

Kontrollierte Zelladhäsion auf PEG-basierten schaltbaren Oberflächen**

Erik Wischerhoff, Katja Uhlig, Andreas Lankenau, Hans G. Börner, André Laschewsky,*
Claus Duschl* und Jean-François Lutz*

Mit Poly(ethylenglycol) (PEG) oder Oligo(ethylenglycol) beschichtete Oberflächen sind meist die Materialien der Wahl, wenn man eine Bioadhäsion vermeiden möchte.^[1] Zum Beispiel beschreiben zahlreiche Veröffentlichungen die Proteinabstoßenden Eigenschaften PEG-modifizierter Substrate.^[2] Der abweisende Effekt ist im Wesentlichen auf die sterische Abstoßung zwischen dem neutralen, hydratisierten PEG und Proteinen zurückzuführen.^[3] Da Zelladhäsion im Allgemeinen durch Proteinadsorption initiiert wird, sind solche PEG-modifizierten Oberflächen auch zellabweisend.^[4] Daher wurden PEG-beschichtete Materialien ausgiebig hinsichtlich ihrer Eignung für Bioanwendungen (z.B. blutkompatible Materialien oder Implantate und Träger für den Wirkstoff- und Gentransport) untersucht.

PEG-Oberflächen, die biologische Spezies abweisen können, sind zwar äußerst nützlich, allerdings handelt es sich bei ihnen um passive Materialien; einige aktuelle Entwicklungen in den Biowissenschaften und der Biotechnologie erfordern jedoch „intelligente“ Oberflächen mit ausgefeilten Eigenschaften. Beispielsweise sind schaltbare Oberflächen, die die Möglichkeit reversibler biologischer Wechselwirkungen bieten, von großer Bedeutung für die Trennung biologischer Spezies, die Kontrolle biologischer Aktivität, biologische Nachweisverfahren, Biosensoren oder die Zellmanipulation. Solche „intelligenten“ Oberflächen können z.B. mithilfe stimuliresponsiver Polymere hergestellt werden.^[5] So

sind das thermoresponsive Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) und verwandte Polyacrylamide ausgiebig im Hinblick auf die Herstellung bioaktiver schaltbarer Oberflächen untersucht worden.^[6] PNIPAM weist eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST) von 32 °C auf und ist derzeit die am besten untersuchte Substanz, die ihre Oberflächeneigenschaften beim Wechsel von Raumtemperatur zu physiologischer Temperatur ändert. PNIPAM ist allerdings nicht bioinert: Es enthält in jeder Wiederholungseinheit sekundäre Amidfunktionen, die kooperative H-Brücken mit anderen amidhaltigen Polymeren, besonders mit Proteinen, bilden können.^[7] Daher ist die Entwicklung effizienter schaltbarer Oberflächen auf Basis anderer chemischer Strukturen von großem Interesse. Oberflächen, die die Schalteigenschaften von PNIPAM mit der Fähigkeit von hydratisiertem PEG zur Verhinderung unspezifischer Adsorption verbinden, sind vielversprechend für eine Reihe von Anwendungen in den Biowissenschaften.

Wie von uns und anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt, bilden aus kurzkettigen Oligo(ethylenglycol)methacrylaten aufgebaute Makromoleküle eine interessante neue Klasse thermoresponsiver Polymere.^[8] So zeigen statistische Copolymeren Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA) aus 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat (MEO₂MA) und Oligo(ethylenglycol)methacrylat (OEGMA) untere kritische Lösungstemperaturen, wobei die Übergangstemperatur über die Comonomerzusammensetzung präzise einstellbar ist. Copolymeren mit 5, 8 und 10% OEGMA-Anteil haben Trübungspunkte von 32, 37 bzw. 39 °C in reinem Wasser.^[9] Außerdem hat sich gezeigt, dass die Phasenübergänge reversibel sind und die Übergangstemperaturen nur wenig von Parametern wie Kettenlänge, Polydispersität, Polymerkonzentration oder Ionenstärke beeinflusst werden. Daher sind Copolymeren aus MEO₂MA und OEGMA interessante Kandidaten für thermoresponsive Materialien, insbesondere für biomedizinische Beschichtungen.

