

Nach innen gerichteter Aufbau konzentrischer Polymerschichten: eine Methode zur Verkapselung von Biomolekülen mit simultaner Kodierung**

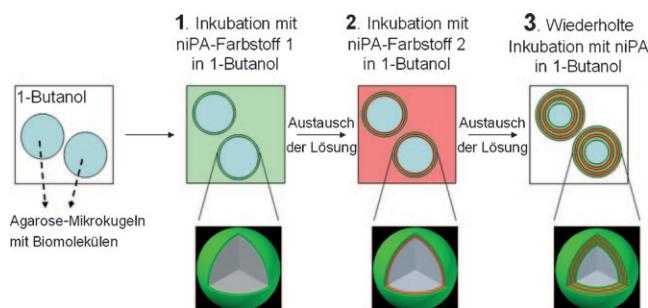
Jianhao Bai, Sebastian Beyer, Wing Cheung Mak, Raj Rajagopalan und Dieter Trau*

Gegensätzlich geladene Polyelektrolyte haben die Eigenschaft, Komplexe zu bilden, und wurden zur Erzeugung von Hydrogelpartikeln,^[1] zur Einführung von Genen in Zellen^[2] und zum Aufbau von sehr dünnen Polymermultischichten verwendet.^[3] Die Herstellung von Polyelektrolytmultischichten durch die Layer-by-Layer(LbL)-Technik wurde für eine Vielzahl von Anwendungen genutzt, insbesondere zur Verkapselung von Biomolekülen in Mikrokapseln.^[4] Die Verkapselung z.B. von Proteinen^[5] und DNA^[6] in Mikrokapseln kann für eine Vielzahl biomedizinischer Anwendungen genutzt werden. Weitere Anwendungsbereiche sind Biosensoren,^[7] Bioreaktoren,^[8] die zielgerichtete Ansteuerung von Zellen^[9] und die Freisetzung von Materialien oder Arzneistoffen.^[10] Eine Vielzahl an Verkapselungsmethoden für Biomoleküle wurde entwickelt; unseres Wissens ermöglicht jedoch keine dieser Methoden auch die gleichzeitige Kodierung der Kapseln mit dem Zweck ihrer Identifizierung.

Wir beschreiben hier einen nach innen gerichteten Aufbau von konzentrischen polymeren Multischichten in Agarose-Mikrokugeln, wobei durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Polymere mehrfarbig gestreifte kugelsymmetrische Schichten in den Mikrokugeln gebildet wurden. Die erzeugten konzentrischen Polymermultischichten dienen gleichzeitig zur Verkapselung von Biomolekülen und zur Kodierung der Mikrokugeln. Die Verwendung eines Hydro-

gels als Matrix stabilisiert nicht nur die Kugelform der Mikrokapseln, sondern erzeugt auch günstige Bedingungen für die darin eingeschlossenen Biomoleküle.

Die Kodierung der Mikrokapseln erfolgte durch eine Kombination von Farbe und Dicke der Polymerschichten. Wir haben die Bildung dieser Polymerschichten in Agarose- und in Alginat-Mikrokugeln untersucht (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1), führen aber im Folgenden nur die mit der Agarose-Matrix erhaltenen Resultate auf. Die Verfahrensschritte für den nach innen gerichteten Aufbau konzentrischer Polymerschichten in Agarose-Mikrokugeln sind in Schema 1 dargestellt. Agarose-Mikrokugelchen,



Schema 1. Prozess der nach innen gerichteten Bildung von farbigen konzentrischen Polymerschichten in der Hydrogelmatrix von Mikrokugeln zur Verkapselung von Biomolekülen und simultanen Kodierung der Kapseln.

die das zu verkapselnde Biomolekül enthielten, wurden zunächst in 1-Butanol suspendiert. Das organische Lösungsmittel verhinderte dabei eine Ausdiffusion und den Verlust von Biomolekülen in den weiteren Verfahrensschritten.^[11] Als Nächstes wurde fluoreszenzmarkiertes Polyallylamin in Form der freien Base („nicht ionisch“; niPA) gelöst in 1-Butanol hinzugegeben, um die erste farbige Schicht zu erzeugen. Anschließend wurden die Mikrokugeln mit 1-Butanol gewaschen und mit einem anderen niPA inkubiert, um die nächste Schicht zu erzeugen. Diese Inkubations- und Waschschriften wurden solange wiederholt, bis die gewünschte Zahl und Kombination farbiger konzentrischer Schichten erzeugt war (nicht fluoreszenzmarkiertes niPA kann ebenfalls zur Farbkodierung verwendet werden, wodurch eine nichtfarbige Schicht entsteht). Interessanterweise wurden so diskret abgegrenzte Polymerschichten erzeugt, die einen nach innen gerichteten Aufbau in die Agarose-Mikrokugeln mit jeder neuen Inkubation des niPA aufweisen – also nach innen

