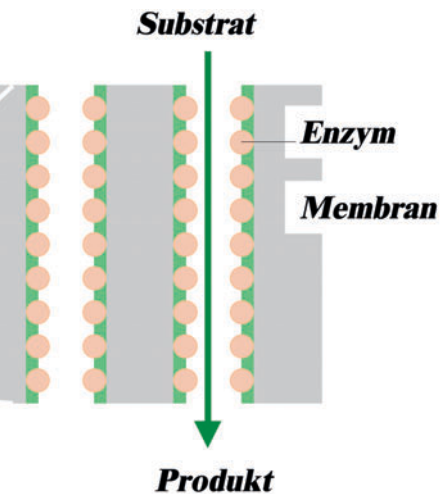
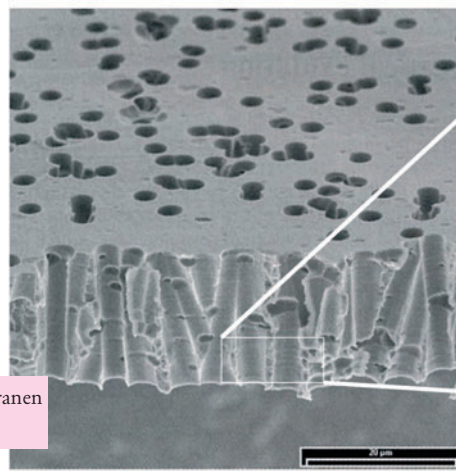


Abbildung 1: Affinitätsreinigung (hier substanz-spezifische Festphasenextraktion) mit porösen Membranadsorbern.

von Oberflächen. Solche Ablagerungen können im Extremfall zur Folge haben, dass Trenn- oder Analyseverfahren ab einem bestimmten Grad der Verschmutzung nicht mehr funktionieren. Die Entwicklung von wirksamen bioinerten Oberflächen ist deshalb nach wie vor äußerst



Abbildung 2: Poröse Enzymmembranen als katalytische Mikroreaktoren.



wichtig. Andererseits kann man eine Fixierung von Proteinen an Oberflächen auch gezielt etwa für die Proteintrennung bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen für therapeutische Anwendungen oder bei der Proteinanalytik (vor allem für die Proteomforschung) nutzen. Gegenwärtig gibt es in der Proteomanalytik eine besonders dynamische Entwicklung. Sie reicht von konventionellen manuellen Analyseverfahren über parallelisierte und zum Teil bereits automatisierte Verfahren im so genannten Mikrotiterplattenformat zu noch wesentlich höher integrierten und damit kleineren Mikroarrays, zum Beispiel so genannten *BioChips* oder *Lab-on-a-Chip*-Systemen. Dabei führt die Miniaturisierung in Kombination mit einer effektiven Signalerzeugung und -erfassung zu einer drastischen Verringerung des Probenbedarfs sowie des Analyseaufwands. Solche Mikroarrays sind geeignet für vielfältigste Anwendungen wie die Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, das Screening von Wirkstoffen als potenzielle Arzneimittel sowie diverse diagnostische Anwendungen. Die Entwicklung von Verfahren zur Fixierung von Proteinen, Anti-

körpern oder Enzymen auf festen Trägern unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität ist dabei von grundsätzlicher Bedeutung. Hierbei wird eine optimale Balance zwischen bioinerten und affinen Eigenschaften der Oberflächen angestrebt.

Letztlich werden die Wechselwirkungen lebender Zellen oder Gewebe mit so genannten Biomaterialien ebenfalls entscheidend durch die Art, Menge und biologische Aktivität von an der Oberfläche gebundenen Proteinen beeinflusst. Solche Proteine (zum Beispiel Adhäsionsproteine) können entweder bereits im Kulturmedium vorhanden sein oder aber von den Zellen sekretiert werden. Eine rationale Entwicklung von biokompatiblen Materialien muss die Struktur von Proteinen im Kontakt mit Oberflächen durch eine maßgeschneiderte Grenzflächenstruktur berücksichtigen.