Polymerbeschichtungen aus Oligo(ethylenglycol)methacrylaten lassen sich auf ebenen Oberflächen einfach herstellen, und zwar entweder durch oberflächeninitiierte radikalische Atomtransferpolymerisation (ATRP) oder durch Adsorption definierter Polymere mit Ankergruppen.^[10] Polymerbürsten aus längerkettigen PEG-Methacrylaten (fünf Ethylenoxideinheiten oder mehr) verhalten sich wie biorepulsive PEG-Beschichtungen,^[11] was jedoch nicht unbedingt für die kurzkettigen Varianten gilt. Jonas et al. berichteten z.B. kürzlich, dass Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-Bürsten, die durch oberflächeninitiierte Polymerisation hergestellt wurden, LCST-Werte zeigen, die denen der Copolymeren in wässriger Lösung entsprechen.^[12] Die partielle Dehydrierung

[*] Prof. Dr. A. Laschewsky

Universität Potsdam

Karl-Liebknecht-Straße 24–25, Potsdam 14476 (Deutschland)

Fax: (+49) 331-977-5036

E-Mail: andre.laschewsky@rz.uni-potsdam.de

K. Uhlig, Dr. A. Lankenau, Dr. C. Duschl

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik

Am Mühlenberg 13, Potsdam 14476 (Deutschland)

Fax: (+49) 331-58187-399

E-Mail: claus.duschl@ibmt.fraunhofer.de

D. E. Wischerhoff, Dr. J.-F. Lutz

Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung

Geiselbergstraße 69, Potsdam 14476 (Deutschland)

Fax: (+49) 331-568-3000

E-Mail: lutz@iap.fhg.de

Homepage: <http://www.bioactive-surfaces.com>

D. H. G. Börner

Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

Am Mühlenberg 1, Potsdam 14476 (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Fraunhofer-Gesellschaft und der Max-Planck-Gesellschaft (Exzellenznetzwerk „Synthetische bioaktive Oberflächen“).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801202> zu finden.

und die Konformationsänderung dieser oberflächengebundenen Polymerbürsten oberhalb der LCST können von praktischem Interesse für die Steuerung von Bioadhäsion sein.^[13]

Wir haben in der hier vorgestellten Arbeit untersucht, ob sich mit Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA) modifizierte Goldoberflächen für die Steuerung der Zelladhäsion eignen. Dabei ist es wichtig, die Temperaturschwankungen gering zu halten, da die Säugerzellen sonst Schaden nehmen könnten. Idealerweise soll die Oberfläche bei physiologischer Temperatur Zelladhäsion ermöglichen und bei Raumtemperatur zellabstoßend wirken. Um dies zu erreichen, haben wir ein Copolymer mit 10% OEGMA-Einheiten ausgewählt. Dieses Copolymer zeigt eine LCST von 39°C in reinem Wasser, in PBS-Puffer sinkt die Übergangstemperatur durch einen schwachen Aussalzeffekt auf 35°C (Abbildung 1a), womit sie für den vorgegebenen Zweck ideal ist.

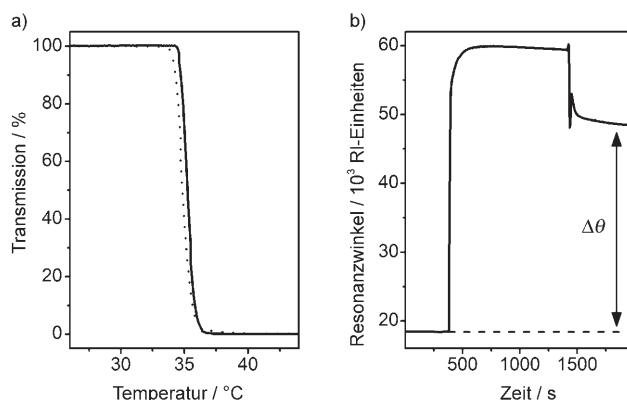
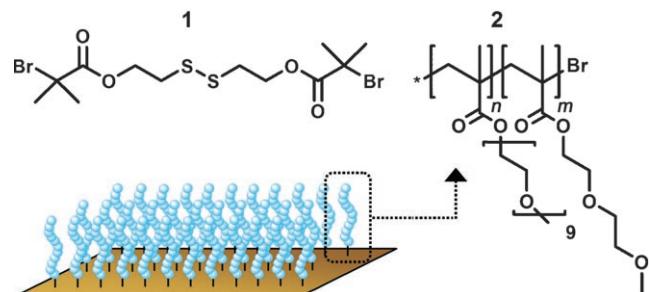