[*] Prof. Dr. R. Rajagopalan, Dr. D. Trau

Department of Chemical & Biomolecular Engineering

National University of Singapore

Engineering Drive 1, 117576 (Singapore)

Fax: (+65) 6872-3069

E-Mail: bietrau@nus.edu.sg

Homepage: <http://www.biosingapore.com>

J. Bai, S. Beyer, Dr. D. Trau

Division of Bioengineering, National University of Singapore

Engineering Drive 1, 117574 (Singapore)

S. Beyer

NUS Graduate School for Integrative Sciences and Engineering
(Singapore)

Dr. W. C. Mak

Department of Chemistry

Hong Kong University of Science and Technology (P.R. China)

[**] Wir danken der National University of Singapore (NUS 397-000-077-112) für finanzielle Unterstützung sowie Colin Sheppard und Lu Fa Ke für anregende Diskussionen und die Benutzung des Konfokal-mikroskops. Ebenso danken wir den Gutachtern für wertvolle Hinweise und Anregungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906498> zu finden.

wachsen. Im letzten Schritt des Verfahrens wurden die so gebildeten, mehrfarbig gestreiften kugelsymmetrischen Schichten durch Vernetzung mit Disuccinimidylsüberat (DSS) stabilisiert und dann in einen wässrigen Puffer (0.01× PBS; phosphate buffered saline) überführt.

Überlagerte lichtmikroskopische und konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Multischichtmikrokapseln mit unterschiedlicher Schichtenzahl sind in Abbildung 1

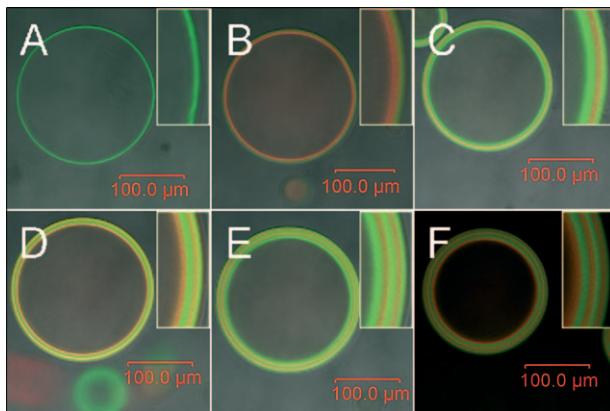


Abbildung 1. Überlagerte lichtmikroskopische und konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Agarose-Mikrokugeln mit unterschiedlicher Zahl von konzentrischen Schichten: A) eine Schicht (niPA-FITC), B) zwei Schichten (niPA-FITC/niPA-TRITC), C) drei Schichten (niPA-FITC/niPA-TRITC/niPA-FITC), D) vier Schichten ((niPA-FITC/niPA-TRITC)₂), E) fünf Schichten ((niPA-FITC/niPA-TRITC)₂/niPA-FITC) und F) sechs Schichten ((niPA-FITC/niPA-TRITC)₃). Die Einschübe zeigen jeweils vergrößerte Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Schichten. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, TRITC = Tetramethylrhodaminisothiocyanat.

dargestellt. Die erste farbige Schicht wurde durch Inkubation mit FITC-markiertem niPA (Abbildung 1 A) und die zweite Schicht durch Inkubation mit TRITC-markiertem niPA (Abbildung 1 B) erzeugt. Dieser Inkubationsprozess wurde wiederholt, um drei, vier, fünf und sechs nach innen gerichtete farbige konzentrische Schichten zu erzeugen, wie in den Abbildungen 1 C–F gezeigt. Die Reihenfolge der Schichten zeigt klar, dass jede neue Schicht von der Innenseite der vorhergehenden Schicht aufgebaut wurde, die Schichten also nach innen wachsen. Dieser Vorgang basiert auf der Eindiffusion von in 1-Butanol gelöstem niPA (Löslichkeit in 1-Butanol ca. 2.5 mg mL^{-1}) in die Agarose-Matrix der Mikrokugeln, getrieben durch einen Konzentrationsgradienten zwischen der externen Lösung und der internen Agarose-Matrix. Nach Eindiffusion bildet das niPA (Löslichkeit in Wasser $> 200 \text{ mg mL}^{-1}$) einen Komplex mit der Agarose (Abbildung S2).^[12] Die hier beschriebene nach innen gerichtete Bildung von Multischichten ist grundsätzlich neu und unterscheidet sich von der nach außen gerichteten Bildung von LbL-Schichten, die in bisher publizierten Arbeiten über den Transport von Polyanionen in entgegengesetzt geladene Hydrogele beschrieben wurde.^[13]

