



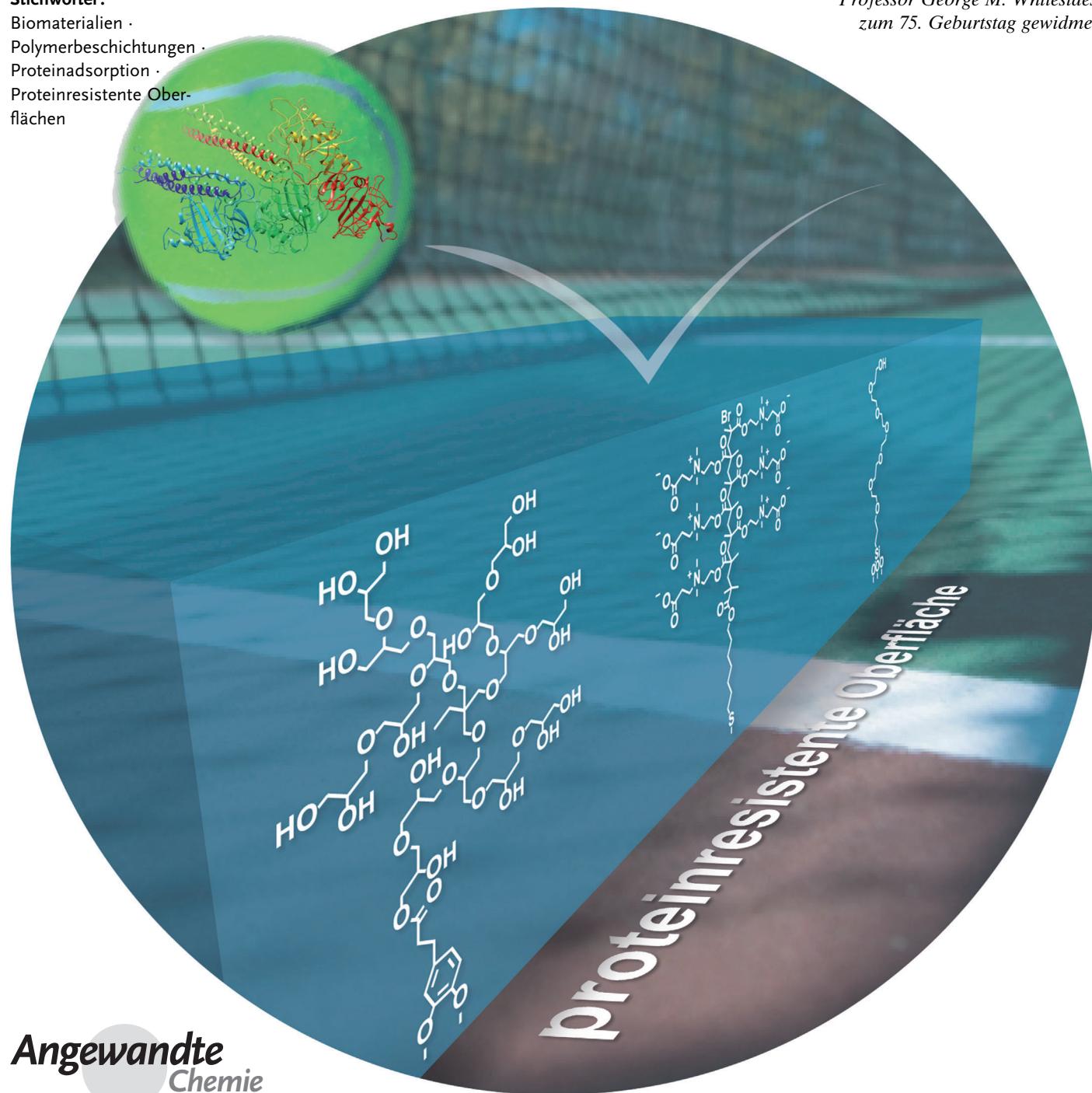
Wechselwirkungen von Proteinen mit Polymerbeschichtungen und Biomaterialien

Qiang Wei, Tobias Becherer, Stefano Angioletti-Uberti, Joachim Dzubiella, Christian Wischke, Axel T. Neffe, Andreas Lendlein, Matthias Ballauff und Rainer Haag*

Stichwörter:

Biomaterialien ·
Polymerbeschichtungen ·
Proteinadsorption ·
Proteinresistente Ober-
flächen

Professor George M. Whitesides
zum 75. Geburtstag gewidmet



Die Proteinadsorption gilt als der wichtigste Faktor der Wechselwirkung zwischen polymeren Biomaterialien und Körperflüssigkeiten oder -gewebe. Die Haupteinflussfaktoren auf die Proteinadsorption sind wasservertmittelte hydrophobe und Hydratationskräfte sowie elektrostatische Wechselwirkungen. Eine systematische Analyse verschiedener Monolagen führte zur Aufstellung allgemeiner Leitsätze, den sogenannten „Whitesides-Regeln“. Diese Konzepte wurden erfolgreich auf die Entwicklung verschiedener proteinresistenter Oberflächen angewendet und werden kontinuierlich weiterentwickelt, um das Verständnis von Protein-Material-Wechselwirkungen über die bisherigen Grenzen hinaus zu erweitern. Ebenso werden die Theorien zu Proteinadsorptionsmechanismen aufgrund der sich schnell entwickelnden analytischen Technologien fortlaufend verbessert. Ziel dieses Aufsatzes ist die Verbesserung der aufgestellten empirischen Leitlinien im Hinblick auf die theoretischen und analytischen Fortschritte. Dabei werden die aktuellen analytischen Methoden zur Untersuchung mechanistischer Hypothesen und Theorien zu Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen besprochen. Ein besonderes Augenmerk liegt auf aktuellen Technologien im Bereich bioinformer und biospezifischer Beschichtungen und ihrer Anwendungen in der Biomedizin.

1. Einleitung

Biomaterialien und medizinische Geräte verursachen eine Reaktion, wenn sie in lebendes Gewebe implantiert werden oder mit menschlichem Blut in Kontakt kommen.^[1] Innerhalb von Sekunden adsorbieren Proteine unspezifisch auf der Implantatoberfläche (Abbildung 1), schnell gefolgt von einer Kaskade von Fremdkörperreaktionen.^[2] Diese biologische Reaktion führt zur Produktion einer faserartigen avaskulären Kapsel, die das Implantat vom Zielgewebe isoliert und somit die Funktion von Membranen und Biosensoren behindert oder die Wirkstofffreisetzung aus einem Transportvehikel verhindert.^[3]

Insbesondere die Proteinadsorption hat sich zu einem Schwerpunkt der modernen Nanotoxikologie entwickelt. Die meisten Nanopartikeloberflächen werden augenblicklich mit einer dichten Proteinschicht bedeckt, wenn sie in die Blutbahn injiziert werden. Diese „Korona“ bestimmt die Reaktion des Körpers auf das Partikel.^[4–8] Das Wissen um die Zusammensetzung der Korona und ihre zeitliche Entwicklung^[9,10] ist notwendig, um ihre Auswirkungen zu verstehen.^[11,12] Zusätzlich kann die Proteinadsorption oft von einer langsamen Proteindenaturierung begleitet werden, die eine immunologische Erkennung der Partikel zur Folge hat. Diese Immunreaktion wird durch denaturierte Proteine ausgelöst und damit nicht notwendigerweise durch das Material, aus dem die Nanopartikel bestehen.^[13,14] All das wird zusätzlich durch die Tatsache verkompliziert, dass es sich bei der Proteinadsorption um ein kinetisches Phänomen handelt und sich die Korona mit der Zeit verändert.^[9,10] Die sehr beweglichen Proteine, die in der frühen Phase adsorbieren, werden später in einer komplexen Folge von Adsorptions- und Austausch-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8139
2. Methoden für die Analyse von Proteinwechselwirkungen	8142
3. Bioinerte und biospezifische Oberflächen	8153
4. Schlussfolgerungen und Perspektiven	8164

schritten, dem sogenannten „Vroman-Effekt“, durch andere Proteine mit höherer Affinität ersetzt.^[15–17]

In vielen Fällen kommen Biomaterialien direkt mit Blut in Kontakt. In Abhängigkeit von den Bedingungen kann das inner- oder außerhalb des Körpers erfolgen, etwa bei Biomaterialimplantaten (z.B. Herzklappen) oder bei partikulären Formulierungen, die direkt über Dialysatoren,

Schlauchmaterialien oder Blutbeutel in den Blutstrom gelangen. Der Kontakt von Blut mit künstlichen (exogenen) Oberflächen kann zur Thrombozytenadhäsion und -aktivierung führen, die wiederum eine Plasmagerinnung und/oder Aktivierung des Komplementsystems auslösen. Es ist allgemein anerkannt, dass diese biologischen Effekte die Adsorption von Proteinen auf der exogenen Oberfläche beinhalten. Da keine vollständig proteinresistente Biomaterialoberfläche bekannt ist, erfordert die Anwendung von Biomaterialien oft die gleichzeitige Behandlung mit anderen Medikamenten, wie z.B. in einer gerinnungshemmenden Therapie. Dies ist nicht erwünscht, weil sowohl mögliche Nebenwirkungen (einschließlich der Blutung, Neutropenie

[*] M. Sc. Q. Wei, M. Sc. T. Becherer, Prof. R. Haag
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: haag@chemie.fu-berlin.de

Dr. S. Angioletti-Uberti, Prof. Dr. J. Dzubiella, Prof. Dr. M. Ballauff
Weiche Materie und Funktionale Materialien
Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH
Hahn-Meitner-Platz 1, 14109 Berlin (Deutschland)
Dr. C. Wischke, Dr. A. T. Neffe, Prof. Dr. A. Lendlein
Institut für Biomaterialforschung und
Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies
Helmholtz-Zentrum Geesthacht
Kantstraße 55, 14513 Teltow (Deutschland)
M. Sc. Q. Wei, M. Sc. T. Becherer, Dr. S. Angioletti-Uberti,
Prof. Dr. J. Dzubiella, Dr. C. Wischke, Dr. A. T. Neffe,
Prof. Dr. A. Lendlein, Prof. Dr. M. Ballauff, Prof. R. Haag
Helmholtz Virtuelles Institut
Multifunktionale Biomaterialien für die Medizin
Kantstraße 55, 14513 Teltow (Deutschland)

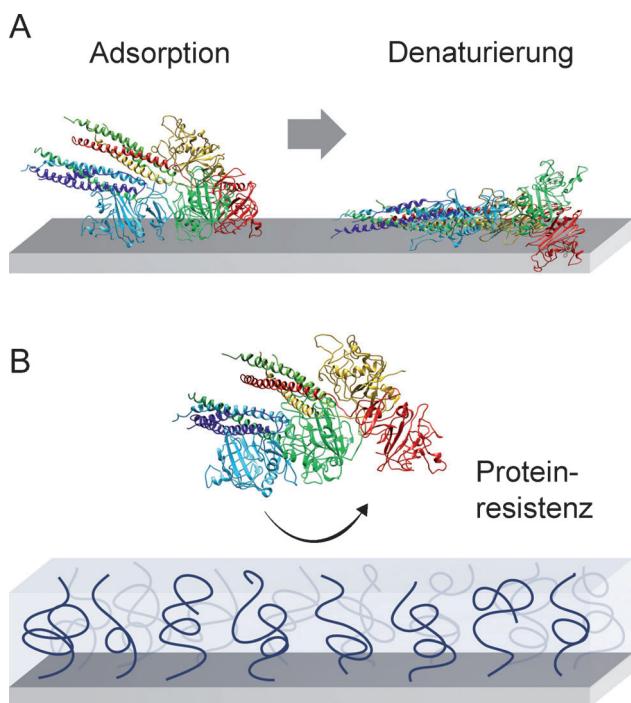


Abbildung 1. A) Die dynamische Adsorption und Denaturierung von Proteinen auf unbehandelten Oberflächen. B) Die proteinresistente Eigenschaft geeignet polymerbeschichteter Oberflächen.

oder Thrombozytopenie) als auch pharmakokinetische und metabolische Störungen durch gleichzeitige Verabreichung verschiedener Wirkstoffe bei multimorbidem Patienten auftreten können.

Daher ist die Unterdrückung der unspezifischen Proteinadsorption ein Schlüsselfaktor zur Verbesserung der Biokompatibilität von Biomaterialien. Ein effizienter Ansatz

besteht in der Modifizierung von Biomaterialoberflächen mit einer Polymerbeschichtung, die sie in Hinblick auf Körperflüssigkeiten und das umgebende Gewebe „tarnt“.^[3] Um solche „getarnten“ Objekte zu erhalten, ist es sinnvoll, eine Verringerung der Oberflächenenergie der Biomaterialien in Betracht zu ziehen. Fluorierte Beschichtungen mit einer geringen Oberflächenenergie wurden zur Verringerung der Ablagerung von Meeresorganismen auf Oberflächen verwendet,^[18] aber sogar Polytetrafluorethylen-Oberflächen (PTFE, Teflon) absorbieren in physiologischer Umgebung signifikante Mengen an Proteinen.^[19] Somit ist es wichtig, die Triebkraft der Proteinadsorption zu verstehen, um bioinerte Oberflächen zu verbessern.

Der rasante Fortschritt in der Synthese und Charakterisierung von funktionalen polymerbeschichteten Oberflächen stellt zusätzliche Herausforderungen an die Entwickler theoretischer Modellierwerkzeuge für die quantitative Beschreibung der Proteinbindungsprozesse. Es ist jedoch deutlich, dass das theoretische Verständnis eine notwendige Bedingung für rationale Entwicklungsstrategien ist, die eine externe Kontrolle sowohl der Bindungsthermodynamik als auch der Kinetik ermöglichen können.^[20]

Unter allen möglichen Kräften werden die wasservermittelten hydrophoben und Hydratationskräfte für die Hauptakteure bei der Proteinadsorption gehalten, eine Sichtweise, die in der von Berg empirisch ermittelten hydrophilen/hydrophoben Grenze resultierte.^[21] Dieses Konzept beschreibt, welche Oberflächen in Abhängigkeit ihrer Wasserkontaktwinkel die Proteinadsorption unterstützen oder hemmen. Bergs Gesetz ist eine quantitative Definition der Hydrophobie/Hydrophilie: Oberflächen sind hydrophob, wenn ihr Kontaktwinkel θ mit Wasser größer als ein kritischer Wert von ungefähr 65° ist.^[21] Auf hydrophilen Oberflächen mit $\theta < 65^\circ$ sind Proteine nicht in der Lage, das Wasser von der Oberfläche zu verdrängen und adsorbieren somit nicht,



Von links nach rechts: C. Wischke, Q. Wei, T. Becherer, A. Lendlein, S. Angioletti-Uberti, A. Neffe, M. Ballauff und R. Haag (es fehlt: J. Dzubiella). Alle Autoren sind Mitglieder des Helmholtz Virtual Institute on Multifunctional Biomaterials for Medicine, das seit 2011 von der Helmholtz-Gemeinschaft, der Freien Universität und der Universität Freiburg gefördert wird und dem rund 40 Wissenschaftler aus verschiedenen Institutionen angehören, die Protein-Material-Wechselwirkungen erforschen (Sprecher: Prof. A. Lendlein, HZG-Teltow).

während das umgekehrte Verhalten bei hydrophoben Oberflächen erwartet wird. Obwohl diese spezielle Sichtweise viele experimentelle Ergebnisse erklären kann, hat sie mehrere Nachteile. Erstens: Indem der gesamte Fokus auf die Oberflächen-Wasser-Wechselwirkung gelegt wird, erhält man wenig Einblick in die konkurrierende, dynamische Adsorption von verschiedenen, gegenseitig miteinander wechselwirkenden Proteinen. Der zweite Kritikpunkt ist eher begrifflicher Natur: Bergs Grenze wird üblicherweise aus der Betrachtung von hydrophoben und Hydratationskräften zwischen großen Partikeln abgeleitet, die sich, theoretisch betrachtet, wie flache Oberflächen verhalten. Die Stärke und Größenabhängigkeit dieser Kräfte hängt jedoch stark von den beteiligten Größenordnungen ab, wobei es im Nanometerbereich, in dem sich die Größe der meisten Proteine befindet, einen wichtigen Übergang gibt.^[22,23] Insofern ist es nicht klar, wie viele der erhaltenen Ergebnisse zu Wechselwirkungen auf großen Oberflächen wirklich für die Adsorption auf kleinen Partikeln relevant sind.