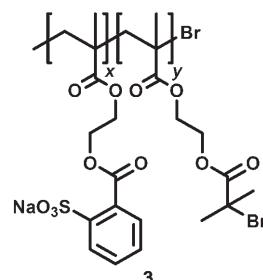
Abbildung 1. a) Trübungsmessung für eine Lösung von Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA) (2; 3 mg mL⁻¹) in PBS-Puffer (siehe Hintergrundinformationen). Das Polymer wurde durch ATRP unter Verwendung von Initiator **1** hergestellt. —: Heizkurve,: Kühlkurve. b) Funktionalisierung einer Goldoberfläche mit Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA) (2) nach Strategie A, verfolgt mit SPR. θ : Resonanzwinkel, RI = Brechungsindex.

Um das Potenzial dieser thermoresponsiven Copolymeren zu untersuchen, wurden drei Strategien zur Oberflächenmodifizierung eingesetzt: Nach Strategie A wurde definiertes Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA) durch ATRP in Lösung unter Verwendung des Disulfid-Initiators **1** (Schema 1) hergestellt und zur Adsorption auf Goldoberflächen verwendet („Grafting Onto“). Nach Strategie B wurde **1** zuerst auf einer Goldoberfläche adsorbiert, die anschließend zur Initiierung einer Atomtransferpolymerisation von OEGMA und MEO₂MA in Ethanol/H₂O-Mischungen verwendet wurde („Grafting From“). Nach Strategie C wurde die Goldoberfläche zuerst mit einem Polyelektrolytmultischichtaufbau versehen, der nachfolgend mit dem anionischen ATRP-Makroinitiator **3** funktionalisiert wurde („Grafting From“ mit Makroinitiator).^[14] Diese Oberfläche wurde anschließend mit Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-Bürsten modifiziert, entweder mithilfe von Standard-ATRP oder unter AGET-Bedingungen.^[15]

Alle Oberflächenmodifizierungsstrategien führten zu Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-Beschichtungen auf Gold.



Schema 1. Disulfid-Initiator **1** und thermoresponsive Copolymer Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA) (**2**), die für die Beschichtungen verwendet wurden.



Beispielsweise wurde die Adsorption von Polymer **2** auf Gold (Strategie A) in Echtzeit mithilfe von Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) verfolgt (Abbildung 1b). Die Kontaktwinkel der Goldoberflächen mit Wasser änderten sich von 70° für die unmodifizierte Goldoberfläche auf 50° für Oberflächen mit Polymerbeschichtung (Messung bei 25°C). Diese Werte stimmen gut mit Literaturdaten überein.^[12] Bei 37°C waren die Kontaktwinkelwerte um etwa 5° höher, was auf eine Änderung der Oberflächeneigenschaften hindeutet. Die nach den Strategien B und C beschichteten Oberflächen wurden mit SPR, Röntgenphotoemissionsspektroskopie und Ellipsometrie charakterisiert (Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Sowohl Standard- als auch AGET-ATRP ermöglichen eine effiziente Oberflächenmodifizierung mit Polymerbürsten.

Die drei verschiedenen Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-beschichteten Goldoberflächen wurden für die Kultur von L929-Mausfibroblasten bei 37°C verwendet. Die Fibroblasten breiteten sich auf allen Oberflächen aus und hafteten fest daran (Abbildung 2a), was zeigt, dass Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-beschichtete Oberflächen bei physiologischer Temperatur die Bioadhäsion fördern. Die maximale Adhäsion wurde typischerweise 40 h nach Beginn der Kultivierung erreicht (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Eine ähnliche Adsorptionskinetik findet man auch auf PNIPAM-modifizierten Oberflächen.^[16]

Wurde die Temperatur der Kultur auf 25°C abgesenkt, fand innerhalb von etwa 30 min eine Zellabrundung statt (Abbildung 2b). Diese ermöglichte ein Ablösen und Ein-sammeln der Zellen durch vorsichtiges Spülen bei Raumtemperatur. Auf unbehandelten Goldoberflächen trat dieser Effekt bei Abkühlung auf 25°C nicht ein. Demnach können Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-beschichtete Goldoberflächen