Steuerbare Wechselwirkungen

Eine Arbeitsgruppe der Universität Duisburg-Essen um Mathias Ulbricht beschäftigt sich mit der Herstellung, Beschreibung und potenziellen Anwendungen von dünnen funktionalen Polymerschichten auf diversen Trägermaterialien. Im Mittelpunkt stehen die gezielte Einstellung der chemischen Zusammensetzung sowie der molekularen Architektur in Kombination mit für das Basismaterial zerstörungsfreien Reaktionsbedingungen. Letzteres ist insbesondere für den Einsatz von porösen Trägermaterialien wie zum Beispiel Trennmembranen wesentlich (Abb. 1). Spezielle Entwicklungen führen zu neuartigen Reaktorkonzepten (Abb. 2). Die Funktionalisierungen beruhen meist auf licht-

Template
Functional
monomer
Crosslinker



Photoinitiator

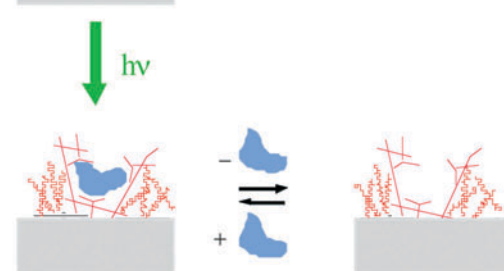
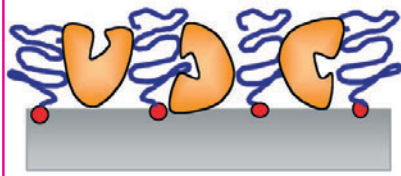
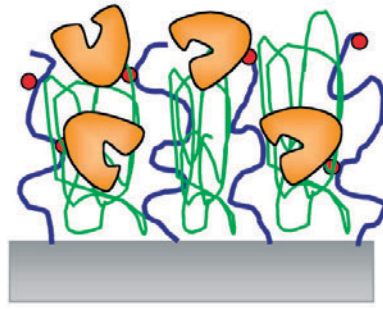


Abbildung 3: Synthese von Dünnschicht-MIPs durch photoinitierte Oberflächenfunktionalisierung.

Abbildung 4: Wege zu chemisch maßgeschneiderten Grenzschichten für die Erkennung und Fixierung von Proteinen.



a. Molekular heterogene Oberflächen, synthetisiert durch kontrollierte Adsorption und anschließende Fixierung amphiphiler (photo)reaktiver und hydrophiler Makromoleküle auf einem hydrophoben polymeren Träger – Stabilisierung der Konformation adsorbierter Proteine durch benachbarte hydrophile flexible Makromoleküle.



b. Pfropfcopolymeren mit minimaler unspezifischer Proteinbindung, reaktiven Gruppen für die kovalente Fixierung von Proteinen sowie Matrixeigenschaften, welche die Proteinkonformation stabilisieren.



c. Molekular geprägte Schichten für die Erkennung von Proteinen (Protein-Dünnschicht-MIPs) – Nachahmung der hochspezifischen molekularen Erkennung durch biologische Rezeptoren (zum Beispiel Antikörper) mit Hilfe stabiler synthetischer Polymere.

gesteuerten Reaktionen an der Oberfläche der polymeren oder organisch modifizierten Trägermaterialien. Dabei besitzen alle funktionalen Polymerschichten typischerweise Dicken im unteren Nanometerbereich.

Besonders spezialisiert sind die Essener Chemiker auf molekular geprägte dünne Schichten (*Dünnschicht-MIPs*), die im Vergleich zu konventionellen MIPs eine Reihe von Vorteilen aufweisen (Abb. 3). Die von der Arbeitsgruppe Ulbricht entwickelte Synthese von Dünnschicht-MIPs durch kontrollierte photoinitierte Oberflächenfunktionalisierung stellt eine bedeutende Erweiterung der MIP-Technologie dar. Die wichtigste Schlussfolgerung der bisherigen Arbeiten ist, dass der Träger genutzt werden kann, um die MIP-Synthese zu steuern (*Vorordnung*) und um die erhaltenen Dünnschicht-MIP-Rezeptoren zusätzlich zu stabilisieren (*Fixierung*).