Die Beobachtung einer starken Proteinadsorption für viele Arten von geladenen hydrophilen Gelen, die üblicherweise als polymere Beschichtungen verwendet werden, steht in klarem Gegensatz zum empirischen Konzept von Bergs Grenze. Vogler, der als erster die hydrophoben und Hydratationskräfte als Hauptakteure der Proteinadsorption benannte,^[21] hat diese Diskrepanz beobachtet. Er schlug vor, zwischen denjenigen Proteinen zu unterscheiden, die direkt an die Oberfläche gebunden sind, und solchen, die sich in direkter Nähe zur Oberfläche befinden. Abgesehen von der Tatsache, dass diese Ad-hoc-Erklärung experimentelle Beweise benötigt, könnte sie das Gesamtkonzept von Bergs Gesetz retten, erscheint aber eher künstlich. Zusätzlich ist nicht klar, welchen Unterschied es aus praktischer Sicht machen würde, wenn man die Entwicklung bioinerter Beschichtungen betrachtet. Tatsächlich ist es schwer zu verstehen, dass Proteine, deren Abstand von der Biomaterialoberfläche lediglich eine Wassermanolage beträgt, von externen Stoffen wie z.B. Mikroben oder Antikörpern, unterschieden werden können, um daraufhin ihre gesamte Wechselwirkung mit dem Material zu ändern. Es muss diskutiert werden wie sie die gesamte Reaktion mit dem Material ändern können, denn kein klarer physikalischer Mechanismus würde es diesen Stoffen erlauben, eine so kleine Änderungen zu unterscheiden. Zusätzlich kann das Verhalten fluorierter Oberflächen mit diesem Modell nicht direkt bewertet werden, da die Fluorophilie eine weitere Dimension eröffnet, die nicht als „hydrophil“ oder „hydrophob“ charakterisiert werden kann.

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass die physiko-chemischen Prozesse der Proteinadsorption durch ein komplexes Zusammenspiel der Konformationsfreiheitsgrade des (reagierenden) Polymers und verschiedenen polaren und unpolaren Wechselwirkungsmechanismen bestimmt werden.^[20] Erstere schließen sowohl die unspezifischen elektrostatischen und ionischen Abschirmeffekte als auch lokale nichtkovalente Wechselwirkungen wie Salzbrücken oder Wasserstoffbrücken mit ein. Die polaren Wechselwirkungen können durch Änderungen der Salzkonzentration oder des pH-Wertes beeinflusst werden. Die nichtpolaren Wechsel-

wirkungen schließen Van-der-Waals- und solvensvermittelte Phänomene wie die hydrophobe Anziehung^[22] oder die Hydratationsabstoßung mit ein.^[23] Eine quantitative Beschreibung dieser stark verflochtenen und kumulativen Mechanismen erfordert mehrskalige und grobkörnigere Modellierungsansätze sowohl für die solvatisierten Polymere^[24–26] als auch die Proteine,^[27,28] um alle relevanten Zeit- und Längenskalen abzudecken, während die chemische Spezifität gewahrt bleibt. Die Fülle der bisher entwickelten Werkzeuge hat sich noch nicht zu einer komplett quantitativen Vorhersagemaschinerie entwickelt, aber Teilerfolge wurden in verschiedenem Ausmaß für individuelle Systeme erreicht. Diese werden im Abschnitt 2.5 zu den theoretischen Methoden besprochen.

Auf der Suche nach geeigneten Beschichtungsmaterialien haben Whitesides und Mitarbeiter eine systematische Studie zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung verschiedener chemischer Strukturen in selbstassemblierte Monolagen und ihrer Effizienz in der Unterdrückung der Proteinadsorption durchgeführt.^[29,30] Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurden vier molekulare Eigenschaften für proteinresistente Monolagen vorgeschlagen, die als die „Whitesides-Regeln“ bekannt sind: 1) die Gegenwart polarer funktioneller Gruppen, d.h., Hydrophilie, 2) die Gegenwart von Wasserstoffbrückenakzeptoren, 3) das Nichtvorhandensein von Wasserstoffbrückendonoren und 4) das Nichtvorhandensein einer Nettoladung. Polymerbeschichtungen, die alle diese Regeln erfüllen, sollten eine zusätzliche Hydratationsschicht bieten, die die Proteinadsorption auf der Oberfläche verhindert.

Auf der Grundlage der oben genannten empirischen „Whitesides-Regeln“ wurden viele verschiedene Arten bioinerter Moleküle entwickelt oder verwendet, die die Proteinadsorption auf Materialoberflächen effektiv verringern. Dazu gehören Peptide,^[31] Peptoide,^[32] Oligo-/Polyethylenglycole,^[33] Oligo-/Polyglycerole,^[34] zwitterionische Polymere,^[35] Polysaccharide,^[36] Polyoxazoline,^[37] Poly(propylensulfoxide)^[38] und Polyvinylpyrrolidone.^[39] Obwohl einige dieser Polymerbeschichtungen wie z.B. Polyglycerol und Polysaccharide eine große Anzahl an Hydroxygruppen (Wasserstoffbrückendonoren) enthalten und damit nicht der dritten Whitesides-Regel entsprechen, erfüllen sie aufgrund ihrer verbesserten Hydrophilie die erste Regel gänzlich. In diesem speziellen Fall ist Bergs Gesetz anwendbar. Demzufolge ist ein allgemeines Verständnis von bioadhäsiven als auch bioinerten Oberflächen notwendig, um Beschichtungen anwendungs-spezifisch optimieren zu können.

Zusätzlich zu bioinerten Beschichtungen besteht ein anderer Ansatz darin, Polymeroberflächen zu entwickeln, die die (un)kontrollierte Adsorption von Proteinen nutzen, um das Biomaterial abzuschirmen und/oder seinen Einbau zu fördern, so dass Implantatoberflächen auf biologische Weise den Kontakt mit dem Gewebe herstellen können.^[40] Dabei wird angenommen, dass die Kombination biospezifischer Moleküle mit bioinerten Beschichtungen die Effizienz der biologischen Kommunikation erhöhen kann.^[3] Zusätzlich zu der zwitterionischen Phospholipiddoppelschicht enthalten natürliche Zellmembranen inselartig verteilte Kohlenhydrate und Proteine. Dieses Konzept wurde für zellmembranähnli-

che Polymerbeschichtungen übernommen, die aus einem bioinerten Material und daran konjugierten bioaktiven Molekülen bestehen, die im lebenden Organismus selektiv an Zielbiomoleküle binden können. Zum Beispiel können Arginin-Glycin-Asparaginsäuren (RGDs), die an bioinerte Beschichtungen gebunden sind, an Endothelzellen binden, während die benachbarten bioinerten Polymere die Adhäsion von Leukozyten und anderen Zellen verhindern.^[41] Aus diesem Grund sind bioinerte Oberflächen ein unverzichtbarer Bestandteil bei der Entwicklung von Biomaterialien.

Für viele der oben erwähnten Anwendungen galt die PEGylierung als der Goldstandard der proteinresistenten Oberflächen. Aktuelle Beobachtungen deuten jedoch an, dass die PEGylierung weit von einer optimalen Methode für biomedizinische Anwendungen entfernt ist. Obwohl es sich bei PEG um einen Polyether handelt, der unter physiologischen Bedingungen relativ stabil ist, wurde gezeigt, dass ein Abbau möglich ist und besonders bei erhöhten Temperaturen, in der Gegenwart von Sauerstoff und Übergangsmetallionen oder im lebenden Organismus in der Gegenwart von Enzymen auftritt.^[42,43] Die thermische Instabilität ist für die Herstellung und Handhabung von PEG-beschichteten Materialien wichtig. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der enzymatische Abbau von niedermolekularen PEGs giftige Metabolite erzeugt.^[44] In einigen Fällen wurden auch Überempfindlichkeitsreaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock beschrieben.^[45] Derzeit wird noch diskutiert, ob diese Körerreaktion auf PEG selbst zurückzuführen ist oder ob Unreinheiten aus der Synthese, wie z.B. 1,4-Dioxan, Ethylenoxid oder Formaldehyd, dafür verantwortlich sind. Mehrere Studien haben im Menschen auch Antikörper (IgM und IgG) gegen PEG nachgewiesen, die durch wiederholte Gabe von PEG oder PEG-Wirkstoff-Konjugaten verursacht worden sein könnten.^[46]

Aus diesem Grund haben Alternativen zu PEG in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erregt. Eine dieser Polymerklassen ist Polyglycerol (PG), das entweder eine lineare oder verzweigte Struktur besitzen kann.^[47,48] Diese Polymere sind beständiger gegen Hitze^[49,50] und Oxidation^[51] als PEG und besitzen ähnliche oder sogar bessere proteinresistente Eigenschaften.^[52,53] Außerdem konnte gezeigt werden, dass PGs eine geringere Thrombozytenaktivierung als PEG verursachen.^[54] Eine andere Option sind zwitterionische Moleküle.^[55] Wie bereits erwähnt, ist hauptsächlich die an die Polymerketten gebundene Wasserschicht für die Hydrationskräfte verantwortlich, die die Proteinadsorption abwehren.^[55] Hydrophile Moleküle wie z.B. PEG und PG gestatten die Hydratation über Wasserstoffbrücken, die schwächer als elektrostatische ionische oder Ion-Dipol-Bindungen sind. Zwitterionische Moleküle erfüllen mehrere Bedingungen: Zum einen sind sie sehr stabil und zum anderen kombinieren sie auf perfekte Weise die Ausbildung einer ionischen oder Ion-Dipol-Bindung mit Wasser und das Nichtvorhandensein einer Nettoladung (Whitesides-Regel 4). In Zukunft werden sie neue Maßstäbe bei den proteinresistenten Materialien setzen.

Der Schlüssel zur Entwicklung der nächsten Generation bioinserter und biospezifischer Oberflächen liegt im Verstehen der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Polymer-

oberflächen. Dieser Aufsatz wird sich daher auf die Methoden konzentrieren, mit denen Proteinwechselwirkungen mit Polymeren auf Oberflächen und in Lösung untersucht werden können. Zusätzlich sollen einige der aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der bioinerten und biospezifischen Oberflächen im Zusammenhang mit ausgewählten biomedizinischen Anwendungen beschrieben werden.

2. Methoden für die Analyse von Proteinwechselwirkungen

2.1. Überblick über die physikochemischen Methoden zur Untersuchung der Proteinadsorption

In diesem Abschnitt werden wichtige quantitative physikochemische Methoden zur Detektion und Untersuchung von Proteinwechselwirkungen zusammengefasst (Table 1), die eine Abschätzung erlauben, ob eine Oberfläche als bioinert oder biospezifisch wirkt.

2.2. Ausgewählte instrumentelle Methoden für die Untersuchung von Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen

Die Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) und die Quarzkristall-Mikrowaage (quartz crystal microbalance, QCM) sind aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und ihrer Eignung für Echtzeitmessungen weitverbreitete markierungsfreie Methoden zur Untersuchung von Grenzflächen. Die Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie (time-of-flight secondary ion mass spectrometry, ToF-SIMS) ist eine leistungsfähige In-situ-Methode sowohl zur Untersuchung der Orientierung und Konformation adsorbiertener Proteine als auch zur Identifizierung und Unterscheidung bestimmter Proteine in Mischungen. Darum sollen diese drei Methoden hier besonders hervorgehoben werden.

Die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) und die Quarzkristall-Mikrowaage (QCM)

SPR ist eine optische Methode, die Änderungen des Brechungsindex auf Metallocberflächen misst. Die SPR-Messung erfordert die Erzeugung von Oberflächenplasmonen (surface plasmons, SPs). Ein geeigneter Aufbau hierfür ist die Kretschmann-Geometrie,^[70] bei der ein Glasprisma an einem mit einer dünnen Goldschicht überzogenen Sensorchip befestigt ist. Die Goldschicht steht wiederum in direktem Kontakt zur Pufferlösung in der Flusszelle (Abbildung 2 A). Wenn Licht auf die Grenzfläche zwischen dem Prisma und Gold fällt,^[71] können die Photonen mit den freien Leitungselektronen der Goldschicht wechselwirken, wodurch Plasmaoszillationen entstehen. Ein Quant dieser Oszillation wird Plasmon genannt. Eine Resonanz findet statt, wenn die planparallele Vektorkomponente des einfallenden Lichts mit dem Vektor des Plasmonenimpulses zusammenpasst, was die Auslöschung des reflektierten Lichtes bewirkt. Da die Größenordnung der Lichtvektorkomponente sich mit dem Winkel des einfallen-

Tabelle 1: Gebräuchliche quantitative Analysemethoden für die Menge adsorbierten Proteins.

Methode	Echtzeit	In situ	Gemessene Elemente	Nachweisgrenze ^[a]	Vorteile	Nachteile	Lit.
UV/Vis-Spektroskopie	N	N	Adsorption nach einem chromogenen Assay	1 µg mL ⁻¹	Preiswert und schnell; leicht zugänglich	Aufgrund der niedrigen Proteinmenge auf der Oberfläche ist ein zusätzlicher chromogener Assay notwendig; geringe Empfindlichkeit; für die Anfärbung sind Lösungsbedingungen notwendig; bestimmte chemische Bestandteile beeinflussen den chromogenen Assay	[56]
Fluoreszenzmikroskopie	N	J	Fluoreszenz	1 ng cm ⁻²	Gute Empfindlichkeit; Messung von Konkurrenzadsorptionen	Fluoreszenzlösung; teure Reagenzien	[57]
Isotopenmarkierung	N	J	Isotop	1 ng	Große Genauigkeit; Messung von Konkurrenzadsorptionen	Toxizität; kurze Halbwertszeit der üblichen ¹²⁵ I-Markierung	[58]
SEC	N	N	Molekülgröße	100 ng mL ⁻¹	Zweckmäßig	Nur in Lösung möglich	[59]
Ellipsometrie	N	J	Dicke	0.1 nm	Preiswert und schnell; leicht zugänglich	Nur auf flachen Oberflächen mit homogen adsorbierten Schichten möglich; es ist schwierig, Modelle für gemischte Oberflächen zu entwickeln	[60]
DLS	N	J	Hydrodynamischer Radius	0.1 nm	Hydratisierte Größe; leicht zugänglich	Nur auf Partikel anwendbar	[61]
XPS	N	J	Chemische Bestandteile	10 ng cm ⁻² , 1 mol%	Quantitative chemische Zusammensetzung der Oberflächenschicht	Probenverunreinigung; komplizierte quantitative Analyse; komplexes und teures Gerät	[62]
Neutronenreflektometrie	N	J	Oberflächenstruktur	2π/Q _{max}	Bestimmung der Dicke, Dichte und Rauheit der Oberfläche; Empfindlichkeit gegenüber Isotopen; Empfindlichkeit gegenüber leichten Elementen	Schwierige Dateninterpretation; Neutronenanlage ist notwendig	[63]
SAXS, SANS	J	J	Chemische Bestandteile	2–3 %	Komplette Analyse der radialen Struktur von Partikeln; quantitative Analyse adsorbiertener Proteine	Schwierige Dateninterpretation; Neutronenanlage notwendig	[64]
ToF-SIMS	N	J	Masse von Molekülfragmenten	0.1 ng cm ⁻²	Extreme Oberflächenempfindlichkeit; Analyse der Orientierung und Konformation von Proteinen; Unterscheidung und Quantifizierung von Proteinmischungen	Nur niedermolekulare Fragmente können detektiert werden; die Absolutmenge eines einzelnen Proteins ist nicht zugänglich; teures Gerät	[62]
SFG	N	J	Spezifische chemische Bindungen	Monolage	Analyse der Orientierung und Konformation von Proteinen; Arbeit unter Umgebungsbedingungen	Komplexe Datenanalyse	[65]
FT-IR	N	J	Sekundärstruktur von Proteinen	2–3 Gew.-%	Komplette Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen	Große Probenmengen sind notwendig; komplexe Datenanalyse	[64]
ITC	J	J	Thermische Analyse	1 Gew.-%	Zugang zur Thermodynamik der Adsorption	Große Probenmengen sind notwendig; komplexe Datenanalyse	[64]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Methode	Echtzeit	In situ	Gemessene Elemente	Nachweisgrenze ^[a]	Vorteile	Nachteile	Lit.
AFM	N	J	Kraft	1 pN	Zugang zur Kraft der Proteinadhäsion, auch für ein einzelnes Protein	Proteine müssen auf der AFM-Spitze immobilisiert werden; die absolute Menge des Proteins bleibt unbekannt	[66]
RIFS	J	J	Reflexion von weißem Licht	0.3 ng cm ⁻²	Hohe Empfindlichkeit; Temperaturunempfindlichkeit; Echtzeit- und In-situ-Analyse	Relativ schlecht Zeitauflösung; transparente Trägermaterialien	[67]
SPR	J	J	Oszillation von Elektronen	0.2 ng cm ⁻²	Hohe Empfindlichkeit; Echtzeit- und In-situ-Analyse	Teure Sensoren; nur wenige Oberflächenarten; limitierte Filmdicke	[68]
QCM	J	J	Frequenz eines Quarzkristalls	1 ng cm ⁻²	Gute Empfindlichkeit; Echtzeit- und In-situ-Analyse; verschiedene Oberflächen sind zugänglich; die mit dem viskosen Scherverlust zusammenhängende Dissipation kann gemessen werden	Nur eine Messung der hydratisierten Masse; Energieumwandlung beeinflusst die Massenberechnung	[69]

[a] Die genaue Nachweisgrenze betrifft die Qualität der Maschinen, die Art des gemessenen Proteins und die Messbedingungen. Die Werte in dieser Tabelle sind nur grobe Annäherungen. Abkürzungen: J = ja; N = nein; UV/Vis = ultraviolettsichtbar; SEC = Größenausschlusschromatographie; DLS = dynamische Lichtstreuung; XPS = Röntgenphotoelektronenspektroskopie; SAXS = Kleinwinkelröntgenstreuung; SANS = Kleinwinkelneutronenstreuung; ToF-SIMS = Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie; SFG = Summenfrequenzzerzeugung; FTIR = Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie; ITC = isothermale Titrationskalorimetrie; AFM = Rasterkraftmikroskopie; RIFS = reflektometrische Interferenzspektroskopie; SPR = Oberflächenplasmonenresonanz; QCM = Quarzkristallmikrowage; Q_{\max} = maximale Impulsübertragung.

den Lichtes ändert, kann eine Resonanz nur bei einem bestimmten Winkel des einfallenden Lichtes auftreten. Der Plasmonenimpuls hängt wiederum vom Brechungsindex an der Gold-Grenzfläche in der Flusszelle ab, da ihre abklingende elektromagnetische Welle sich im Medium ausbreitet. Somit verursachen Änderungen des Brechungsindex in der Flusszelle eine Änderung des Plasmonenimpulses, wodurch sich der einfallende Lichtwinkel, bei dem SPR stattfindet, verschiebt. Dieser Winkel ist zur Masse der adsorbierten Moleküle proportional, wenn die Oberfläche mit dem Elutionsmittel in Kontakt gehalten wird.