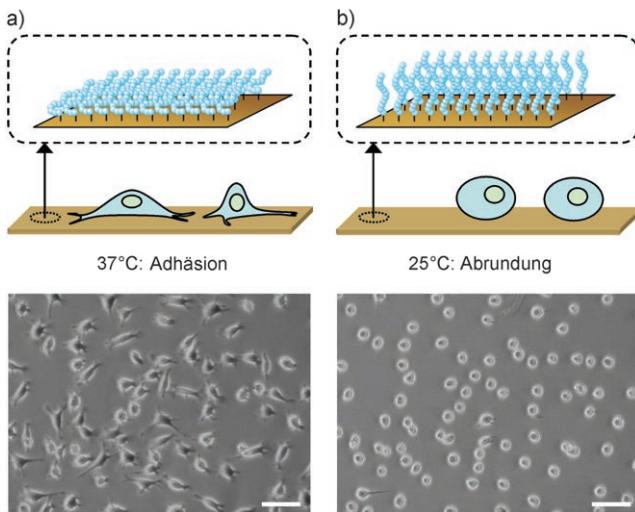


Abbildung 2. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von L929-Mausfibroblasten auf Poly(OEGMA-*co*-MEO₂MA)-beschichteten Goldoberflächen a) nach 44 h Inkubation bei 37°C, b) 30 min nach Abkühlen der Probe auf 25°C. Die hier gezeigte Oberfläche wurde nach Strategie C modifiziert. Maßstab: 100 µm. Die Zeichnungen im oberen Teil veranschaulichen den Zustand der Polymerbeschichtung bei 37 (a) und 25°C (b).

zwischen einem die Zellausbreitung fördernden und einem zellabweisenden Zustand, der dem Verhalten von konventionellem PEG entspricht, geschaltet werden. Bemerkenswerterweise ist ein mehrfaches Schalten der Zellen zwischen den Zuständen möglich (Daten nicht gezeigt).

Thermoresponsive Oligo(ethylenglycol)-basierte Oberflächen ermöglichen eine effiziente Steuerung der Zelladhäsion in einem gut zugänglichen und unter biologischen Gesichtspunkten geeigneten Temperaturbereich (25–37°C). Diese neuartigen Substrate vereinen einige Eigenschaften von PNIPAM (Schaltbarkeit) und PEG (Vermeidung von Bioadsorption bei Raumtemperatur). Unsere Erkenntnisse ebnen den Weg für die Entwicklung fortgeschrittenerer Oberflächen für die Zellkulturtchnik, die Trennung biologischer Spezies und diagnostische Anwendungen.

Eingegangen am 12. März 2008
Online veröffentlicht am 11. Juni 2008

Stichwörter: Biotechnologie · Materialwissenschaften · Oberflächenchemie · Polymere · Zelladhäsion

- [1] a) R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487–492; b) K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, *252*, 1164–1167; c) P. Kingshott, H. J. Griesser, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1999**, *4*, 403–412.
- [2] a) W. R. Gombotz, W. Guanghui, T. A. Horbett, A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25*, 1547–1562; b) K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714–10721; c) I. Szleifer, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1997**, *2*, 337–344.
- [3] a) S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149–158; b) T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer, K. Park, *Langmuir* **1998**, *14*, 176–186.
- [4] a) N. P. Desai, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **1991**, *12*, 144–153; b) H. Du, P. Chandaroy, S. W. Hui, *Biochim. Biophys. Acta*

Biomembr. **1997**, *1326*, 236–248; c) M. Zhang, T. Desai, M. Ferrari, *Biomaterials* **1998**, *19*, 953–960.