Die Charakterisierung der funktionalen Schichten erfolgt durch Kombination von speziellen Methoden zur Oberflächenanalytik wie zum Beispiel Rasterkraftmikroskopie, Kontaktwinkel- und Strömungspotenzialmessungen sowie Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie. Darüber hinaus liefern Immunoassays und die Oberflächenplasmonenresonanz Aussagen darüber, ob das verwendete Material zur Fixierung bzw. Erkennung von Protein geeignet ist. In Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen werden zusätzlich Experimente zum Verhalten der Materialien in Zell- und Gewebekulturen durchgeführt.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse kann mit maßgeschneiderten Grenzschichten die Wechselwirkung der Materialien mit Biomolekülen und

Zellen kontrolliert werden. Je nach Erfordernis kann zwischen einer vollständigen Abschirmung (*non-fouling* / *bioinert*) und der selektiven Bindung eines Moleküls (*affin*) oder aber einer optimalen Konditionierung unter Zellkulturbedingungen (*biokompatibel* / *bioaktiv*) gewählt werden. Hierzu verfolgt die Arbeitsgruppe derzeit unterschiedliche Strategien (Abb. 4).

Biokompatible Grenzschichten

Die Kontrolle der Grenzflächeneigenschaften von Polymermaterialien ist von großer Bedeutung für ihre Biokompatibilität, für ihre komplexen Wechselwirkungen mit Proteinen, Zellen und Geweben. Hydrophobe, also wasserabweisende Oberflächen, ziehen größere Mengen von Proteinen an. Die Proteine verändern sich dabei oft, verlieren ihre biologische Aktivität und in der Folge ihre Anziehungskraft auf Zellen im Kontakt mit diesen Oberflächen. Hydrophile, also wasseranziehende und flexible Oberflächenschichten, können dagegen das Basismaterial sehr gut gegen den direkten Kontakt mit Proteinen und Zellen abschirmen. Dies hat jedoch den Nachteil, dass durch diese Abschirmung keine Kontrolle oder Steuerung einer Zell- bzw. Gewebekultur durch das Trägermaterial möglich ist.

Die Arbeitsgruppe um Mathias Ulbricht verfolgt einen alternativen Weg zur Optimierung der Biokompatibilität hydrophober Materialien: Man gestaltet mit Hilfe von so genannter Pfropfmodifizierung gezielt molekular heterogene, also ungleichmäßige Oberflächen. Als Bausteine werden hydrophile biokompatible Polymere wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG) so verändert, dass sie eine hydrophobe und gegebenen-

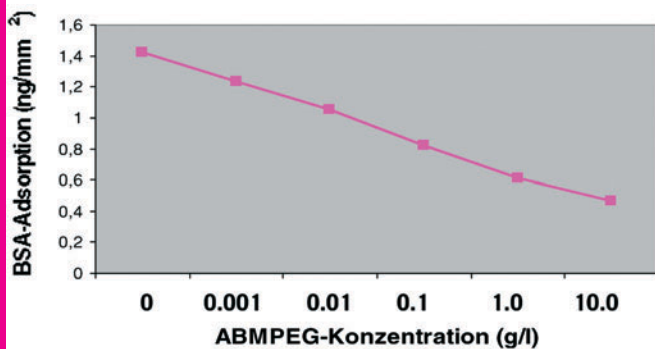


Abbildung 6: Molekular heterogene Modifizierung der Oberfläche von Polystyrol mit einem photoreaktiven Polyethylenglykol (ABMPEG, ca. 5000 g/mol): Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz zeigen die systematische Abnahme der adsorbierten Proteinmenge (Rinderserumalbumin, BSA, pH = 7) in Abhängigkeit von der Wahl der ABMPEG-Konzentration in Lösung.