Die QCM ist eine akustische Methode, die Änderungen der adsorbierten Masse auf der Oberfläche eines piezoelektrischen Quarzkristalls misst. Durch Anlegen eines oszillierenden elektrischen Feldes an den Quarzkristall wird eine transversale Schallwelle erzeugt, die sich durch den Kristall fortpflanzt und an seinen Grenzflächen reflektiert wird. Die konstruktive Interferenz der reflektierten und der eingeschalteten Welle führen zu einer mechanischen Resonanz, die den Ausschlag der Oszillation um einen Faktor 100 erhöht (Abbildung 2B). Die enge Frequenzbreite für die Resonanz und die Tatsache, dass die Resonanzfrequenz von der gesamten oszillierenden Masse abhängt, ermöglicht die präzise Messung kleiner Störungen an der Grenzfläche, wie sie z.B. durch adsorbierte Moleküle hervorgerufen werden.^[72]

Obwohl SPR und QCM zeitlich hochauflöste Informationen zu spezifischen und unspezifischen Proteinwechselwirkungen liefern, können sie nicht direkt für Materialien verwendet werden, die eine ihrer Anwendung entsprechende Form aufweisen. Stattdessen werden üblicherweise goldbeschichtete Modellsensorchips verwendet, um die elektrische

Leitfähigkeit (QCM) sicherzustellen oder Plasmonen zu erzeugen (SPR). Zusätzlich sind die Trägheit von Gold und die Einfachheit der Oberflächenmodifizierung von Vorteil. Im Fall von SPR könnte Silber die bessere Wahl in Hinblick auf seine SPR-Eigenschaften sein, aber aufgrund seiner Oxidationsneigung wird es üblicherweise nicht in Betracht gezogen.^[73] Für die QCM ist eine Reihe verschiedener Beschichtungen auf der Goldschicht verfügbar, während die Auswahl für SPR eher begrenzt ist. Das kann auf den exponentiellen Abfall des abklingenden Feldes zurückgeführt werden. Durch das Aufbringen einer Beschichtung auf der Sensoroberfläche, die unvermeidlich das Volumen mit der höchsten Feldstärke besetzt, kann die Empfindlichkeit erheblich reduziert werden. Eine häufig verwendete Definition für die Abklinglänge bezieht sich auf die Länge, bei der die abklingende Feldintensität auf 1/e reduziert ist und die von der Größenordnung der halben Anregungswellenlänge entspricht.^[74] Ähnlich wie bei der SPR wird die Abklinglänge bei der QCM als der Abstand definiert, bei dem die Amplitude der Schallwelle auf 1/e ihres Wertes auf der Oberfläche gefallen ist.^[72] Gebundene starre Masse bewirkt eine entsprechende Verlängerung der Abklinglänge, wodurch es keinen Empfindlichkeitsverlust gibt. Für weiche Polymermaterialien wird jedoch aufgrund von Energiedissipation ein Abfall beobachtet.

Trotz der in beiden Fällen exponentiell abfallenden Felder, wird zwischen der adsorbierten Masse und dem relativen Signal im allgemeinen ein linearer Zusammenhang angenommen. Für SPR sollte dies gelten, wenn Proteinwechselwirkungen innerhalb einer Polymermatrix gemessen werden, weil der Ligand und der Analyt im Idealfall in der

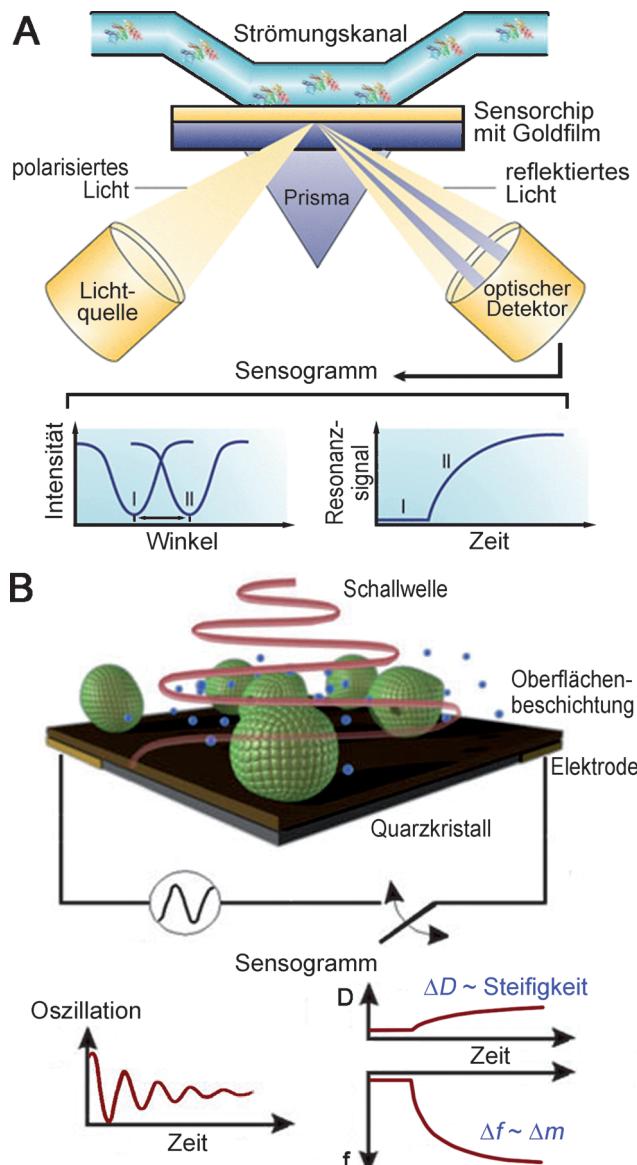


Abbildung 2. A) Prinzipieller Aufbau von Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Messungen unter Verwendung der Kretschmann-Konfiguration. Alle Laserstrahlen werden von der Rückseite des Sensors reflektiert, außer jenen, die in einem Winkel auftreffen, in dem das Metall adsorbiert und die Energie in eine plasmonische Welle umgewandelt. Dieser Resonanzwinkel ist von der Masse des Materials an der Oberfläche abhängig. Der Winkel verschiebt sich im linken Diagramm von I nach II, wenn Proteine auf der Oberfläche adsorbiert sind. Diese Verschiebung kann in Echtzeit verfolgt werden (Diagramm rechts). Wiedergabe nach Lit. [73] mit Genehmigung der Nature Publishing Group. B) Messung mit der Quarzkristallmikrowage (QCM). Der piezoelektrische Quarzkristall oszilliert und führt zu einer resonanten akustischen Scherwelle im Sensor, wenn ein elektrisches Wechselfeld senkrecht dazu angelegt ist. Die Resonanzfrequenz der Oszillation und Energie-dissipation verschieben sich, wenn Proteine auf der Oberfläche adsorbiert und die Masse und Viskoelastizität der Oberflächenschicht verändern. Die grünen Kugeln symbolisieren Proteine, die kleinen blauen Kugeln stellen das akustisch gekoppelte Wasser dar. „f“ ist die Frequenz und „D“ die Energiedissipation. Wiedergabe nach Lit. [74] mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

Matrix gleichmäßig verteilt sind.^[77] Wenn jedoch eine unspezifische Adsorption gemessen wird, dann können die Adsorbate einen Raum einnehmen, der von der Oberfläche bis in einen Bereich von bis zu mehreren dutzend Nanometern von der Oberfläche entfernt reicht, wo sie den gesamten Raum ausfüllen. Aufgrund des abklingenden Feldes verursachen Adsorbate innerhalb der ersten 10 nm Abstand von der Oberfläche ein fast dreifach stärkeres Signal als Adsorbate, die sich in einer Entfernung von 300 nm befinden.^[76] Das bedeutet auch, dass Beschichtungen mit verschiedener Dicke kaum unter Zuhilfenahme von Methoden wie SPR oder QCM verglichen werden können, weil die Empfindlichkeit vom Abstand zur Oberfläche abhängt. Darum könnten Abbaumethoden die erste Wahl sein, wenn Oberflächen verschiedener Dicke verglichen werden sollen oder wenn eine absolute Quantifizierung der Proteinadsorption, besonders im Fall von dicken Beschichtungen, vorgenommen werden soll.^[78]

Das schwingungsbasierte Messen im Fall von QCM erhöht zusätzlich die Komplexität bei der Quantifizierung, weil die dissipativen Eigenschaften des Adsorbats ein lineares Verhältnis zwischen der Frequenz und der adsorbierten Masse verhindern. Trotzdem wird für starr angebundene Adsorbate ein lineares Verhältnis angenommen, das der Sauerbrey-Gleichung entspricht. Im Gegensatz dazu folgen Proteinschichten, die die Masse des assoziierten Wassers mit einschließen,^[79,80] der Oszillation nicht starr. Im allgemeinen verursacht ein hoher Wasseranteil einen Abfall der Viskosität, was wiederum zu einem Anstieg der Dissipation führt. Da das Sauerbrey-Modell diese Energiedissipation nicht mit einbezieht, können die errechneten Massen deutlich kleiner als die tatsächliche Masse sein. Die Änderung der Dissipation kann jedoch leicht durch das Ausschalten des Oszillators und die Messung der exponentiell abfallenden Amplitude der Oszillation bestimmt werden.^[81] Wenn die Dissipation, die Resonanzfrequenz und wahlweise noch ergänzende Methoden gegeben sind, so sind verschiedene Quantifizierungsmodelle verfügbar. Aufgrund der Komplexität des Themas wird der Leser hiermit auf den exzellenten Aufsatz von Reviakine et al. verwiesen.^[82] Es muss hier noch erwähnt werden, dass die Empfindlichkeit der QCM aufgrund der dissipativen Effekte sowohl Vorteile (mehr Information) als auch Nachteile (komplexe Modellierung) hat. Einerseits verkompliziert sie die Quantifizierung und andererseits ist dies ihr Hauptvorteil gegenüber optischen Biosensoren, die gegenüber Strukturänderungen weniger empfindlich sind.

Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS)

ToF-SIMS ist eine Massenspektrometrietechnik zur Detektion adsorbiertener Moleküle auf festen Oberflächen. Ein gepulster Ionenstrahl wird bei der SIMS verwendet, um Molekülfragmente von der Oberfläche des adsorbierten Proteins abzuspalten. Die Sekundärionenfragmente werden dann in einem elektrischen Feld auf eine einheitliche kinetische Energie beschleunigt, wobei die Geschwindigkeit eines Ions von seinem Masse-Ladungs-Verhältnis abhängt. Mit dem ToF-Detektor wird die Geschwindigkeit gemessen, aus der das Masse-Ladungs-Verhältnis bestimmt werden kann.

Aufgrund seiner hohen Oberflächen- und chemischen Empfindlichkeit wurde ToF-SIMS zur Unterscheidung zwischen verschiedenen adsorbierten Proteinen und zur Quantifizierung der Zusammensetzung von Proteinmischungen herangezogen.^[83,84] Die Interpretation der Daten verschiedener Proteine ist jedoch immer eine Herausforderung, da SIMS nur für kleine Fragmente mit $m/z \leq 500$ möglich ist.^[85] Oft können selbst einzelne Peptide nicht in ihrer kompletten Form detektiert werden. Um die Informationen in den niedermolekularen Fragmenten zu entziffern, wird die statistische Methode der Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) mit den charakteristischen Peaks eines bekannten Systems kombiniert.^[86] Zusätzlich weist ToF-SIMS eine gute Empfindlichkeit bezüglich der Konformation, der Position und der Orientierung der Proteine auf der Oberfläche auf.^[87] Das liegt an der sehr geringen Eindringtiefe von SIMS (10–15 Å),^[88] die kleiner als die physische Ausdehnung vieler Proteine ist. Somit werden unter den richtigen Bedingungen nur die äußersten Aminosäurereste der adsorbierten Proteine analysiert.^[85] Insgesamt ist ToF-SIMS eine Entwicklungstechnologie, die neue Details der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche aufzeigt.

2.3. Die Charakterisierung der Proteinadsorption auf Partikeln in Lösung

Die Adsorption von Proteinen auf Polymeroberflächen kann mithilfe kolloidaler Kern-Schale-Partikel mit wohldefinierter Polymerschale untersucht werden. Erwiesenermaßen haben kolloidale Partikel mit einer typischen Größe von ca. 100 nm selbst bei geringen Partikelkonzentrationen eine große Oberfläche, sodass eine ausreichend große Menge an Protein in kleinen Volumina adsorbiert werden kann. Die Proteinadsorption kann also auf kolloidalen Partikeln mit einer Reihe von Methoden untersucht werden, die allgemein für die Charakterisierung von Partikeln entwickelt worden sind. Mithilfe eines kürzlich veröffentlichten Aufsatzes^[64] zu diesem Thema wollen wir die drei Hauptmethoden und ihre Ergebnisse kurz erläutern.

Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC nutzt den Enthalpieeffekt, der durch eine Proteinadsorption auf Nanopartikeln in Lösung erzeugt wird. Im Ergebnis gibt diese Methode eine direkte thermodynamische Information, die nicht auf planaren Oberflächen erhalten werden kann. Dieser offensichtliche Vorteil der ITC bei der Untersuchung von Proteinadsorptionen hat zu einer Vielzahl an Untersuchungen geführt, die kürzlich ausführlich besprochen wurden.^[64] Im Allgemeinen misst man bei der ITC die Entwicklung der Wärme Q beim Mischen einer kleinen Menge Protein mit einer Partikellösung in Wasser. Abbildung 3 zeigt ein Beispiel einer solchen Messung. Die Verdünnungswärme des Proteins muss in einem separaten Experiment bestimmt und von den erhaltenen Messwerten abgezogen werden. Die Integration der ITC-Rohdaten ergibt dann die Wärme ΔQ als Funktion des molaren Verhältnisses zwischen Protein und Partikeln. Eine klare Voraussetzung für

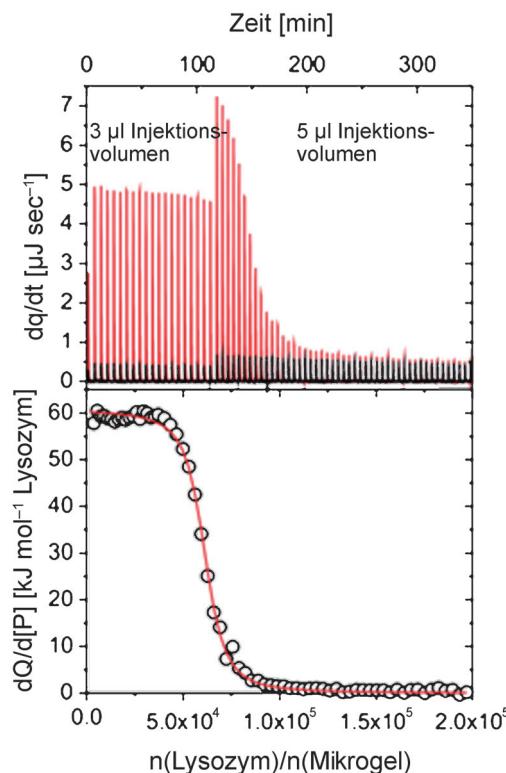


Abbildung 3. Analyse der Proteinadsorption durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC). Oberer Teil: ITC-Signal der Lysozymbindung an Mikrogelpartikel bei 298 K in einer Pufferlösung. Die schwarzen Ausschläge sind die Verdünnungswärmen des Proteins, die roten Ausschläge sind die Wärmeänderung nach jeder Proteininjektion in die Partikeldispersion. Unterer Teil: Die integrierte Wärme Q jeder Lysozymportion (Kreise), die in die Partikeldispersion injiziert wurde. Die Verdünnungswärme wurde bereits vom Gesamtsignal abgezogen. Die rote Linie stellt die auf der Langmuir-Isotherme beruhende Anpassung dar. Wiedergabe nach Lit. [94] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

diese Methode ist, dass ein Gleichgewicht erreicht werden kann. Das ist z. B. im Fall hydrophober Partikel nicht gegeben, bei denen eine irreversible Adsorption stattfindet. Da das Gleichgewicht die Grundlage für die anschließende thermodynamische Analyse ist, muss dieser Punkt für jeden betrachteten Einzelfall sorgfältig evaluiert werden.

Da die Auswertung der ITC-Daten normalerweise auf einer Langmuir-Adsorptionsisotherme beruht, wird eine gegebene Zahl von Adsorptionsstellen für ein bestimmtes Protein angenommen. Das Ergebnis dieser Analyse ist die Adsorptionskonstante K und die Anzahl der Adsorptionsstellen N . Kürzlich wurde eine Auswertungsmethode für ITC-Ergebnisse entwickelt, die unabhängig von diesen eher stringenten Annahmen ist.^[96] In diesem Fall wird die resultierende Adsorptionswärme direkt an ein Modell angepasst, das die Hauptantriebskräfte der Adsorption, d. h. die elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen einbezieht (siehe Abschnitt 2.5).

Ein weiterer Punkt, der Aufmerksamkeit erfordert, ist die Abhängigkeit der gemessenen Adsorptionswärme von der Temperatur. Die allgemeine Thermodynamik besagt, dass die

Bindungsenthalpie sich über die folgende Gleichung aus der van't-Hoff-Gleichung ergibt:

$$\left(\frac{d \ln K}{dT^{-1}}\right)_p = -\frac{\Delta H_{\text{bind}}}{R} \quad (1)$$

Somit kann ΔS_{bind} also aus der Temperaturabhängigkeit der freien Energie abgeleitet werden:

$$\frac{d \Delta G_{\text{bind}}}{dT} = -\Delta S_{\text{bind}} \quad (2)$$

Aktuelle ITC-Untersuchungen, z.B. zur Protein-Protein-Wechselwirkung oder Proteinentfaltung haben jedoch Abweichungen zwischen der direkt über die ITC bestimmten Enthalpie und der Bindungsenthalpie gezeigt, die aus der Anwendung des van't-Hoff-Gesetzes auf die hergeleitete Bindungskonstante erhalten wird.^[97,98] Es wurde vorgeschlagen, dass im Falle einer Proteinadsorption die mittels ITC gemessene Enthalpie auch andere Beiträge enthält, die nicht direkt mit dem Adsorptionsgleichgewicht zusammenhängen. Somit gilt

$$\Delta H_{\text{itc}} = \Delta H_{\text{bind}} + \Delta H_{\text{res}} \quad (3)$$

wobei nur ΔH_{bind} auf die Bindung des Proteins an die Partikel zurückzuführen ist. ΔH_{res} wird durch anderweitige Gleichgewichte verursacht, d.h. durch Prozesse, die unabhängig vom Bindungsprozess stattfinden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass diese Restenthalpie durch die Protonierung von Lysozym verursacht wird, das an ein saures Mikrogel gebunden ist.^[95] Ein anderes Beispiel ist die Adsorption von RNase A an sphärische Polyelektrolyt-beschichtete Partikel.^[92] Für diesen Fall hat sich herausgestellt, dass die Adsorptionswärme sehr klein ist, und die mittels ITC gemessenen Wärme auf andere Prozesse zurückzuführen ist. Dieser Aspekt macht deutlich, dass weitere Untersuchungen dringend erforderlich sind und, dass die Ergebnisse der ITC sich nicht immer direkt und einfach interpretieren lassen.

Schließlich kann die ITC auch zur Bestimmung der Enzymaktivität gebundener Proteine herangezogen werden.^[99] Da die Wärme einer durch das Enzym katalysierten, chemischen Reaktion direkt gemessen wird, ist kein kalorimetrischer Assay erforderlich. Somit kann die ITC wertvolle Informationen über die Tertiärstruktur adsorbiertener Proteine liefern und zeigen, zu welchem Anteil die enzymatische Aktivität durch die Adsorption erhöht oder erniedrigt wird.

Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

Die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS; small angle X-ray scattering) und Kleinwinkel-Neutronenstreuung (small angle neutron scattering, SANS) können zur Messung des Radialdichteprofils sphärischer Partikel genutzt werden.^[100] Im allgemeinen sind Kleinwinkel-Streumessungen bezüglich des Kontrasts der untersuchten Objekte empfindlich, d.h. bezüglich des Unterschieds zwischen der Streulängendifferenz des gelösten Objekts und einem Dispergiermedium wie z.B. Wasser. Da Proteine generell einen sehr guten Kontrast haben, ist die SAXS zur Untersuchung der Proteinadsorption

auf Partikeln besser geeignet als SANS. Die gemessene Streuintensität $I(q)$ (q : Betrag des Streuvektors; $q=(4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, λ : Wellenlänge der Strahlung, θ : Streuwinkel) von sphärischen Partikeln ist durch folgende Gleichung gegeben (siehe auch den Aufsatz in Lit. [100]):

$$I(q) = B^2(q) \quad (4)$$

wobei die Streuamplitude durch folgende Gleichung gegeben ist:

$$B(q) = 4\pi \int_0^\infty [\rho(r) - \rho_m] - \frac{\sin qr}{qr} r^2 dr \quad (5)$$

Hier ist $\rho(r)$ die radiale Elektronendichte und ρ_m die entsprechende Menge des Dispergiermediums. Das zentrale Ergebnis einer SAXS-Messung für den Fall einer Proteinadsorption an Partikeln ist die Radialdichte des adsorbierten Proteins, woraus ausführliche Informationen über den Adsorptionsprozess gewonnen werden können. Trotz dieser wertvollen Informationen werden SAXS (und SANS) in diesem Bereich nicht sehr oft verwendet, und die Zahl an Veröffentlichungen zu diesem Thema ist gering.^[101–104] SAXS wurde auch verwendet, um die Adsorption von BSA an sphärischen Polyelektrolytbürsten zu beobachten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die zeitaufgelöste SAXS umfassende Informationen für eine erweiterte Untersuchung der dynamischen Prozesse der Proteinadsorption liefern kann.

Fourier-Transformations-Infrarot(FTIR)-Spektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie ist eine wertvolle Methode zur Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen sowohl in wässriger Lösung^[105,106] als auch im adsorbierten Zustand.^[107–110] Die Proteinsekundärstruktur wird auf Grundlage des Adsorptionsmusters der charakteristischen Amidbanden untersucht, d.h. der Amid-I- und Amid-II-Schwingungsmoden der Proteinamidgruppen im IR-Bereich zwischen 1500 und 1700 cm⁻¹ (Abbildung 4). Dies sind die empfindlichsten Schwingungsmoden zur Bestimmung des Gehaltes an α -Helix und β -Faltblatt und somit der Sekundärstruktur. Diese Methoden können auch für adsorbierte Proteine verwendet werden und gehören zu den wertvollsten Werkzeugen zur Untersuchung möglicher Veränderungen der Sekundärstruktur, die durch die Adsorption hervorgerufen werden können.

In Abbildung 4 ist ein Beispiel einer solchen Analyse gezeigt, worin die Spektren von adsorbiertem und natürlichem Hämoglobin verglichen werden. Hier wurde Rinderhämoglobin auf einer sphärischen Polyelektrolytbürste mit Poly(styrolsulfonsäure)-Ketten adsorbiert.^[102] Die verschiedenen Spektren geben einen genaueren Einblick in die Konformationsänderungen, die durch die Wechselwirkung mit der sphärischen Polyelektrolytbürste verursacht werden (Abbildung 4, rote Linie). Die Adsorption bewirkt eine deutliche Änderung der Sekundärstruktur. Die Maxima der Amid-I-Banden liegen in beiden Fällen bei 1656 cm⁻¹. Die

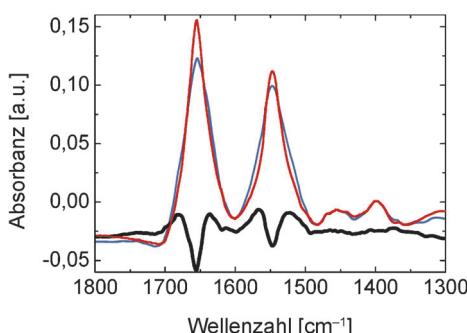


Abbildung 4. FTIR-Spektren von natürlichem Hämoglobin (rote Linie, vor der Adsorption gemessen) und von adsorbiertem Hämoglobin auf einer sphärischen Polyelektrolytbürste (blaue Linie). Die IR-Adsorption ist in der Amid-I- (1600–1700 cm⁻¹) und Amid-II-Region (1480–1575 cm⁻¹) aufgetragen. Die Spektren sind auf die gleiche Konzentration des Rinderhämoglobins normiert. Das Differenzspektrum des adsorbierten und natürlichen Proteins (schwarze Linie) zeigt, dass die Adsorption zu strukturellen Änderungen der Sekundärstruktur des Hämoglobins führt. Wiedergabe nach Lit. [102] mit Genehmigung der American Chemical Society.

geringere Intensität des adsorbierten Hämoglobins ist auf den durch die Adsorption verursachten deutlichen Verlust der α -helikalen Struktur zurückzuführen. Dieser wird von der Bildung einer β -Faltblattstruktur begleitet (vergleiche die Signale der Differenzspektren bei 1682 cm⁻¹ und 1636 cm⁻¹, die im Spektrum des natürlichen Hämoglobins nicht vorkommen). Der helikale Anteil verringert sich in Abhängigkeit von der Menge des adsorbierten Proteins von 71 % auf 34–42 %. Zusätzlich werden während der Adsorption 10 bis 13 % der β -Faltblattstruktur gebildet. Zusammenfassend ist die FTIR-Spektroskopie in der Lage, Informationen über die Änderung der Sekundärstruktur zu liefern, die mit anderen Methoden nicht verfügbar sind (zumindest nicht für Proteine auf Oberflächen).

2.4. Biochemische Methoden

Die biochemische Analyse der Adsorption einzelner oder mehrerer Proteine oder auch einer komplexen Proteinmischung ist eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung von Biomaterial-Protein-Wechselwirkungen. Im Vergleich zu Polymerfilmen als Testsubstraten können Mikro-/Nanopartikel mit großen Oberflächen im Hinblick auf Empfindlichkeit und die gebundenen Mengen bei mechanistischen Untersuchungen durchaus von Vorteil sein, aber sie können auch mit bestimmten experimentellen Herausforderungen einhergehen. Zum Beispiel kann eine massive kolloidale Stabilisierung bei gleichzeitig hoher Konzentration an ungebundenen Proteinen in der Lösung zwischen den Teilchen eine quantitative Trennung von Substrat und Medium erschweren, wie sie für deren nachfolgende separate Analyse benötigt wird. Die dynamische Bewegung kleiner Partikel kann wiederum die Kinetik der Proteinadsorption beeinflussen, und die Partikel könnten somit für die Verwendung in oberflächenbasierten analytischen Techniken weniger geeignet sein. Zusätzlich muss bedacht werden, dass Partikeloberflächen ausgeprägte Unterschiede zu mit anderen Methoden hergestellten Volumenmaterialien aufweisen können. Beispiele sind die

Verwendung von Tensiden für die Partikelherstellung und -stabilisierung oder die bevorzugte Anordnung einer Art von Wiederholungseinheiten eines Copolymers an der wässrigen Grenzschicht während der Partikelherstellung.

Neben der Verwendung verdünnter Proteinfösungen für mechanistische Studien ist es besonders interessant, anwendungsrelevante Konzentrationen für Vorhersagestudien zu verwenden, z.B. in Konkurrenz- und Austauschexperimenten. Es konnte z.B. an Zellkulturplatten mit verschiedenen bereitgestellten Bindungskapazitäten gezeigt werden, dass Fibronektin nur bei geringer Konzentration Unterschiede im Adsorptionsverhalten aufweist und dass diese Unterschiede bei höherer Konzentration unbedeutend sind.^[111] Während der Überstand einer Polymerprobe mit dem Anteil der nicht-adsorbierten Proteine leicht zugänglich ist, ist eine höhere Genauigkeit bei der Charakterisierung des adsorbierten Polymerteils notwendig. Die immunochemische Analyse mit Hilfe der polyklonalen Antikörperfärbung erlaubt die Parallelbestimmung eines oder mehrerer Proteinanhäufungen direkt an der Oberfläche.^[112] Zusätzlich kann sie Hinweise auf die Konformation eines oder mehrerer der adsorbierten Proteine liefern, wenn monoklonale Antikörper für kryptische Epitope verfügbar sind, die nur nach Entfaltung exprimiert sind.^[113]

In vielen Fällen wird die Proteindesorption z.B. mit Detergentien^[114,115] unterstützt, um die Proteine für die weitere Untersuchung in Lösung freizusetzen. Eine wichtige Methode ist in diesem Zusammenhang die Elektrophorese, die besonders bei Techniken wie 2D- und/oder Western-Blot-Methoden Anwendung findet.^[116,117] Es sollte bedacht werden, dass verschiedene Methoden, einschließlich vergleichender instrumenteller Analysen von oberflächengebundenen Proteinen (z.B. mit XPS und einer biochemischen Analyse der desorbierten Proteine in Lösung), auch deutlich unterschiedliche Ergebnisse liefern können.^[118] Das liegt sowohl an der unvollständigen Desorption und/oder der begrenzten Fähigkeit der entsprechenden Oberflächenanalysemethode, die poröse Polymeroberfläche zu erreichen. Alternativ können gebundene Proteine auch einer Hydrolyse unter sauren oder basischen Bedingungen unterzogen werden. Nachfolgend können dann die Abbauprodukte, in diesem Fall die einzelnen Aminosäuren, quantifiziert werden.^[119,120] Des Weiteren kann auch eine massenspektrometrische Analyse der adsorbierten Proteine^[121] im Anschluss an einen tryptischen Verdau durchgeführt werden, wobei die Fragmentanalyse den Nachweis adsorbiertener Proteine auch in komplexen Mischungen erlauben kann.^[122]

Da die Oberflächenbedeckung durch Proteine häufig sehr schnell abläuft, sind die klassischen biochemischen Methoden zur Untersuchung von Proteinen in Lösung, wie z.B. Chomophorreaktionen (Bicinchoninsäure-Assay, Bradford-Assay, Lowry-Assay usw.),^[123] nicht die erste Wahl zur kinetischen Verfolgung der Adsorptions- und Austauschprozesse, können aber zur Untersuchung des Gleichgewichtszustandes geeignet sein. Jede dieser Methoden kann nur verwendet werden, wenn einzelne Proteine untersucht werden oder wenn keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Proteinen notwendig ist. Eine individuelle Quantifizierung spezieller Proteine in Lösung erfordert entweder ihre Trennung,

z.B. durch Gelchromatographie, oder ihren direkten selektiven biochemischen Nachweis, z.B. mithilfe von Antikörpern^[111] oder Aptameren,^[124,125] oder indirekten Nachweis (nach einer Markierung).^[126–128]

Die Bindung von großen Fluoreszenzmarkierungen an Proteine kann jedoch wiederum ihre Physikochemie und möglicherweise auch ihre Konformation und Bioaktivität verändern. Dieses Problem kann durch die Verwendung von radioaktiven Markierungen überwunden werden,^[129] obwohl auch hier die Modifizierungsbedingungen zu Änderungen des Adsorptionsverhaltens führen können. Zusätzlich zum Nachweis der inhärenten Proteinfluoreszenz, die durch Tryptophan und Tyrosin entsteht, sind Fluoreszenzmarkierungen eine bevorzugte und sich stark verbreitende Methode zur selektiven Proteinquantifizierung.^[130] Posttranslatorische intrazelluläre Markierungen^[131] oder Festphasen-Kupplungsmethoden^[132] ermöglichen den Zugang zu Proteinen mit ortsspezifischen Markierungen und erlauben somit die Kontrolle von Quantität und Position der Fluoreszenzmarkierung im gewünschten Protein.^[133] Alternativ können Markierungen für immunochemische Proteinfärbungen auch an bestimmte Antikörper gebunden werden.