Beim Vergleich der von uns hergestellten Polymer-Schichten in Hydrogele mit früher beschriebenen Polymer-Schichten, die durch den aktiven Transport von linearen und

gegensätzlich geladenen Polyelektronen in Hydrogele gebildet wurden,^[13,14] kann Folgendes festgestellt werden: In beiden Fällen wird über stabile (Abbildung S3) und schichtweise angeordnete Hydrogel-Polymer-Komplexe berichtet, die das gesamte Volumen der Hydrogelpartikel ausfüllen können (Abbildung S4). Dennoch gibt es signifikante Unterschiede zwischen unserer vorliegenden Arbeit und den vorangegangenen Arbeiten. So schrumpfen die von uns hergestellten Mikrokugeln nicht nach zweiwöchiger Inkubation in niPA-Lösung (Abbildung S5). Die Bildung der Polymer-Schichten ist in unserem Fall nach innen gerichtet, wobei frisches noch gelöstes Polymer bereits gebildete Schichten passiert und im Innern der Mikrokugel neue Schichten bildet. Demgegenüber beschreiben frühere Arbeiten die Bildung von Schichten durch einen „Staffel“-Mechanismus,^[13b] bei dem neues Polymer das bereits gebundene Polymer verdrängt und als Schicht vor sich her schiebt. Die nach innen gerichtete Bildung neuer Schichten in unseren Experimenten deutet daher darauf hin, dass frisches niPA durch alle vorherigen Schichten hindurchdiffundiert und mit der ersten verfügbaren freien Agarose komplexiert.

Da die Fluoreszenzintensitäten der Schichten annähernd konstant sind (Abbildung S6), kann angenommen werden, dass auch die Konzentration des gebildeten Agarose-niPA-Komplexes konstant ist und daher die Agarose unter den gegebenen Bedingungen eine konstante „Kapazität“ für die niPA-Bindung aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die Schichtdicke sowohl über die Menge des angebotenen niPA (Abbildung 2 A) als auch über die Inkubationszeit (Abbil-

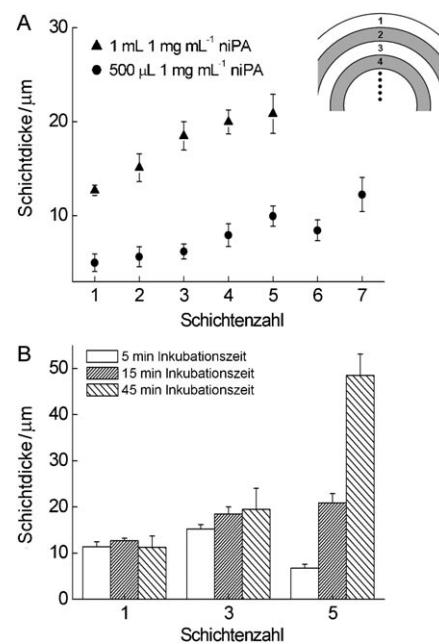


Abbildung 2. Schichtdicke als Funktion der Schichtenzahl, Polymermenge und Inkubationszeit. A) Eine Verdoppelung des Volumens der niPA-Lösung bei gleicher Inkubationszeit von 15 min führte zu einem Zuwachs der Schichtdicke. Der Einschub oben rechts beschreibt die von außen nach innen gerichtete Schichtabfolge. B) Schichtdicken der ersten, dritten und fünften Schicht als Funktion der Inkubationszeit mit konstantem Volumen der Polymerlösung und konstanter niPA-Konzentration.