falls auch photoreaktive, auf Licht ansprechende Endgruppe besitzen. Man erhält also amphiphile Makromoleküle, die zur einen Seite hin hydrophil, zur anderen hydrophob wirken. Diese können mit ihrer Kopfgruppe an der hydrophoben Oberfläche andocken und bei Verwendung von photoreaktivem PEG dort auch reaktiv fixiert werden. Der Grad der Heterogenität der Oberfläche (Abb. 5) kann je nach Anforderung angepasst werden. Die hydrophoben Zwischenräume zwischen den flexiblen hydrophilen Makromolekülen mit Dimensionen im unteren Nanometerbereich bieten Raum für die Adsorption von Proteinmolekülen (Abb. 6), welche somit an der Oberfläche fixiert und gleichzeitig durch die benachbarten Makromoleküle stabilisiert werden. Auf diese Weise wird

die biologische Aktivität der Proteine erhalten (Abb. 4a).

Für eine Reihe unterschiedlicher Zellarten konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine optimale PEG-Dichte die Anheftung, die Ausbreitung, das Wachstum und die Vermehrung der Zellen im Vergleich zu hydrophoben oder vollständig hydrophilen Oberflächen signifikant verbessert werden kann.

Grenzschichtstrukturen aus dem Baukasten

Mit einer so genannten *kontrollierten photoinitierten Pfropfcopolymerisation* kann man schwer funktionalisierbare Polymere wie zum Beispiel Polystyrol oder Polypropylen, die als Trägermaterial dienen, kovalent modifizieren. Bei diesem Verfahren wird die Kettenstruktur des Polymers sehr gezielt aus unterschiedlichen Monomeren aufgebaut. Der entscheidende Vorteil dieser Beschichtungstechnologie ist ihre Vielseitigkeit unter schonenden Bedingungen. Durch die Auswahl der Monomere (zum Beispiel funktionelle Acrylate oder Acrylamide) und der weiteren Reaktionsparameter können nach einem *Baukastenprinzip* verschiedene Schichtzusammensetzungen bzw. -morphologien, funktionelle Gruppen und deren Konzentration, Hydrophilie, etc. sowie Pfropfkettlänge und -dichte eingestellt werden. Diese Beschichtungen können dann auch auf kommerzielle Basismaterialien wie zum Beispiel Mikrotiterplatten übertragen werden (Abb. 7).

Aktuell stehen die speziellen Anforderungen an solche dünnen Polymerschichten für die Fixierung empfindlicher Proteine im Zentrum der