Thrombozytenaktivierung

Eine wichtige Frage ist, wie das entschlüsselte Proteinadsorptionsmuster das Verhalten von Biomaterialien im lebenden Organismus beeinflusst, was oft nicht vorhersagbar ist. Biochemische Proteinadsorptionsassays müssen mit einer funktionalen Analyse ergänzt werden, die auch die zellbasierten Reaktionen und die Auslösung der immunologischen Kaskadenreaktionen berücksichtigt, die insbesondere beim Kontakt eines Materials mit Blut auftreten. Die freigesetzten löslichen Faktoren und der Gesamtaktivierungsstatus können auch auf biochemischem Weg untersucht werden.

Es wird angenommen, dass die Adhäsion von Thrombozyten auf Materialoberflächen und die Auslösung der Gerinnungskaskade durch oberflächengebundene Proteine bedingt werden. Viele verschiedene Proteine, einschließlich Fibrinogen,^[134] Vitronectin, dem von-Willebrand-Faktor^[135] und aufgefaltetem Albumin,^[136,137] wurden mit diesem Prozess in Verbindung gebracht. Interessanterweise wird die Thrombozytenadhäsion nur teilweise durch die Menge des an der Oberfläche gebundenen Proteins beeinflusst, während die Art des Proteins und seine Konformation eine größere Rolle zu spielen scheinen. Die Bindung von Thrombozyten könnte allerdings toleriert werden, sofern sie nicht mit deren Aktivierung verbunden ist.

Wenn Testmedien aus Blut verwendet werden, können nach der speziellen Vorbehandlung des Blutes eines in der Regel gesunden Spender, verschiedenen Hämokompatibilitätsaspekte untersucht werden. Thrombozytenreiches Plasma (PRP), das zur Gerinnungshemmung mit Trinatriumcitrat behandelt wurde, ist für die Untersuchung von Thrombozyten-Biomaterial-Wechselwirkungen und deren thrombogenem Potential geeignet.^[138] Die Komplementaktivierung unter simulierten physiologischen Bedingungen kann untersucht werden, wenn Hirudin als Gerinnungshemmer in Vollblut verwendet wird.^[139] Für das häufig verwendete hepari-

nisierte Vollblut müssen relevante Unterschiede bezüglich der Konzentration und der Art des verwendeten Heparins zwischen den verschiedenen Laboratorien berücksichtigt werden, weil sie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflussen können. In allen Fällen müssen die Blutsammlung und -handhabung sehr standardisiert ablaufen, um einer Voraktivierung der Gerinnung oder einem Verlust von Zellfunktionen entgegenzuwirken.^[140]

Die Thrombozytenaktivierung wird mit der Freisetzung der folgenden Stoffe verbunden, die alle die Gerinnung begünstigen: Vasokonstriktoren (Thromboxan, Thrombozyten-Wachstumsfaktor, Serotonin), Vermittlern der Thrombozytenaggregation (Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Adenosintriphosphat, Thrombozytenaktivierungsfaktor (PAF)) und Promotoren der Thrombozytenadhäsion (Fibronektin, von-Willebrand-Faktor). Die anschließende Verklumpung kann auch weit entfernt von einem Gefäßimplantat zu Thrombosen und Infarkten führen, was die Hauptgefahr bei der Anwendung von Biomaterialien darstellt. Trotzdem ist es aufgrund der kurzen Freisetzungzeiten, dem lokalen Auftreten, und der niedrigen Konzentrationen nicht praktikabel, die Proteinfreisetzung aus Thrombozyten zu untersuchen, um die Thrombozytenaktivierung im lebenden Organismus einzuschätzen zu können.

Besser ist es, während der Aktivierung die Änderungen des Thrombozytenphänotyps bezüglich seiner Größe und Form, d.h. die Änderung von der diskoiden zur flachen ausbreiteten Form zu beobachten. Die Größe und Form von einzelnen Thrombozyten in einem bestimmten Aktivierungsstadium wird mit 0 bis VI klassifiziert, und die durchschnittliche Größe eines Thrombozyten auf einem Biomaterial liefert viele Informationen über den Grad seiner Aktivierung.^[138] Zusätzlich kann die gesamte Fläche eines Biomaterials berechnet werden, die nach dem Vollblutkontakt mit Thrombozyten bedeckt ist. Ein wichtiger Schritt hin zu einem schnelleren Screening wäre die automatisierte Identifizierung eines einzelnen Thrombozyten auf einer Oberfläche und des entsprechenden thrombozytenbedeckten Bereichs, was kürzlich mithilfe der optischen Mikroskopie untersucht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verwendete Datenauswertungsmethode bei Verwendung eines zweistufigen Filters für den Abzug des Hintergrundes mithilfe des Rolling-Ball- und des Wasserscheidensegmentierungsalgorithmus sehr erfolgreich ist.^[141]

Eine andere Möglichkeit zur Visualisierung des Aktivierungsgrades von Thrombozyten verwendet die Immunfärbung bestimmter Proteine auf den Thrombozyten. In Abhängigkeit ihres Aktivierungsgrades ändert sich das Muster der Proteine auf der Thrombozytenoberfläche, d.h., nicht-aktivierte Thrombozyten sind mit Albumin bedeckt, während dies bei aktivierte Thrombozyten nicht der Fall ist. Darum können nicht-aktivierte im Gegensatz zu aktivierte Thrombozyten mit Antikörpern gegen Albumin angefärbt werden. Im Gegensatz dazu kann Fibrinogen hauptsächlich auf aktivierte Thrombozyten nachgewiesen werden. Andere Proteine, die ausgewertet werden können, sind Myosin, Aktin, α -Aktinin, Tropomyosin und Vinculin.^[142]

Die Plasmagerinnung kann von Biomaterialien über einen thrombozytenunabhängigen Mechanismus („Kontakt-

aktivierungsmechanismus“) ausgelöst werden, wobei man nicht vergessen darf, dass nur die Aktivierung beider Mechanismen zu einer schnellen Gerinnung führt. Die Kontaktaktivierung wird in klinischen Chemielabotorien routinemäßig gemessen, um die Blutgerinnung bei Patienten zu beurteilen. Die verbreitetsten Methoden sind hierbei die Messung der Prothrombinzeit (PT), die das äußerliche Gerinnungssystem betrifft, sowie die (aktivierte) partielle Thromboplastinzeit [(a)PTT], die das intrinsische Gerinnungssystem repräsentiert.

Komplementaktivierung

Die immunologischen Reaktionen auf Biomaterialien können ihre In-vivo-Anwendung verhindern oder stark einschränken. Im Gegensatz zu Antikörpern, die nach wiederholter Gabe von z.B. PEGylierten Verbindungen^[143] auftreten, ist das Komplementsystem Teil des angeborenen Immunsystems, das auf Biomaterialien mit Mechanismen reagiert, die ursprünglich für die Verteidigung gegen mikrobielle Eindringlinge entwickelt wurden. Die Aktivierung des Komplementsystems kann zu inflammatorischen Reaktionen auf Biomaterialien führen, und in dieser Hinsicht spielt die Proteinadsorption eine Hauptrolle. Darum gehört der Test auf Komplementaktivierung zu einem wichtigen Funktions- test für die Bewertung der biologischen Effizienz von Biomaterialien. Für einen umfassenden Überblick über das Komplementsystem wird auf die Spezialliteratur verwiesen.^[144] Ungefähr 30 verschiedene Proteine sind an der Komplementaktivierung beteiligt, bei der der Schlüsselschritt die Proteolyse der Komponente 3 (C3) zur Komponente 3b (C3b) ist. Diese Spaltung ist über verschiedene Reaktionswege möglich, von denen aber im Zusammenhang mit der biomaterialinduzierten Komplementaktivierung nur zwei eine Rolle zu spielen scheinen.^[145,146] Die C3b-Bildung ist entweder Teil des klassischen Weges, der durch die C3-Bindung an die Biomaterialoberfläche vermittelt wird, oder des alternativen Weges. Dieser tritt bei spontaner Hydrolyse von C3 in Plasma mit einem Mangel an Inhibierung durch eines der Regulierungsproteine, wie z.B. Faktor H, auf. C3 bindet in der Regel nicht direkt an eine Oberfläche, sondern an zuvor adsorbierte Proteine, und hier besonders an Albumin, Fibrinogen oder IgG. Man nimmt an, dass die direkte kovalente Bindung von C3b an unverträgliche Oberflächen einen wichtigen Schritt für seine spätere Bioaktivität darstellt. Die kovalente Bindung kann über Amid- oder Esterbindungen erfolgen, weshalb Materialoberflächen mit nukleophilen Aminogruppen möglicherweise besonders stark komplementaktivierend sind. Die Quantifizierung von Proteinen des Komplementsystems, z.B. von C3b, durch SPR oder QCM ist eine Option zur Beurteilung des Einflusses eines Biomaterials auf die Komplementaktivierung. Die Bildung und Verankerung von C3b führt zur Freisetzung von Anaphylatoxinen, wie z.B. der Komponente 3a (C3a) und 5a (C5a). Unabhängig vom Reaktionsweg ist darum die Konzentration von C5a im Plasma oder Serum nach der Inkubation mit einem Biomaterial ein effektives Maß für den Grad der Komplementaktivierung.^[147,148] Ein wichtiger Punkt ist hier die katalytische Produktion von C5a, dessen erhöhte Werte mit dem Enzyme-

Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) detektiert werden können. Auf der Suche nach Biomaterialien mit geringen komplementaktivierenden Eigenschaften ist die bevorzugte Adsorption von regulatorischen Molekülen und hier insbesondere des Faktors H von Interesse. Die Faktor-H-Adsorption reguliert den alternativen Weg und könnte die Immunantwort auf Biomaterialien reduzieren.^[149]

Partikelbasierte Affinitätschromatographie komplexer Proteinproben zur Identifizierung von Polymerbindungspartnern

Die Trennung biochemischer Mischungen durch Affinitätschromatographie wird durch die spezifische Wechselwirkung der stationären Phase mit den Biomolekülen erreicht. Die stationäre Phase besteht aus polymerbeschichteten Beads, die Proteine aus Mischungen, z.B. menschlichem Serum oder Plasma, spezifisch adsorbieren können. Es ist eine praktikable und unkomplizierte Methode, die sich sowohl für eine nachfolgende Proteinidentifizierung als auch für Biokompatibilitäts- und Nanotoxizitätsprüfungen im allgemeinen eignet.

Eine allgemeine Regel ist, dass die Bindung von humanem Serum an unfunktionalisierte Beads mit der an funktionalierte Beads verglichen werden sollte, die zusätzliche, intrinsische polymerspezifische Bindungsproteine diskriminieren. Um dieses Ziel zu erreichen, kann eine Säulenpackung der Beads die spätere Handhabung, wie z.B. die Beladung mit Protein, das Waschen, die spezifische Auswaschung von gebundenen Wechselwirkungspartnern sowie die Regenerierung des funktionalen Trägermaterials vereinfachen. Durch Anwendung der 1D- und 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) kann das Protein von den bloßen polymerfunktionalisierten Beads getrennt werden, und die einzelnen Proteinspots können mittels Massenspektrometrie und Sequenzierungsmethoden analysiert werden.

Es wird angenommen, dass das Plasmaproteom aus ungefähr 3700 Proteinen besteht.^[150,151] Wenn man bedenkt, dass die Proteinkorona-Bildung von Nanopartikeln in erster Linie durch besonders häufig auftretende Proteine wie Albumin, Immunglobine, Fibronectin und Apolipoproteine bestimmt wird, dann ist es nicht überraschend, dass mit ähnlichen Methoden auf unterschiedlichen Oberflächen ähnliche Proteimuster als Bindungsproteine identifiziert wurden.^[152] Darum sind Proteine mit höherer Bindungsaffinität oft durch ihre geringe Häufigkeit in komplexen biologischen Proteinalösungen versteckt. Zusätzlich ist die Identifizierung realer Bindungspartner oft fraglich, da eine indirekte Bindung durch Überbrückungsproteine ein häufiges Phänomen ist. Um die direkten Wechselwirkungen mit der Polymeroberfläche zu beurteilen, sind zusätzliche Techniken wie SPR, ITC oder die mikroskalige Thermophorese (MST) notwendig, um die Proteinbindung auf einzelnen gereinigten Proben zu überprüfen. Da es sich bei der Proteinkorona-Bildung um einen dynamischen Prozess handelt, hat sie den Abbau eines häufig vorkommenden Proteins aus dem Plasma oder Serum zur Folge, der durch Affinitätschromatographie beobachtet werden kann. Das eröffnet die Möglichkeit, zusätzliche relevante Bindungspartner zu identifizieren.

2.5. Theoretische Werkzeuge zur Prüfung mechanistischer Hypothesen

Damit eine Oberfläche bioinert oder bioaktiv ist, muss die Proteinadsorption entweder verhindert oder kontrolliert werden. Dies ist auf gewisse Art und Weise das Hauptdogma, auf dem theoretische Modelle aufbauen, die den Einfluss von Beschichtungen auf Biomaterialien untersuchen. Wie schon in der Einleitung beschrieben, werden wasservermittelte hydrophobe und Hydratationskräfte für die Hauptakteure der Proteinadsorption gehalten – eine Sichtweise, die in „Bergs Gesetz“ zusammengefasst ist.^[21] Wenn man dieser empirischen Regel folgt, dann findet auf hydrophilen Oberflächen keine Proteinadsorption statt, weil Proteine nicht in der Lage sind, die Wassermoleküle auf der Oberfläche zu ersetzen, während das Gegenteil für hydrophobe Oberflächen der Fall sein sollte. Obwohl diese Ansicht mit vielen anfänglichen Experimenten in Einklang steht, haben spätere Untersuchungen verschiedener geladener hydrophiler Gele^[64, 95, 96, 103, 153] deutlich gezeigt, dass eine Proteinadsorption auch auf solchen Oberflächen stattfinden kann. Das verlangt nach verbesserten theoretischen Modellen, die in der Lage sind, diese Ergebnisse zu erklären. In diesem Zusammenhang ist es nun allgemein anerkannt, dass die physiko-chemischen Prozesse, die der Proteinadsorption zugrunde liegen, durch ein komplexes Zusammenspiel der Konformationsfreiheitsgrade des (reagierenden) Polymers und verschiedener polarer und unpolarer Wechselwirkungsmechanismen gelenkt werden.^[20] Unpolare Wechselwirkungen schließen sowohl Van-der-Waals-Kräfte als auch solvensvermittelte Phänomene wie die hydrophobe Anziehung^[22] oder Hydratationsabstoßung^[23] ein, die auch in Bergs Gesetz berücksichtigt werden. Die polaren Wechselwirkungen können durch eine Änderung der Salzkonzentration und des pH-Wertes beeinflusst werden und schließen sowohl unspezifische elektrostatische und ionische Abschirmungseffekte als auch lokale, spezifische nicht kovalent bindende Wechselwirkungen wie z.B. Salzbrücken oder Wasserstoffbrücken ein. Eine quantitative Beschreibung dieser miteinander stark verflochtenen und kooperativen Mechanismen erfordert mehrskalige grobkörnige Modellierungsansätze sowohl für die solvatisierten Polymere^[24–26] als auch für die Proteine,^[27, 28] um alle relevanten Zeit- und Längenskalen zu erfassen und gleichzeitig die chemische Spezifität zu bewahren.