dung 2B) genau eingestellt werden kann (nur Ergebnisse von Mikrokapseln mit ähnlichem Durchmesser von ca. 175 µm sind gezeigt). Wir beobachteten, dass die Schichtdicke zunimmt, wenn: 1) die Zahl der Schichten zunimmt, 2) sowohl eine höhere niPA-Konzentration wie auch ein größeres Volumen an niPA-Lösung bei gleicher geringerer Konzentration während der Inkubation eingesetzt wird und 3) die Inkubationszeit verlängert wird. Lediglich die Dicke der ersten Schicht nimmt nicht zu, wenn die Inkubationszeit verlängert wird, was darauf hinweist, dass das Gleichgewicht erreicht wurde. Da weitere Schichten gebildet werden können und das meiste niPA (90%) für die erste Schicht verbraucht wurde (Abbildung S7), kann angenommen werden, dass das niPA-Polymer limitierend wirkt. Dies erklärt, dass ein doppeltes Volumen an Polymerlösung zu einer dickeren ersten Schicht führen muss. Für alle Schichten gilt, dass sich die Polymerkonzentration während der Inkubation verringert, sodass sich die Kinetik der Schichtbildung verlangsamt. Für vergrößerte Volumina ist diese Verlangsamung der Kinetik jedoch reduziert, was die Bildung von dickeren Schichten bei vergrößertem Volumen der Polymerlösung (bei gleicher Konzentration) erklärt, selbst wenn das Gleichgewicht noch nicht erreicht ist. Der Sachverhalt wird durch den Umstand kompliziert, dass einerseits mit weiteren Schichten die Diffusionsbarriere wächst, was zu dünneren Schichten führen sollte, und andererseits das innere freie Volumen abnimmt, was zu dickeren Schichten führen sollte. Unsere Beobachtungen zeigen, dass der Effekt der Volumenabnahme überwiegt und dickere Schichten erhalten werden (Abbildung 2A). Um die Kodierung von Mikrokugeln zu demonstrieren, wurden vielfarbig gestreifte Multischichten mit unterschiedlichen Farb- und Schichtdickenkombinationen erzeugt (Abbildung S8).

Die Permeabilität der konzentrischen Schichten wurde anhand von Dextran-TRITC (65–76 kDa) untersucht, da es nicht durch DSS vernetzt wird und ungeladen ist (dadurch ist

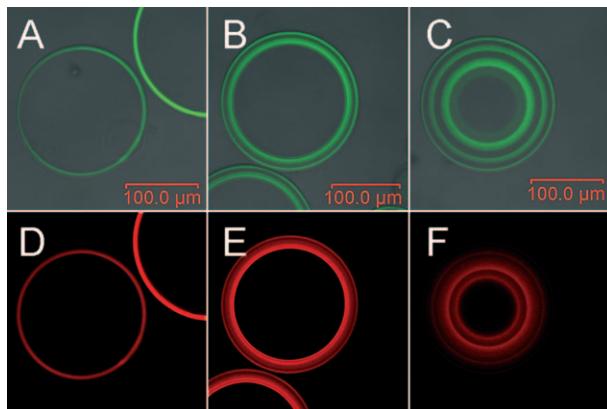


Abbildung 3. Überlagerte lichtmikroskopische und konfokale Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Agarose-Mikrokugeln mit verkapselftem Dextran-TRITC. A)–C) Mikrokugeln mit A) einer konzentrischen Schicht niPA-FITC, B) drei konzentrischen Schichten niPA-FITC/niPA/niPA-FITC und C) fünf konzentrischen Schichten (niPA-FITC/niPA)₂/niPA-FITC. D)–F) Konfokale Aufnahmen des in den Agarose-Mikrokugeln verkapselften Dextran-TRITC (65–76 kDa), mit D) einer konzentrischen Schicht, E) drei konzentrischen Schichten und F) fünf konzentrischen Schichten. (Die Aufnahmen A,D; B,E und C,F sind korrespondierend.)

keine elektrostatische Wechselwirkung mit anderen Polymeren möglich). Abbildung 3 zeigt in Wasser dispergierte Agarose-Mikrokugeln, in denen die VerkapSELUNG von Dextran-TRITC durch eine (Abbildung 3A,D), durch drei (Abbildung 3B,E) und durch fünf (Abbildung 3C,F) konzentrische vernetzte Schichten erreicht wurde. Das Dextran-TRITC fand sich in derselben Region wie das niPA und war nicht homogen im Zentrum der Mikrokugel verteilt. Diese nicht-homogene Verteilung ist auch für in LbL-Mikrokapseln verkapSELtes Dextran beschrieben worden.^[15] Da Dextran-TRITC für die Dauer der Dispersion in 1-Butanol homogen im Zentrum der Mikrokugel verteilt war und Dextran nicht mit DSS vernetzt oder mit niPA elektrostatisch wechselwirken kann, nehmen wir an, dass sich die Dextran-Moleküle während des Austauschs von 1-Butanol mit Wasser in den niPA-Schichten „verfangen“ haben. Dieses Verfangen des Dextrans kann durch die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten vom Innern zum Äußeren der Mikrokugeln nach Überführung in eine wässrige Lösung erklärt werden.