- [5] a) N. Nath, A. Chilkoti, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1243–1247; b) C. de las Heras Alarcón, S. Pennadam, C. Alexander, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 276–285.
- [6] a) T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, Y. Sakurai, *Biomaterials* **1995**, *16*, 297–303; b) E. Wischerhoff, T. Zacher, A. Laschewsky, E. D. Reka, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4771–4773; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4602–4604; c) A. Kikuchi, T. Okano, *Prog. Polym. Sci.* **2002**, *27*, 1165–1193; d) D. Cunliffe, C. de las Heras Alarcon, V. Peters, J. R. Smith, C. Alexander, *Langmuir* **2003**, *19*, 2888–2899.
- [7] a) H. Bianco-Peled, S. Gryc, *Langmuir* **2004**, *20*, 169–174; b) J.-Y. Wu, S.-Q. Liu, P. W.-S. Heng, Y.-Y. Yang, *J. Controlled Release* **2005**, *102*, 361–372; c) M. Keerl, V. Smirnovas, R. Winter, W. Richtering, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 344–347; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 338–341.
- [8] a) S. Han, M. Hagiwara, T. Ishizone, *Macromolecules* **2003**, *36*, 8312–8319; b) M. Mertoglu, S. Garnier, A. Laschewsky, K. Skrabania, J. Storsberg, *Polymer* **2005**, *46*, 7726–7740; c) D. Li, G. L. Jones, J. R. Dunlap, F. Hua, B. Zhao, *Langmuir* **2006**, *22*, 3344–3351; d) J.-F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules* **2006**, *39*, 893–896; e) J.-F. Lutz, J. Andrieu, S. Üzgün, C. Rudolph, S. Agarwal, *Macromolecules* **2007**, *40*, 8540–8543; f) Y. Maeda, T. Kubota, H. Yamauchi, T. Nakaji, H. Kitano, *Langmuir* **2007**, *23*, 11259–11265; g) S. i. Yamamoto, J. Pietrasik, K. Matyjaszewski, *J. Polym. Sci. Part A* **2008**, *46*, 194–202.
- [9] Scharfe Phasenübergänge treten nur dann auf, wenn Copolymeren aus MEO₂MA und OEGMA mithilfe einer kontrollierten Polymerisationsmethode hergestellt werden. Konventionelle radikalische Polymerisation liefert Substanzen mit schlecht definierten Eigenschaften. Weitere Informationen finden sich unter: a) J.-F. Lutz, Ö. Akdemir, A. Hoth, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13046–13047; b) J.-F. Lutz, K. Weichenhan, Ö. Akdemir, A. Hoth, *Macromolecules* **2007**, *40*, 2503–2508; c) J.-F. Lutz, *J. Polym. Sci. Part A* **2008**, *46*, 3459–3470.
- [10] a) J. Pyun, T. Kowalewski, K. Matyjaszewski, *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, *24*, 1043–1059; b) S. Edmondson, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 14–22; c) A. A. Brown, N. S. Khan, L. Steinbock, W. T. S. Huck, *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1757–1765; d) A. Oyane, T. Ishizone, M. Uchida, K. Furukawa, T. Ushida, H. Yokoyama, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2329–2332; e) B. S. Lee, J. K. Lee, W. J. Kim, Y. H. Jung, S. J. Sim, J. Lee, I. S. Choi, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 744–749.
- [11] a) P. Banerjee, D. J. Irvine, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 331–339; b) J. Hyun, H. Ma, Z. Zhang, T. P. Beebe, Jr., A. Chilkoti, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 576–579; c) H. W. Ma, J. H. Hyun, P. Stiller, A. Chilkoti, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 338–341; d) D. C. Popescu, R. Lems, N. A. A. Rossi, C.-T. Yeoh, J. Loos, S. J. Holder, C. V. C. Bouting, N. A. J. M. Sommerdijk, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2324–2329; e) S. Tugulu, P. Silacci, N. Stergiopoulos, H.-A. Klo, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2536–2546.
- [12] A. M. Jonas, K. Glinel, R. Oren, B. Nysten, W. T. S. Huck, *Macromolecules* **2007**, *40*, 4403–4405.
- [13] a) S. R. Sheth, D. Leckband, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8399–8404; b) P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426–436; c) S. Balamurugan, L. K. Ista, J. Yan, G. P. Lopez, J. Fick, M. Himmelhaus, M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14548–14549; d) H. M. Zareie, C. Boyer, V. Bulmus, E. Nateghi, T. P. Davis, *ACS Nano* **2008**, *2*, 757–765.
- [14] a) G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232–1237; b) P. Bertrand, A. Jonas, A. Laschewsky, R. Legras, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 319–348; c) S. Edmondson, C. D. Vo, S. P. Armes, G. F. Unali, *Macromolecules* **2007**, *40*, 5271–5278.

- [15] AGET steht für „activator generated by electron transfer“. Detaillierte Informationen über AGET-ATRP finden sich unter:
a) W. Jakubowski, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 4139–4146; b) W. Jakubowski, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem. 2006*, *118*, 4594–4598; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4482–4486.
-
- [16] a) T. Takezawa, Y. Mori, K. Yoshizato, *Bio/Technology* **1990**, *8*, 854–856; b) O. Ernst, A. Lieske, M. Jäger, A. Lankenau, C. Duschl, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1322–1329; c) J. Hentschel, K. Bleek, O. Ernst, J. F. Lutz, H. G. Börner, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1073–1075.