In diesem Zusammenhang ermöglicht die Verbesserung der Computertechnik die Untersuchung von Proteinwechselwirkungen mit Oberflächen auf einer mikroskopischen Ebene mithilfe von partikelbasierten Computersimulationen,^[154] wie z.B. Moleküldynamiksimulationen mit expliziter Einbeziehung von Wasser^[155] oder grobkörnigeren solvensfreien Langevin-Simulationen.^[156] Die frühen Arbeiten auf diesem Gebiet konzentrierten sich auf den Einfluss von Größe und Volumeneffekten auf die konkurrierende Proteinadsorption auf einfachen Modelloberflächen. In diesen Studien wurde die Konkurrenz zwischen Protein-Protein- und Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen sowie der Einfluss von Proteingrößenverhältnissen auf die Bindung untersucht.^[157, 158] Aktuellere grobkörnigere Simulationen haben einen Einblick in Formeffekte und die Kinetik solcher Pro-

zesse gegeben.^[159] Auf der Mikroskala haben solche Simulationen mit expliziter Einbeziehung von Wasser auf rein hydrophilen, geladenen festen Oberflächen gezeigt, dass die treibende Kraft der Proteinadsorption die elektrostatische Anziehung zwischen Teilen des Proteins und der Oberfläche ist.^[160] Kürzlich haben Studien der Proteinadsorption auf realistisch modellierten Polyurethanpolymeroberflächen gezeigt, dass das Zusammenspiel zwischen den hydrophoben Resten, der Oberflächenrauheit und der Hydrophilie der Polymeroberfläche die Gesamtproteinadsorptionsaffinität bestimmt.^[161] MD-Studien der Adsorption von Lysozym auf einer kristallinen Polyethylenoberfläche haben auf der Molekülebene einen Einblick in das empfindliche Gleichgewicht zwischen der orientierungsabhängigen Proteinoberflächenwechselwirkung und der (De)Hydratation der Reaktanten während der Adsorption gegeben.^[162] Die beiden detaillierten Simulationen zeigen, dass die Verschiedenartigkeit der Proteine für das Ergebnis der spezifischen Wechselwirkungsmechanismen eine Schlüsselrolle spielt und dass nicht nur eine einzelne Wechselwirkung der Protein-Oberflächen-Adsorption zugeordnet werden kann. Während diese Simulationen einen wertvollen molekularen Einblick geben, sind die damit zugänglichen Zeit- und Längenskalen immer noch zu beschränkt, um den Adsorptionsprozess vollständig zu verstehen.^[163]

Auf einer eher mesoskopischen Skala (bei einer geringen Auflösung der Protein- oder Oberflächenatome oder von Hydratationseffekten) wurden sich ergänzende Ansätze auf der Grundlage von Gittermodellen,^[164] der Einzelketten-„Mean-Field“-Theorie,^[165, 166] der Dichtefunktionaltheorie (DFT)^[167–171] oder der molekularen Feldtheorie^[172–176] eingeführt. In diese können sowohl „Mean-Field“-Näherungen für die Elektrostatik als auch für die Excluded-Volume-Packung der Proteine einbezogen werden. In einer Reihe bahnbrechender Arbeiten haben Szleifer und Mitarbeiter sowohl die Effekte der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Systemkomponenten als auch die der unspezifischen Protein-Oberflächen- und Polymer-Oberflächen-Wechselwirkungen mit Bezug zum ausgeschlossenen Volumen aufgezeigt.^[168, 169, 171] Diese Studien haben eine stabile theoretische Grundlage zu der empirischen Regel geliefert, die besagt, dass die Konkurrenz um Oberflächenadsorptionsstellen zwischen den einzelnen Wiederholungseinheiten im Polymer und den Proteinen ein wichtiger molekularer Mechanismus ist, der die Proteinadsorption auf polymerbedeckten Oberflächen verhindert. Außerdem konnte diese Theorie weitere Einblicke dahingehend liefern, wie die Polymerparameter (z. B. Molekülmasse, Ankerdichte oder Hydrophobie) die bei der Proteinadsorption beobachteten Trends bestimmen. Zum Beispiel war es möglich, qualitativ und quantitativ zu erklären, warum lange Polymere selbst bei einer viel geringeren Ankerdichte die Proteinadsorption genauso effektiv verhindern können wie kurze Polymere. Dies wurde auf die Verformbarkeit des Polymerrückgrats zurückgeführt, die es aufgrund der Komprimierung durch die adsorbierten Proteine erlaubt, dass Monomere sich nahe der Oberfläche ansammeln können und dadurch eine Adsorptionsbarriere bilden. Dieser Mechanismus wirkt umso besser, je stärker die hydrophobe Oberflächen-Monomer-Anziehung

ist. Ein ähnlicher Mechanismus wurde von Halperin und Kröger beschrieben, die zeigen konnten, dass das Quellen und Kollabieren einer Polymerbürste drei verschiedene stabile Adsorptionsordnungen für Proteine hervorrufen kann: direkte Bindung an das Substrat, an das das Polymer gebunden ist, Einbettung in die Polymerbürste oder Bindung an die Bürstenoberfläche.^[172,173] Diese Modelle sind wichtig für die Klärung der Rolle der Polymerarchitektur für die Proteinadsorption, die durch Polymer-Oberflächen-Wechselwirkungen bestimmt wird. Bemerkenswerterweise beinhalten sie keinerlei elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Polymerketten und Proteinen. Die meisten Polymerbeschichtungen und Proteine sind jedoch geladen und erzeugen mesoskalige elektrostatische Potentiale und Felder. In diesem Zusammenhang zeigen elektrostatische „Mean-Field“ Erweiterungen der DFT-Methoden um konkurrierende Adsorptionen auf unbehandelten Oberflächen, dass mehrere Proteinschichten auftreten, deren Struktur durch die Salzkonzentration kontrolliert wird.^[167] Außerdem zeigen feldtheoretische Modelle, in denen die klassischen Polymerbürstentheorien^[177,178] mit den Effekten der Ladungsregulierung und der Proteinpackung kombiniert werden, wie sich während der Proteinbindung die elektrostatischen Potentiale selbst regulieren und von den Polymerkonformationen der Polyelektryltbürsten abhängen.^[166,174–176] Vor kurzem konnte auf einer eher konzeptionellen Ebene gezeigt werden, wie die elektrostatische Kooperativität von intrinsischen Bindungseffekten separiert werden kann, indem modernere Bindungsmodelle an experimentelle Bindungsisothermen für Lysozyme und Kern-Schale-Mikrogele angepasst wurden.^[96] All diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen die Bedeutung der elektrostatischen Mechanismen bei der Proteinadsorption auf Polymeroberflächen auf. Die Details eher lokaler elektrostatischer Korrelationseffekte, wie Salzbrückenbindungen oder Gegenionenfreisetzungsmechanismen^[91] wurden noch nicht vollständig experimentell und theoretisch bestätigt (siehe Abbildung 5).

Durch ihre enge Bindung an die thermodynamische Beschreibung der Proteinadsorption ist die kinetische Modellierung ebenfalls ein wichtiges Forschungsgebiet. Die Geschwindigkeiten der Proteinadsorption und -desorption werden durch die lokale Proteinmobilität in Lösung und der Polymermatrix bestimmt. Die Mobilitätsbeträge stammen teilweise von lokalen Protein-Polymer- und Protein-Protein-Wechselwirkungen, während weitreichende hydrodynamische Effekte ebenfalls eine Rolle spielen. Das Proteindiffusionsvermögen in Polymernetzwerken wird z.B. in Form der Reduktion des freien Netzwerkvolumens, der Verstärkung

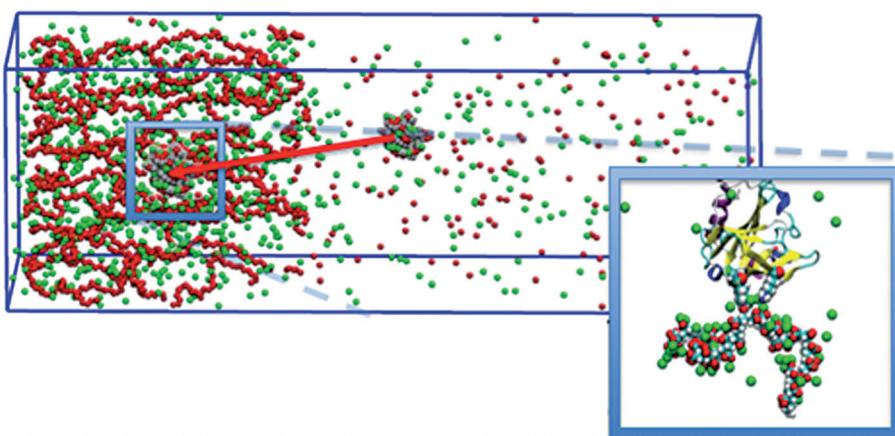


Abbildung 5. Die Darstellung von Salzbrücken, einem typischen ionischen Korrelationseffekt, der die Adsorption auf einer geladenen Polymerbürste vorantreibt. Rote und grüne Kugeln stellen die negativen bzw. positiven Ladungen dar. Im Erschub sind zwei „Salzbrücken“ zwischen dem Polymer und einem in die Polymermatrix eingebetteten Protein gezeigt. In diesem Modell wird die Proteinadsorption sogar dann thermodynamisch bevorzugt, wenn sowohl das Polymer als auch das Protein die gleiche Nettoladung tragen. Letzteres weist in Abhängigkeit von den Salzen in der Lösung verschiedene Formen auf. Abgesehen von den zuvor genannten Salzbrücken können die Manning-Kondensation und Gegenionenfreisetzungseffekte üblicherweise genügend starke thermodynamische Kräfte ausüben, um die Monopol-Monopol-Abstoßung zu überwinden.^[91]

des hydrodynamischen Soges auf die gelösten Stoffen in einem komprimierbaren Kontinuum und die durch Hindernisse bewirkte Verlängerung der diffusiven Weglängen beschrieben.^[179,180] Aufgrund der heterogenen Verteilung von Wechselwirkungen und Beweglichkeiten zwischen verschiedenen Proteinen zeigt die Zusammensetzung der adsorbierenden Proteinschicht in Mehrkomponentensystemen ein nicht-monotonen Verhalten mit der Zeit, den sogenannte Vroman-Effekt.^[15,181] Eine korrekte Beschreibung dieses Effekts und seiner Abhängigkeit von den Systemparametern ist wahrscheinlich die wichtigste Herausforderung bei der Entwicklung von Modellen zur Beschreibung der Proteinadsorptionskinetik. Üblicherweise wird der Vroman-Effekt als das Ergebnis der Konkurrenz zwischen der anfänglich schnellen Adsorption kleiner Proteine und der höheren thermodynamischen Stabilität der größeren (und damit langsameren) Proteine erklärt, die die kleinen auf lange Sicht verdrängen. Dieses vereinfachte Bild bezieht jedoch viele wichtige Faktoren nicht mit ein. Die Diffusion ist z.B. nicht der einzige Mechanismus, durch den Proteine sich bewegen; auch Konvektionsflüsse, die aufgrund von Gradienten der Freien Energie auftreten, sind von Bedeutung. Zusätzlich sind einige der thermodynamischen Kräfte, die die Proteinbewegung antreiben, nicht Größenabhängig. Daraus folgt, dass die Adsorption größerer Proteine nicht immer langsamer oder stabiler ist als die Adsorption kleinerer Proteine. Um diese Szenarien zu beschreiben und ein präziseres Bild der Proteinadsorptionskinetik zu erhalten, wurden Modelle zur Adsorption sowohl unbehandelter als auch polymerbeschichteter Oberflächen mit vielen verschiedenen Methoden untersucht. Diese reichen von partikelbasierten Molekularsimulationen^[159,163] bis hin zu den effizienteren grobkörnigeren Modellen, die auf Kontinuumstheorien^[167,168,170] oder Mastergleichungen aufbauen.^[95,182] Die partikelbasierten Molekü-

simulationen wurden nicht nur zum Verständnis der Dynamik einzelner Proteine verwendet,^[163] sondern auch, um die kollektiven Effekte zu untersuchen, die auf die Proteinform^[159] zurückzuführen sind, und um die Rolle von großeninduzierten Effekten zu klären.^[157,158] Zum Beispiel konnte gezeigt werden, wie die Proteinform zu verschiedenen effektiven Wechselwirkungen auf unbehandelten Oberflächen führen kann, wodurch eine nicht-monotone konkurrierende Adsorptionskinetik hervorgerufen wird.^[159] Hierbei handelt es sich um eine mögliche Erscheinungsform des Vroman-Effekts. Obwohl es nützlich ist, den Einfluss solcher molekularen Aspekte wie der Proteinform und der chemischen Struktur zu untersuchen, können partikelbasierte Simulationen nicht die relevante Zeitskala betrachten, die von Millisekunden bis zu Stunden oder Tagen reicht,^[64,95,103,168,182,183] was aber notwendig wäre, um den Vroman-Effekt in echten Systemen zu verstehen.

Die zwei wichtigsten Denkansätze zur Lösung dieser Aufgabe sind Mastergleichungen, die eine Langmuir-ähnliche Kinetik und Ab-initio-Modelle beschreiben, die auf dem so genannten „verallgemeinerten Diffusionsansatz“,^[168] d. h. „dynamischer DFT“ (DDFT) beruhen.^[184,185] Die Entwicklung von Langmuir-Kinetik-Modellen ist möglich, sobald für alle in Lösung vorliegenden Spezies die Gleichgewichtsbindungsconstanten für die Einzelkomponenten-Protein-Adsorption vorliegen. Zumindest bei einfachen Systemen konnte gezeigt werden, dass sie die beobachtete Kinetik verlässlich erklären.^[95,182] Zum Beispiel bieten sie eine Erklärung dafür, wie langlebige stabile Zustände in Systemen mit vielen Proteinarten auftreten können, die Stunden andauern, bevor das wahre Gleichgewicht erreicht wird,^[182] und erklären somit die offensichtlich widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse. Der molekulare Mechanismus dieser langlebigen Zustände ist der folgende: Während die Adsorption von der Diffusionszeitskala dominiert wird, die wiederum durch die Proteingröße und Lösungsmittelviskosität bestimmt ist, wird die Desorption durch die Notwendigkeit kontrolliert, ein stark gebundenes Protein von einer Oberfläche abzulösen. Dieses Protein mag nicht das thermodynamisch stabilere sein, adsorbiert aber anfänglich schneller auf der Oberfläche, weil es einen höheren Diffusionskoeffizienten hat, was eine mögliche Folge des Vroman-Effekts ist. Die Zeitskala für die Proteindesorption kann grob aus den bekannten Gleichgewichtsadsorptionskonstanten und der diffusionskontrollierten Debye-Geschwindigkeit berechnet werden^[64] und beträgt für typische Proteine auf unbehandelten Oberflächen mehrere Stunden. Ein Nachteil der Langmuir-Kinetikmodelle ist, dass alle Effekte der verschiedenen Antriebskräfte des betreffenden Systems einfach in einer einzigen Zahl zusammengefasst werden, die die Gleichgewichtsbindungsconstante der verschiedenen Spezies ist. Als solche sind sie nicht besonders hilfreich bei quantitativen Vorhersagen in Hinblick auf spezielle Auswahlkriterien, z.B. wie die Polymerankerdichte die beobachtete Kinetik beeinflussen wird. Es darf auch nicht vergessen werden, dass die Annahme einer Langmuir-ähnlichen Kinetik nicht immer gültig ist,^[186] und zwar besonders dann, wenn Größeneffekte eine Rolle spielen. Da zusätzlich die dynamischen Änderungen der verschiedenen Wechselwirkungen zwischen

den Spezies, die die Adsorption befördern, nur teilweise berücksichtigt werden, können Langmuir-Kinetikmodelle die vielen möglichen kooperativen Bindungsmechanismen nicht immer ausreichend beschreiben.