Als Nächstes konnten wir demonstrieren, dass die Biofunktionalität von Glucoseoxidase GOx und Meerrettichperoxidase (HRP) durch den VerkapSELungsprozess nicht beeinträchtigt wird. Beide Enzyme wurden in Mikrokugeln mit drei vernetzten konzentrischen Schichten (farblos/grün/farblos für GOx) und (farblos/rot/farblos für HRP) verkapSELt. Zusätzlich wurde Rinderserumalbumin (BSA) zur Kontrolle verkapSELt (rot/farblos/grün). Die verkapSELten Enzyme und das verkapSELte BSA wurden vermischt, und wir erhielten zwei Sätze von Mikrokugelgemischen: Satz 1 bestehend aus HRP- und BSA-Mikrokugeln (Abbildung 4A und D) und

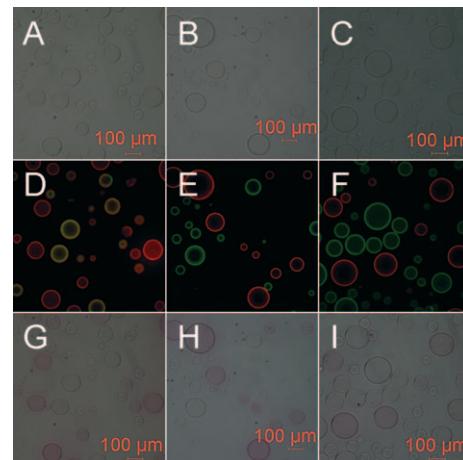


Abbildung 4. Aufrechterhaltung der Biofunktionalität von HRP (rot fluoreszenzmarkiert) und GOx (grün fluoreszenzmarkiert) in Mikrokugeln; als Kontrolle wurde BSA verkapSELt (grün und rot fluoreszenzmarkiert). Lichtmikroskopische Aufnahmen von A) HRP- und BSA-Mikrokugeln und B,C) HRP- und GOx-Mikrokugeln mit D) überlagerten FITC- und TRITC-Fluoreszenzaufnahmen von HRP- und BSA-Mikrokugeln und E,F) HRP- und GOx-Mikrokugeln vor der Zugabe der Substrate. 10 s nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und Ampliflu Red (AR) zu den G) HRP- und BSA-Mikrokugeln und H) HRP- und GOx-Mikrokugeln wurde nur bei den HRP-Mikrokugeln eine violette Farbe beobachtet. I) Nach Zugabe von Glucose und AR zu den HRP-Mikrokugeln wurde ebenfalls nur bei den HRP-Mikrokugeln eine violette Farbe beobachtet.

Satz 2 bestehend aus HRP- und GOx-Mikrokugeln (Abbildung 4B, C, E und F). Die Biofunktionalität der verkapselten Enzyme wurde über ihre enzymatische Aktivität nach Zugabe von Glucose/Ampliflu Red (AR) für GOx und Wasserstoffperoxid/AR für HRP nachgewiesen. GOx katalysiert die Reaktion von Glucose mit Sauerstoff zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid. HRP katalysiert die Umsetzung von AR mit Wasserstoffperoxid in ein violettes Produkt. Tatsächlich kann die Umsetzung zum farbigen Produkt 10 s nach der Zugabe von H_2O_2 /AR zu HRP/BSA-Mikrokugeln (Abbildung 4G) und von Glucose/AR zu HRP/GOx-Mikrokugeln (Abbildung 4H) beobachtet werden. Durch Auslesen der Farb- und Schichtdickenkombination und Dekodierung kann gezeigt werden, dass das violette Reaktionsprodukt ausschließlich in den HRP-Mikrokapseln gebildet wird. Abbildung 4I zeigt das entstandene farbige Reaktionsprodukt 2 min nach der Zugabe von Glucose/AR zu HRP/GOx-Mikrokugeln. Nach Dekodierung konnte gezeigt werden, dass das farbige Produkt ebenfalls nur in den HRP-Mikrokugeln entstand und daher GOx ebenfalls die Biofunktionalität durch den Herstellungsprozess hindurch bewahrt hat. Die Bildung des farbigen Reaktionsprodukts für Satz 2 (HRP/GOx-Mikrokugeln) dauert länger, weil das in den GOx-Mikrokugeln produzierte Wasserstoffperoxid zunächst zu den HRP-Mikrokugeln diffundieren muss.