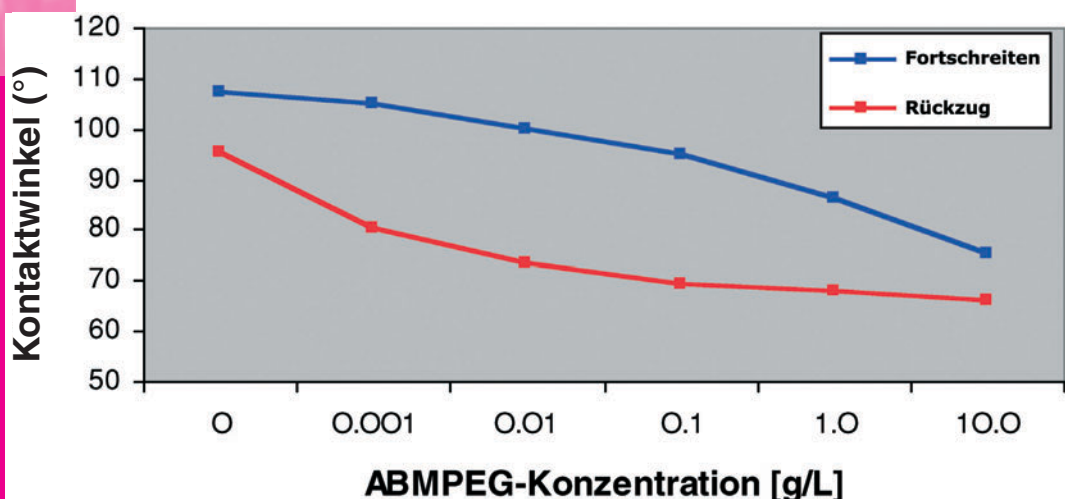


Abbildung 5: Molekular heterogene Modifizierung der Oberfläche von Polystyrol mit einem photoreaktiven Polyethylenglykol (ABMPEG, ca. 5000 g/mol): Dynamische Kontaktwinkelmessungen zeigen die Heterogenität der Oberfläche (Hysterese = Differenz zwischen Fortschritt- und Rückzugswinkel) in Abhängigkeit von der Wahl der ABMPEG-Konzentration in Lösung.

Abbildung 7: Pfropfpolyacrylsäure-funktionalisierte 96-Well Mikrotiterplatte aus Polypropylen: Die Färbung mit einem carboxyl-reaktiven Farbstoff zeigt die hohe und sehr gleichmäßige Bindungskapazität der Oberfläche in jedem Well (ELIPSA GmbH, Berlin).



Forschungsarbeiten in Essen. Ziel ist eine dreidimensionale Schichtstruktur mit Größen im unteren Nanometerbereich, welche eine hohe Flexibilität, geringe unspezifische Wechselwirkungen, aber auch die Fähigkeit zur Stabilisierung fixierter Proteine aufweisen soll. Diese besonderen Eigenschaften werden durch eine Kombination von synthetischen Monomer- und Polymerbausteinen mit natürlichen oder Biopolymeren wie zum Beispiel Dextran, Zellulose oder Agarose erreicht. Die reaktiven Gruppen in den funktionalen Polymerschichten bieten vielfältige Möglichkeiten zur Immobilisierung von Proteinen (Enzymen, Antikörpern) über variable kovalente Methoden (Amino-, Thio-, Carboxy- oder Aldehydgruppen; Abb. 8 und Abb. 4b).

Vorläufige Ergebnisse zeigen weiterhin, dass nach einem Verfahren zur Synthese von Dünnschicht-MIPs analog zu Abbildung 3 mit einem Modellprotein (Lysozym) als Templat auch MIP-Rezeptoren für Proteine erhalten werden können. Diese Protein-Dünnschicht-MIPs haben eine höhere Proteinaffinität als das Basismaterial und Kontrollmaterialien, welche ohne Protein präpariert wurden, sowie eine deutlich größere Affinität für das Templat im Vergleich zu anderen Proteinen, das heißt sie können ähnlich wie ein Antikörper das Zielprotein molekular erkennen (Abb. 4c).

Kontakt

Prof. Dr. Mathias Ulbricht
Dipl.-Chem. Melvy G. Chuquimia-Beltran
Dipl.-Chem.-Ing. Dimitrios Lazos

Institut für Technische Chemie II

Tel. 02 01/1 83-31 51 oder -31 44 (Sekretariat)

Fax: 02 01/1 83-31 47

mathias.ulbricht@uni-essen.de

<http://www.uni-essen.de/tech2chem/>

Abbildung 8: Biofunktionalisierung der Oberfläche von Polystyrol:

Durch Variation der Monomerkonzentration (hier Acrylsäure) können Funktionalgruppenmenge und Morphologie der funktionalisierten Schicht gezielt maßgeschneidert werden, wobei wahlweise eine *Tentakel*- oder *Bürsten*-Struktur erhalten wird.

Dadurch wird die Bindungskapazität für die kovalente Fixierung von Protein (hier Rinderserumalbumin, BSA, pH = 7) gezielt angepasst.

Anschließende Untersuchungen mit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zeigen die Zugänglichkeit des immobilisierten Proteins für primäre und sekundäre Antikörper: Sie ist wesentlich besser für die offene, flexible *Tentakel*-im Vergleich zur kompakten *Bürsten*-Struktur.