Um diese Probleme zu lösen, wurden von Szleifer und Mitarbeitern im Bereich der DDFT-Ansätze bereits wichtige Schritte in Richtung der Entwicklung einer gut begründeten theoretischen Beschreibung der Sorptionskinetik unternommen, in der Gleichgewichtsfunktionale der Freien Energie zur Erzeugung chemischer Gradienten in Diffusionsgleichungen verwendet werden.^[167–171] Unter Nutzung solcher Ansätze wurde z.B. gezeigt, dass Polymere, die nicht von der Oberfläche angezogen werden den für die Adsorption benötigten Zeitraum stark vergrößern können. Polymere dagegen, die stärker von der Oberfläche angezogen werden, obwohl sie weniger effektiv bezüglich der Adsorptionskinetik sind, eignen sich besser für die Verringerung der Proteinadsorption im Gleichgewicht. Der Einfluss von Parametern wie der Polymerlänge und -ankerdichte^[168,169] sowie der Proteinladung und Salzkonzentration im Medium^[167] auf einer unbehandelten Oberfläche adsorbierten Proteinmischung wurden untersucht. Auch wenn sie rechenintensiver sind als die Langmuir-Kinetikmodelle, sind DDFT-Modelle immer noch in der Lage, die relevanten Zeitskalen darzustellen, die üblicherweise an der konkurrierenden Proteinadsorption beteiligt sind,^[168] und bieten auf diese Art eine Möglichkeit zum Vergleich realer Systeme. Ein offensichtlicher Vorteil solcher Ansätze ist, dass sie auf molekularen Parametern wie der Polymerankerdichte und -länge aufbauen,^[168,169] wodurch sie sich direkt auf experimentell kontrollierbare Quantitäten beziehen und somit dem Materialwissenschaftler brauchbare Designregeln bereitstellen. Im Rahmen der DDFT muss noch eine Menge untersucht werden. Insbesondere ist die Kinetik geladener Systeme aufgrund der Kopplung der Proteinbewegung an die lokalen und zeitabhängigen elektrostatischen Felder nahe der Oberfläche sehr kompliziert.^[167] Es wurde gerade erst begonnen, diese Effekte zu untersuchen, z.B. auch unter Einbeziehung einer geladenen Polymerbeschichtung. Wenn man die Vielfalt der Wechselwirkungen betrachtet, die die Bindungsprozesse bestimmen, dann kann für die Resultate zukünftiger Modellstudien zur konkurrierenden Adsorptionskinetik von Proteinen an polymerbeschichteten Oberflächen ein sehr vielfältiges Verhalten erwartet werden.

3. Bioinerte und biospezifische Oberflächen

3.1. Bioinerte und proteinresistente Beschichtungen

Zahlreiche Polymere sind zur Herstellung proteinresistenter Beschichtungen verwendet und systematisch untersucht worden.^[40,187,188] Dabei hat in vielen Fällen die 3D-Architektur dieser Beschichtungen noch weniger Aufmerksamkeit erhalten als ihre jeweilige chemische Struktur. Allerdings ist die Verankerung, räumliche Anordnung und die Topologie sehr wichtig, um gut bedeckte Trägermaterialien zu erhalten und Proteinadsorption gänzlich zu unterbinden. Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Strategien für die Erzeugung dichter bioinserter Beschichtungen diskutiert.

Beschichtungen mit Monolagen

Die Beschichtung mit Monolagen ist die am häufigsten untersuchte und verwendete Methode, da auf diese Weise sehr gut kontrollierbare Strukturen mit entsprechend einfachen Beschichtungsmethoden erreicht werden können (Abbildung 6). Wirkungsvolle Methoden zur Herstellung solcher Monolagenbeschichtungen schließen die Selbstorganisation, die nicht-kovalente Physisorption und die kovalente Chemisorption ein.

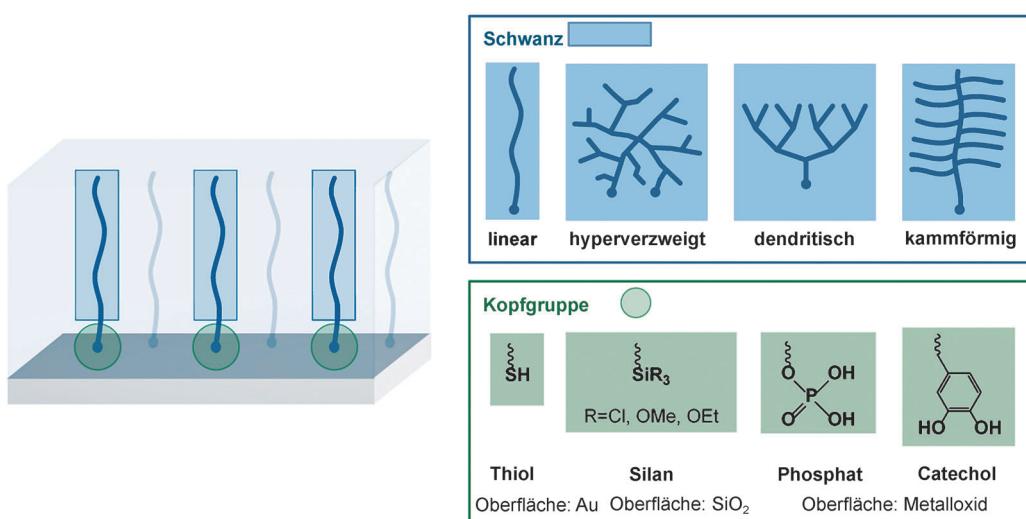


Abbildung 6. Darstellung einer typischen Monolage. Die Polymere für Monolagenbeschichtungen enthalten in der Regel Kopfankergruppen und funktionale Schwanzketten. Übliche verwendete Ankergruppen sind je nach Oberfläche z. B. Thiol-, Silan-, Phosphat-/Phosphonat- oder Catecholgruppen. Schwanzketten können linear, hochverzweigt, dendritisch und kammartig Bürstenstrukturen aus hydrophilen Polymeren sein.

Selbstassemblierte Monolagen (SAMs)

Selbstorganisierte Monolagen (SAMs; self-assembled monolayers) sind geordnete molekulare Formen, die sich durch spontane Adsorption organischer Moleküle auf festen Oberflächen bilden^[189] und somit eine bequeme, flexible und einfache Methode zur Modifizierung von Metall-, Metalloxid- und Halbleiteroberflächen bieten.^[190]

Whitesides und Mitarbeiter haben ω -funktionalisierte Alkanthiol-SAMs auf Gold verwendet, um die Wechselwirkungen von Proteinen mit organischen Oberflächen zu untersuchen. Die Hexaethylenglykol-terminierten SAMs zeigten eine sehr gute Proteinresistenz.^[33] Grunze et al. untersuchten diese Oligoethylenglykol(OEG)-SAMs auf Gold- und Silberoberflächen sowie den Einfluss der Polymerkettenkonformation auf die Proteinresistenz.^[191] Die OEG-Ketten nehmen auf einer Goldoberfläche eine helikale Konformation ein, die die Proteine abstößt. Auf Silberoberflächen nehmen sie hingegen eine *trans*-Konformation an, die Proteine adsorbiert. Computersimulationen mit der Monte-Carlo-Methode und Neutronenreflektivitätsuntersuchungen legen nahe, dass Wassermoleküle aufgrund der erheblichen konformativen Unordnung in helikalen SAMs diese in höherem Maße durchdringen können, als dies bei *trans*-orientierten SAMs der Fall ist.^[55, 192, 193] Zusätzlich wurde die Pro-

teinresistenz sowohl auf den OEG-SAMs mit hydrophoben Endgruppen als auch auf den Oligoethylenglykol-SAMs mit hydrophoberem Inneren stark verringert. Es wurde vorgeschlagen, dass sowohl die interne als auch terminale Hydrophilie das Eindringen von Wassermolekülen in das Innere der SAMs begünstigt, was eine notwendige Voraussetzung für die Proteinresistenz ist.^[194] Vor kurzem wurde sogar eine thermisch schaltbare, lineare Polyglycerol-Copolymer-Monoschicht für die reversible Zell- und Proteinadhäsion beschrieben.^[195]

Whitesides und Mitarbeiter untersuchten auch das Proteinresistenzverhalten von mehreren hundert SAMs mit verschiedenen funktionellen Gruppen auf Gold. Dabei wurde eine Reihe funktioneller Gruppen als proteinresistent identifiziert. In diesen systematischen Studien wurde auch der Wirkungsmechanismus von proteinresistenten Oberflächen durch Korrelation der Proteinresistenz mit der molekularen Struktur untersucht. Infolgedessen wurden die daraus abgeleiteten empirischen Leitlinien

zur Entwicklung proteinresistenter Oberflächen als die „Whitesides-Regeln“ bekannt (siehe auch die Einleitung).^[29, 30]

Die Selbstorganisation ist eine der effektivsten Methoden zur Herstellung von Monolagenbeschichtungen mit einer hohen Dichte und Oberflächenbedeckung. Um das thermodynamische Gleichgewicht zu erreichen, ist eine fehlerfreie Molekularstruktur notwendig, die eine Ankergruppe für eine reversible Bindung an die Oberfläche (z. B. über Thiol-Gold-Chemie) und eine geordnete Schwanzkette (meist lineare Alkyleinheiten) besitzt. Zur Erzeugung homogener Beschichtungen ist eine planare kristalline Oberfläche notwendig.^[190] Eine Alternative für eine größere Anwendungsbreite sind weniger geordnete, aber vielfältige Monolagenbeschichtungen, die durch nicht-kovalente Physisorption oder kovalente Chemisorption erhalten werden können.

Physisorption (nichtkovalente Adsorption)

Die Physisorption ermöglicht das Aufbringen bioinriger Beschichtungen auf verschiedenartigen Oberflächen, besonders im Hinblick auf chemisch inerte Polymeroberflächen. Typische Physisorptionsmethoden sind die Langmuir-Blodgett-Abscheidung, die hydrophobe Adsorption und elektrostatische Anziehung. Beispielsweise können Blockcopoly-

merbürsten über einen ihrer Blöcke auf einer Oberfläche physisorbierten.^[196]

Langmuir-Blodgett-Monolagen einer Mischung von Dipalmitoylphosphatidylcholin und 10–30 Mol-% Cholesterin unterdrücken die Proteinadsorption aufgrund der dicht gepackten Phosphocholingruppen.^[197] Trotzdem wird die Langmuir-Blodgett-Ablagerung aufgrund der empfindlichen Geräte und Einschränkungen bezüglich der Substratgröße und -form nicht besonders häufig verwendet. Stattdessen können amphiphile Blockcopolymere auf hydrophoben Oberflächen physisorbiert werden, indem die Trägermaterialien in einer verdünnten wässrigen Blockcopolymerlösung (z.B. aus PEG-Polypropylenoxid, PEG-PPO) getaucht werden. Diese Copolymere konnten unter optimalen Bedingungen die unspezifische Proteinadsorption auf einer hydrophoben Oberfläche bis auf Werte von weniger als 3 ng cm⁻² verringern.^[198] In einer sehr aktuellen Studie wurden proteinresistente amphiphile Copolymere aus Poly(2-methacryloyloxyethyl-phosphorylcholin-*b*-*n*-butylmethacrylat) (polyMPC-BMA) durch Trimethoxysilylpropylmethacrylat-(TSMA)-Seitenketten vernetzt, um die Stabilität zu erhöhen. Diese vernetzte Beschichtung war in ethanolischen und wässrigen SDS-Lösungen stabil. Ohne Vernetzung würde das gesamte Polymer unter diesen Bedingungen leicht abgewaschen werden.^[199]

Weiterhin wurde beschrieben, dass Copolymere aus Poly(L-lysin)-Poly(ethyenglykol) (PLL-PEG) mit dem positiv geladenen PLL-Block auf anionisch geladenen Oberflächen anhaften und mit dem PEG-Block eine räumliche Barriere bilden.^[200] In späteren Studien wurden PLL-PEG- und PLL-Dextran-Kammpolymere mit einem PLL-Rückgrat und PEG- oder Dextranseitenketten entwickelt. Diese reduzieren die Proteinadsorption auf verschiedenen negativ geladenen Metalloxidoberflächen wie TiO₂, Si_{0.4}Ti_{0.6}O₂ und Nb₂O₅.^[196,201] Üblicherweise wurden langkettige *n*-Alkansäuremonolagen auf Metalloxidoberflächen untersucht.^[202]

Chemisorption (kovalente Anbindung)

Eine kovalente Bindung sorgt für eine viel stärkere Verbindung zwischen einer Polymerbeschichtung und einer Oberfläche als die Physisorption, sodass für viele Anwendungen eine kovalente Immobilisierung notwendig ist. Neben der Thiolbindung auf Gold- und Silberoberflächen gibt es viele andere Ankergruppen, die Monolagen ausbilden können. Silane werden im allgemeinen auf Siliciumoxid und anderen hydroxylierten Oberflächen verwendet,^[203] und Phosphatgruppen können Monolagen auf vielen Metalloxidoberflächen verankern.^[204] In den letzten Jahren wurde auch Brenzcatechin als geeignete Ankergruppe für Edelmetall- und Metalloxidoberflächen entdeckt.^[205] Diese Verankerungsgruppen wurden bereits häufig verwendet oder haben das Potenzial für eine Verwendung in proteinresistenten Beschichtungen. Zusätzlich sind entsprechend der Oberflächenfunktionalisierung verschiedene spezifische Kupplungsreaktionen verfügbar.

Neben der Vielfalt der Ankergruppen gibt es auch verschiedene Kettenarchitekturen, die durch Chemisorption als Monolagenbeschichtungen verwendet werden können.

Einige wichtige Beispiele sind hochverzweigte und dendritische Polymere, die eine stark verzweigte 3D-Architektur aufweisen.^[206] Diese Strukturen können bei gleichem Molekulargewicht größere Oberflächenbereiche bedecken als lineare Moleküle. Da eine dendritische Struktur auf der Oberfläche viele freiliegende funktionelle Gruppen präsentiert, ist sie ein hervorragender Ausgangspunkt für weitere mehrfache Funktionalisierungen.^[34] Der Vorteil der multivalenten Anbindung und der baumartigen Struktur kommt insbesondere bei rauen Oberflächen zum Tragen. Dendritisches Polyethylenimin (PEI),^[207] aliphatische Polyesterdendronen^[208] und Carbazoldendronen^[209] haben sich als gute Oberflächenabschirmungen erwiesen. Darum wurden chemisch aktive Schichten durch OEGlyierung oder PEGlyierung der vielen Amin- oder Hydroxygruppen auf der Oberfläche in ihre inerten Formen überführt. Solche PEGylierten dendritischen Monolagen können die Proteinresistenz deutlich verbessern.

Oligo-/Polyglycerol- (OG/PG) und PEG-Dendronen können direkt zur Herstellung bioinerter Beschichtungen verwendet werden, ohne dass weitere Oberflächenpassivierungsschritte notwendig sind. Hochverzweigte PG-Monolagenbeschichtungen zeigen aufgrund der aliphatischen Polyetherketten, hydrophilen Oberflächengruppen und ihrer hochverzweigten Struktur^[50,210] interessante strukturelle Eigenschaften und eine ähnliche oder sogar bessere Proteinresistenz als PEG-Monolagen. Zusätzlich hat PG eine höhere thermische und oxidative Stabilität als PEG.^[50] Die Monolagen von PEG-Dendronen der zweiten Generation auf TiO₂-Oberflächen sind ähnlich proteinresistent wie das lineare PEG-Analog mit dem gleichen Molekulargewicht.^[211] Eine Analyse der Hydratationseigenschaften legt nahe, dass die dendritischen Monolagen relativ steif sind und eine geringe Hydrations- und Dissipationskapazität haben. Monolagen aus linearen Polymeren sind dagegen viskoelastische, stark dissipierende und stark hydratisierte Beschichtungen.^[211] Insgesamt werden hochverzweigte und dendritische Monolagen mit ihrer begrenzten und multifunktionellen Architektur als sehr attraktiv für die biotechnologische Behandlung von Oberflächen angesehen.

Im Gegensatz zu Metall- und Halbleiteroberflächen besitzen nur wenige gebräuchliche Polymeroberflächen aktive funktionelle Gruppen für chemische Kupplungen. Darum sind chemische Vorbehandlungs- oder Bestrahlungsmethoden notwendig, um die Oberflächen zu aktivieren. Übliche Aktivierungsmethoden wie z.B. durch chemische Reagenzien, Ozonoxidation, Plasmabehandlung, Elektronen- und UV-Bestrahlung wurden in einem kürzlich erschienenen Artikel^[212] gut beschrieben und sollen hier nicht wiederholt werden. Wir werden nur einige wenige, wirkungsvolle Methoden erläutern.