Zusammenfassend haben wir die Verkapselung von Biomolekülen in Mikrokapseln mit einer Farb- und Schichtdickenkodierung gezeigt. Verkapselung und Kodierung wurden durch einen nach innen gerichteten Aufbau von konzentrischen, farbig gestreiften Polymerschichten erreicht. Durch die Permutation der Farbreihenfolge und der Schichtdicken gelingt eine elegante Kodierung der Mikrokugeln. An den Beispielen GOx und HRP wurde demonstriert, dass Biomoleküle verkapselt werden können und dabei ihre Biofunktionalität beibehalten. Wir sind überzeugt, dass diese neue Methode zum Fortschritt auf dem Gebiet der Kolloidwissenschaften und der Mikroverkapselung beiträgt. Ein Anwendungsbeispiel wäre die Identifizierung von Mikrokapseln in Lösung oder in Bioarrays für Parallelnachweisverfahren und Parallelreaktionen. Auch sehen wir die Möglichkeit der Einbindung von chemischen oder biologischen Funktionalitäten in die Schichten, um sequenzielle Reaktionen in einer Hydrogelmatrix zu ermöglichen oder sichtbar zu machen.

Experimentelles

Chemikalien: Dextran-TRITC M_w 65–76 kDa, 1-Butanol wasserfrei 99.8%, Disuccinimidylsuberat (DSS), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Glucoseoxidase (GOx), Meerrettichperoxidase (HRP), Rinderserumalbumin (BSA), D-(+)-Glucose und Mineralöl von Sigma; Span 80, Ampliflu Red und Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) von Fluka; 1-Undecanol, CaI_2 , Polyallylamin (PA) M_w 65 kDa und ADOGEN 464 von Aldrich; Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt von Promega; Ethanol von Fisher Scientific; Chloroform und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) von BDH Chemicals; PBS von 1st Base. Doppelt destilliertes Wasser wurde mit einer Fistream Cyclone-Apparatur (Großbritannien) hergestellt.

Herstellung von nicht-ionischem fluoreszenzmarkiertem Polyallylamin in 1-Butanol: Eine Lösung von nicht-ionischem Polyallylamin (niPA) in 1-Butanol wurde durch Trocknen der gekauften

wässrigen niPA-Lösung im Trockenschrank und anschließendes Lösen des getrockneten niPA in 1-Butanol bis zur Sättigung hergestellt. Die gesättigte Stammlösung wurde auf 1 mg mL^{-1} verdünnt, nachdem 1 mL der gesättigten niPA-Lösung in 1-Butanol eingedampft und der Rückstand zur Konzentrationsbestimmung zurückgewogen wurde. Fluoreszenzmarkiertes niPA wurde durch Reaktion mit reaktivem Fluorophor (FITC oder TRITC) in 1-Butanol mit niPA hergestellt. Das Verhältnis von Fluorophor zu Monomereinheit betrug 1:100.

Herstellung von Agarose- und Alginat-Mikrokugeln: Die Agarose-Mikrokugeln wurden aus einer 2-proz. Lösung von Agarose in destilliertem Wasser hergestellt. Optional können der Lösung Biomoleküle zugegeben werden. Die Lösung wurde auf 45°C vorgewärm und in ein ebenfalls auf 45°C vorgewärmtes Mineralöl mit 0.1% Span80 unter Rühren eingetragen, wodurch Wasser-in-Öl-Emulsionströpfchen erzeugt wurden, die anschließend durch Abkühlen im Eisbad zu Agarose-Mikrokugeln verfestigt wurden. Die festen Agarose-Mikrokugeln wurden durch Lagern bei -20°C weiter stabilisiert. Zur Herstellung der Alginat-Mikrokugeln wurde eine 2-proz. Natriumalginatlösung in Mineralöl mit Span80 unter Rühren emulgiert. Zu dieser Wasser-in-Öl-Emulsion wurde ein gleicher Volumenanteil einer 0.05 M Lösung von CaI_2 in Undecanol gegeben. Die Inkubationszeit zur Calciumalginatbildung betrug 15 min. Das Volumenverhältnis zwischen wässriger und öliger Phase betrug 1:25.

Nach innen gerichtete Bildung konzentrischer niPA-Schichten in Agarose- oder Alginat-Mikrokugeln: Um die Agarose- oder Alginat-Mikrokugeln aus dem Öl in 1-Butanol zu überführen, wurde eine 0.5-proz. Lösung von ADOGEN464 in Ethanol zur Dispersion der Agarose- oder Alginat-Mikrokugeln in Öl gegeben und energisch gemischt. Anschließend wurde die Dispersion zentrifugiert und der Mineralöl- und Ethanolüberstand verworfen. Das Pellet, das die Agarose- oder Alginat-Mikrokugeln enthält, wurde mit einer Lösung von 0.5% ADOGEN 464 in 1-Butanol gewaschen. Die erhaltenen Agarose- oder Alginat-Mikrokugeln wurden danach mit der gewünschten Menge einer niPA oder niPA-TRITC oder niPA-FITC in 1-Butanol mit 0.5% ADOGEN464 für eine gewünschte Zeit bei leichtem Schütteln inkubiert (typischerweise wurden 200 μL Mikrokugeln mit 1 mL der niPA-Lösung 5–45 min inkubiert). Anschließend wurde überschüssiges niPA entfernt und mit 1-Butanol gewaschen, wodurch die erste konzentrische Schicht aus niPA gebildet wurde. Die Inkubation mit niPA-Lösungen (mit 0.5% ADOGEN 464) wurde wiederholt, bis die gewünschte Zahl an Schichten erhalten war. (Anmerkung: Die Bildung von konzentrischen Schichten mit niPA ist auch ohne den Zusatz von ADOGEN464 möglich. Der kationische Emulgator wurde dem Fabrikationsprozess zugesetzt, um sicherzugehen, dass die Agarose-Mikrokugeln nicht aggregieren oder dehydratisieren, während sie in 1-Butanol dispergiert sind.)

Um die konzentrischen Schichten zu stabilisieren, wurden die Mikrokugeln mit DSS (40 mg mL^{-1} in Chloroform) 2 h inkubiert. Die resultierende Vernetzung ist notwendig, da andernfalls ein Großteil des schichtbildenden niPA gelöst und verteilt würde, sobald die Mikrokugeln in einer wässrigen Umgebung dispergiert werden. Um die Agarose-Mikrokugeln aus 1-Butanol in PBS zu überführen, wurden sie zunächst zweimal mit Ethanol und anschließend mit ethanolischem Lösungen mit steigendem PBS-Gehalt ($0.01 \times$) von 10%, 50% und 90% gewaschen, bevor sie in reinem $0.01 \times$ PBS dispergiert wurden.

Die enzymatische Analyse von GOx und HRP wurde mit folgenden Lösungen durchgeführt: 5 mg mL^{-1} Glucose in $1 \times$ PBS, $0.02\% H_2O_2$ in $1 \times$ PBS und 5 mg mL^{-1} Ampliflu Red in DMSO.

Bestimmung der Konzentration des im Überstand zurückgebliebenen niPA: 500 μL der 1 mg mL^{-1} niPA-FITC-Lösung wurden jeweils zur Bildung einer Schicht eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Agarose-Mikrokugeln zentrifugiert und die Fluoreszenz des Überstands mit einem Mikroplattenleser (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Deutschland) bestimmt. Die Konzentration an überschüssigem niPA-FITC im Überstand nach jeder Schichtbildung

wurde durch Vergleich der Fluoreszenz mit der Fluoreszenz der Stammlösung bestimmt.

Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder: Systemmikroskop (Olympus BX41, Japan) mit einer CCD-Farbdigitalkamera (Retiga 4000R, QImaging, Kanada); Bild-Erfassung: QCapture Pro Software (Version 5.1.1.14, QImaging, Kanada); Konfokale Fluoreszenzmikroskopie: Laser-Scanning-Mikroskop (FluoView FV300, Olympus, Japan). Bildanalyse: ImageJ Software (Scion Corp., USA).

Eingegangen am 18. November 2009,
veränderte Fassung am 19. April 2010
Online veröffentlicht am 16. Juni 2010

Stichwörter: Hydrogele · Kodierung · Mikrokugeln ·
Polyelektrolyte · Verkapselung

- [1] a) V. Štefuca, P. Gemeiner, L. Kurillaová, H. Dautzenberg, M. Polakovič, V. Báleš, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, *30*, 313–324; b) C. Schatz, J. Lucas, C. Viton, A. Domard, C. Pichot, T. Delair, *Langmuir* **2004**, *20*, 7766–7778.
- [2] a) S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 113–126; b) H. Dautzenberg, A. Zintchenko, *Langmuir* **2001**, *17*, 3096–3102.
- [3] a) G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **1992**, *210/211*, 831–835; b) G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- [4] a) F. Caruso, D. Trau, H. Möhwald, R. Renneberg, *Langmuir* **2000**, *16*, 1485–1488; b) C. Gao, E. Donath, H. Möhwald, J. Shen, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3943–3947; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3789–3793; c) R. Georgieva, S. Moya, M. Hin, R. Mitlöhner, E. Donath, H. Kiesewetter, H. Möhwald, H. Bäumler, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 517–524; d) C. S. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3850–3872; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3762–3783; e) K. Köhler, G. B. Sukhorukov, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 2053–2061; f) J. Bai, S. Beyer, W. C. Mak, D. Trau, *Soft Matter* **2009**, *5*, 4152–4160.
- [5] a) A. Yu, Y. Wang, E. Barlow, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1737–1741; b) B. Samanta, X. Yang, Y. Ofir, M. Park, D. Patra, S. S. Agasti, O. R. Miranda, Z. Mo, V. M. Rotello, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5445–5448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5341–5344; c) B. Städler, R. Chandrawati, A. D. Price, S. Chong, K. Breheny, A. Postma, L. A. Connal, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4423–4426; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4359–4362.
- [6] a) O. Kreft, R. Georgieva, H. Bäumler, M. Steup, B. Müller-Röber, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 435–440; b) A. N. Zelikin, Q. Li, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7907–7909; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7743–7745.
- [7] a) J. Q. Brown, R. Srivastava, M. J. McShane, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 212–216; b) O. Kreft, A. M. Javier, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4471–4476.
- [8] a) O. Kreft, A. G. Skirtach, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3142–3145; b) W. C. Mak, K. Y. Cheung, D. Trau, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 2930–2937.
- [9] a) M. Fischlechner, O. Zschörnig, J. Hoffman, E. Donath, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2952–2955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2892–2895; b) C. Cortez, E. Tomaskovic-Crook, A. P. R. Johnston, B. Radt, S. H. Cody, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1998–2003.
- [10] A. G. Skirtach, A. M. Javier, O. Kreft, K. Köhler, A. P. Alberola, H. Möhwald, W. J. Parak, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4728–4733; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4612–4617.
- [11] a) S. Beyer, W. C. Mak, D. Trau, *Langmuir* **2007**, *23*, 8827–8832; b) W. C. Mak, J. Bai, X. Y. Chang, D. Trau, *Langmuir* **2009**, *25*, 769–775.
- [12] G. J. Fleer, M. A. Cohen Stuart, J. M. H. M. Scheutjens, T. Cosgrove, B. Vincent in *Polymers at Interfaces*, Chapman & Hall, London, **1993**, Kap. 2., S. 27–42.
- [13] a) V. B. Rogacheva, V. A. Previsch, A. B. Zezin, V. A. Kabanov, *Polym. Sci. U.S.S.R.* **1988**, *30*, 2262–2270; b) V. A. Kabanov, A. B. Zezin, V. B. Rogacheva, V. A. Previsch, *Makromol. Chem.* **1989**, *190*, 2211–2216; c) A. B. Zezin, V. B. Rogacheva, V. A. Kabanov, *J. Intell. Mater. Syst. Struct.* **1994**, *5*, 144–146.
- [14] a) V. A. Kabanov, V. B. Skobeleva, V. B. Rogacheva, A. B. Zezin, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1485–1490; b) K. T. Oh, T. K. Bronich, V. A. Kabanov, A. V. Kabanov, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 490–497.
- [15] a) A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, S. Leporatti, T. L. Radtchenko, E. Donath, H. Möhwald, *Colloid Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2002**, *198*, 535–541; b) D. V. Volodkin, A. I. Petrov, M. Prevot, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, *20*, 3398–3406.