Poröse Polyetherimid-Membranen können durch chemische Reaktionen leicht funktionalisiert werden, weil die Imidwiederholungseinheit mit Stickstoffnukleophilen reagiert, wodurch sich zwischen dem Polymer und der zu kuppelnden Verbindung Amidbindungen bilden. Dadurch kann die Funktionalisierung erfolgen, ohne die Polymerkette zu zerstören. Die Membranoberflächen wurden durch die Anbindung von PEGs,^[213] linearen Polyglycerolen,^[51] Heparin,

Polyethylenimin^[214] oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan funktionalisiert.^[215] PEG und lineare Polyglycerole konnten die Proteinadsorption nicht komplett verhindern, und hatten interessanterweise nur einen geringen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung. Genauere Analysen legen nahe, dass eine Struktur-Funktions-Beziehung, die z. B. für PEG auf idealen flachen Systemen etabliert wurde, nicht einfach auf die rauere Oberfläche einer Polymermembran übertragen werden kann. Flache anorganische Oberflächen sind daher nicht die perfekten Modelle für praktische Anwendungen.^[213]

Polydimethylsiloxan (PDMS) und Polytetrafluorethylen (PTFE) sind zwei wichtige Materialien, die üblicherweise chemisch inert sind. Semetey et al. haben eine Hydrosilylierungs-Klickreaktion beschrieben, die in einem einzigen Reaktionsschritt in Wasser die Vinylgruppen modifizierter Cellulose und die freien Hydrosilangruppen auf der Oberfläche kommerzieller Siliconelastomere konjugiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Strategie in Oberflächen mit sehr hoher Proteinresistenz resultiert.^[216] Ein anderer aktueller Bericht beschreibt die oberflächeninitiierte Polymerisation von Polysulfobetainmethacrylat (polySBMA) auf PTFE nach einer Plasmabehandlung, wodurch die Hydratationskapazität und Proteinresistenz von PTFE verbessert wurde.^[217]

Obwohl kovalent angebundene Beschichtungen erfolgreich für viele Materialoberflächen, einschließlich PTFE, eingeführt wurden, können die meisten von ihnen die Proteinresistenz nicht so effektiv verringern, wie selbstorganisierte Monolagen auf Gold dies aufgrund ihrer geringen Oberflächenaktivität und hohen Pfordichte können. Als eine Alternative wird der „Grafting-from“-Ansatz beschrieben, der den theoretischen Vorteil hat, dass dicke und dichtere Monolagenbeschichtungen erzeugt werden können.^[205] Mit dieser Methode wurde z. B. eine sehr dichte kammartige Polymerbürstenbeschichtung entwickelt. Der Photoinitiator Benzophenon (BP) wurde zur Aktivierung sowohl organischer (Polyethersulfon und Polycarbonatethan) als auch anorganischer Oberflächen (Keramik) verwendet.^[218,219] Die angeregten BP-Einheiten abstrahieren Wasserstoffatome von der Polymer- oder Keramikoberfläche. Dann wird die Polymerisation der Monomere, die aus kurzen bioinerten Seitenketten bestehen, von den Radikalen an der Oberfläche initiiert. Weil die Grundfläche der „Bürste“ deutlich größer ist als die des Initiators,^[220] kann eine sehr hohe Oberflächenpackungsdichte erreicht werden. Kammartige Polymerbürsten aus Poly(hydroxyethyl)methacrylat (polyHEMA) und Poly[oligo(ethylenglycol)methylmethacrylat] (polyOEGMA) haben die Proteinadsorption auf Oberflächen deutlich verringert.^[218]

Polymerbürsten-Oberflächenbeschichtungen mit sehr gut kontrollierter Dicke wurden durch die Verwendung der In-situ-Atomtransferradikalpolymerisation (ATRP) erzeugt. Die ATRP-Initiatoren mit Ankereinheiten wurden auf verschiedenen Trägermaterialien immobilisiert.^[221,222] Eine Polymerbürstenschicht aus polyOEGMA konnte die Menge unspezifisch adsorbierten Proteins auf unter 1 ng cm^{-2} verringern.^[220] Auch eine dendritische Polymerbürste mit PG-

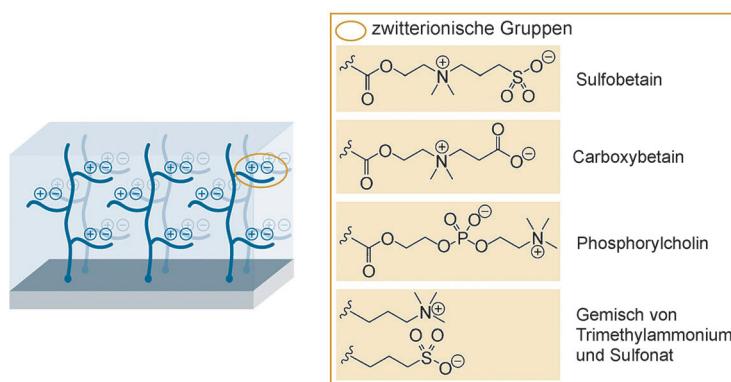


Abbildung 7. Molekülstrukturen von Sulfobetain-, Carboxybetain- und Phosphorylcholingruppen sowie einer Mischung aus Trimethylammonium- und Sulfonatgruppen (Pseudobetaine).

Dendron-Seitenketten konnte die Proteinadsorption aus menschlichem Blutplasma wirksam reduzieren.^[223]

Zwitterionische Moleküle kombinieren die starke Wechselwirkung mit Wasser und die Regel des Nichtvorhandenseins einer Nettoladung perfekt und sind damit auch exzellente Kandidaten für proteinresistente Materialien (Abbildung 7).^[35,224] In den vergangenen Jahren wurden mehrere zwitterionische Polymerbürsten über die „Grafting-from“-Methode hergestellt, einschließlich Polysulfobetain,^[225] Polycarboxybetain,^[226] Polyphosphobetain^[227] und gemischt geladene Polymere.^[228] Die komplizierte Synthese der Phosphobetain-Monomere, z. B. 2-Methacryloyloxyethylphosphorylcholin (MPC), schränkte die Verwendung der Polyphosphobetaine ein.^[35] Poly(sulfobetainmethacrylat) (polySBMA) und Poly(carboxybetainmethacrylat) (polyCBMA) waren die am häufigsten verwendeten Polysulfobetaine bzw. Polycarboxybetaine. PolyCBMA-Beschichtungen haben im Vergleich zu den polySBMA-Beschichtungen eine bessere Proteinadsorptionsresistenz, weil der Abstand zwischen den geladenen Gruppen in CBMA kürzer ist als in SBMA. Dieser kürzere Abstand führt zur einer stärkeren Hydratationsschicht auf der Oberfläche. Zusätzlich adsorbieren sowohl polyCBMA- als auch polySBMA-Beschichtungen weniger Proteine als polyOEGMA, was ein Hinweis darauf ist, dass zwitterionische Polymere eine brauchbare Alternative zu PEG-Materialien sind.^[226] Gemischt geladene Polymerbeschichtungen, in denen die positiv und negativ geladenen Einheiten von zwei verschiedenen Monomeren stammen, sind auf einem ähnlich guten Niveau proteinresistent wie die oben genannten Polymere.^[228] Zwitterionische Polymere werden aufgrund ihrer guten Proteinresistenz-zeigenschaften und ihrer hohen Stabilität auch als neuer Maßstab für proteinresistente Materialien sowie als Plattformen für biospezifische Oberflächen^[229] anstelle von PEG angesehen. Sie sind jedoch empfindlich gegenüber extremen pH-Werten und der Ionenstärke, was ihre Effizienz unter solchen Bedingungen einschränken kann.

Die Stabilität von Monolagenbeschichtungen ist ein wesentlicher Faktor für praktische Anwendungen, da die Wechselwirkung zwischen einigen der Ankergruppen und den Trägermaterialien ist jedoch relativ schwach. Um dieses Problem zu lösen, wurden Monolagenbeschichtungen mit

mehrfachen Ankergruppen (Multivalenzeffekt) entwickelt. Die relativ geringe Stabilität von thiolgebundenen Monolagen wird durch die begrenzte Stärke der Metall-Schwefel-Bindung und durch die Anfälligkeit einiger einfacher Thiolatsysteme für Zerfallsreaktionen weiter eingeschränkt.^[190] Thioctansäure ist ein Linkermolekül, das an einem 1,2-Dithiolanring eine Carboxylgruppe trägt und Alkanthiolate ersetzen kann, um stabilere Beschichtungen zu erzeugen.^[230] Die andere attraktive Alternative ist die Verwendung des Polymers Polypropylensulfid (PPS), das aus Sulfid-Wiederholungseinheiten besteht. Mehrwertige Ankergruppen werden im allgemeinen für stabiler gehalten.^[231] Die vielen Sulfidgruppen chemisorbieren stark auf Gold und zeigen eine bessere Stabilität gegenüber Oxidationsreaktionen als Alkanthiolate. Blockcopolymere aus Poly(propylensulfid-*block*-ethylenglykol) (PPS-PEG) können Goldoberflächen gegen Proteinadsorption passivieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Beschichtungen unter Umgebungsbedingungen für mindestens 41 Tage gegen Schwefeloxidation unempfindlich sind.^[232] Ein anderes Beispiel ist Brenzcatechin auf einer TiO₂-Oberfläche. Brenzcatechin bildet mit Metalloxidooberflächen einen Charge-Transfer-Komplex.^[233] Für eine praktisch irreversible Bindung und den Zusammenhalt der gebildeten Monolage sind drei Brenzcatechin-Einheiten in der Ankergruppe notwendig. Die Beschichtungen aus linearen Oligo-Brenzcatechin-Ankern mit dendritischen PEG-Ketten waren für mindestens 12 Tage in physiologischem Puffer stabil.^[211] Dendritisches Polyethylenimin kann stabil auf einer selbstorganisierten Monolage immobilisiert werden, die Carbonsäureanhydridgruppen repräsentiert.^[207] Zusätzlich kann dieses dendritische Polymer aufgrund seiner flexiblen hochverzweigten Struktur die Defekte einer selbstorganisierten Monolage mit geringer Pfordichte kompensieren. Wenn sie mit kurzen PEG-Gruppen ausgestattet werden, sind die Polyethyleniminoberflächen sehr proteinresistent.

Monolagenarchitekturen zeichnen sich durch eine hohe Effektivität und Einfachheit aus. Dichte Beschichtungen wurden jedoch aufgrund von sterischen Effekten und Beschichtungsdefekten bisher nur für einige wenige Trägermaterialien erreicht. Zusätzlich sind extreme Reaktionsbedingungen notwendig, um eine starke kovalente Oberflächenbindung zu erhalten, die aber die mechanischen Eigenschaften des Trägermaterials beeinträchtigen können. Die Langzeitstabilität solcher Monolagen auf chemisch inerten Oberflächen bleibt weiterhin eine Herausforderung.

Multilagenbeschichtungen

Oberflächengelierung^[234] und Rotationsbeschichtung^[235] werden üblicherweise für die Erzeugung dicker

und dichter Schichten auf Substraten verwendet, aber die Schichtdicke ist dabei nicht immer kontrollierbar. Einige Multilagen-Technologien bieten jedoch ein hohes Maß an Kontrolle über die Dicke der Beschichtung (Abbildung 8). Beschichtungen aus mehrfachen Lagen können die Defekte jeder einzelnen Schicht abschirmen, sodass eine hohe Oberflächenbedeckung erhalten wird. Noch wichtiger sind während der Bildung der Multilagenbeschichtungen die Wechselwirkungen innerhalb der Schicht, die durch hydrophobe Kräfte, Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, kovalente Vernetzung usw. verstärkt werden können. Diese Wechselwirkungen erhöhen die Stabilität der Beschichtungen, sodass sie sogar über eine schwache Verankerung auf den Oberflächen immobilisiert werden können. Mit anderen Worten: Viele Mehrlagenbeschichtungen können auf inerten Oberflächen unter milden Bedingungen erzeugt werden.

Die schichtweise Anordnung von Polyelektronlyten durch die aufeinanderfolgende Adsorption von Polyanionen und Polykationen aus einer Lösung, das sogenannte Substratschichtungs- oder Layer-by-Layer-Verfahren, ist eine allgemein verwendete Methode für die Herstellung von Mehrkomponentenfilmen auf einer großen Auswahl von Oberflächen.^[236] Die klassischen Polyelektronlytmultilagen sind jedoch nicht in der Lage, Proteinadsorption zu verhindern, da sie immer eine Nettoladung auf ihrer Oberfläche aufweisen, was im Konflikt zur Whitesides-Regel des Nichtvorhandenseins jeglicher Nettoladung steht.

Um dieses Problem zu überwinden, haben Textor et al. geladene LbL-Beschichtungen mit Poly(L-lysin)-Poly(ethylenglykol) (PLL-PEG) kombiniert, um die Ladung abzuschirmen. Wie schon erwähnt kann der positiv geladene PLL-Block von PLL-PEG mit negativ geladenen Schichten wechselwirken, wobei der PEG-Block auf der Oberfläche

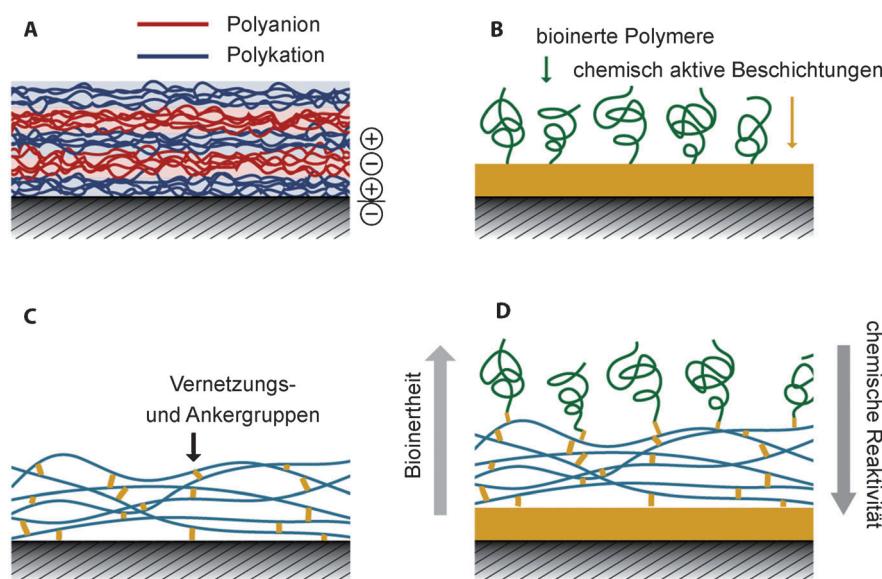


Abbildung 8. A) Eine Beschichtung, die durch schichtweise Substratabscheidung (LBL) aufgebaut wurde. B) Eine bioinerte Beschichtung, die an eine chemisch aktive Schicht gebunden ist. C) Eine chemisch homogene Mehrlagenbeschichtung. D) Eine hierarchisch aufgebaute Polymer-Mehrlagenbeschichtung, in der von oben nach unten die chemische Aktivität graduell ab- und die bioinerten Eigenschaften graduell zunehmen.

nach außen weist. Oberflächen aus Siliciumoxid, Melamin-formaldehyd (MF) und Polylactid (PLA) wurden so erfolgreich mit alternierenden Mehrlagenschichten aus Polyallylaminhydrochlorid (PAH, polykationisch) und Polystyrolsulfonat (PSS, polyanionisch) beschichtet. Nach dem Abschluss mit einer Monolage aus PLL-PEG zeigten die Beschichtungen eine gute Resistenz gegen die Adsorption von Proteinen.^[237] Hammond et al. haben proteinresistente LbL-Mehr-lagenschichten durch Anpassung der Hydrophobie der Polymeren zur Neutralisierung der Oberflächennettoladung erzeugt. Kationische N-alkylierte Polyethylenimine mit kontrollierten Alkylkettenlängen wurden mit anionischen Polyacrylsäure-Polymeren (PAA) auf einer Siliciumoberfläche angeordnet. Die hydrophoben Alkylketten verhindern die klassische elektrostatische Anordnung der hydrophilen PAAs. Die adsorbierte Menge an PAA kann kontrolliert werden als eine gerade ausreichende Menge, um so die Oberflächenladung zu neutralisieren, statt sie umzukehren. In diesem Fall wurde die Proteinadsorption aufgrund der hydrophilen PAA-Oberschicht und der Null-Nettoladung auf der Oberfläche minimiert.^[238] Durch die LbL-Anordnung kann die Dicke der Beschichtungen gut gesteuert werden, und extreme Reaktionsbedingungen lassen sich vermeiden. Es sind jedoch mehrfache Beschichtungsschritte in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten notwendig, um die Defekte der einzelnen Schichten auszugleichen. Obwohl viele LbL-Beschichtungen auf verschiedenen Oberflächen appliziert werden können, mangelt es bei ungeladenen Oberflächen immer noch an Stabilität.

In den letzten Jahren wurden mehrere materialunabhängige Beschichtungsmethoden entwickelt, die nur einen oder wenige Arbeitsschritte erfordern. Diese Beschichtungen wurden chemisch oder physikalisch vernetzt, um ihre Stabilität zu erhöhen. Andererseits bieten sie eine Menge funktioneller Gruppen für die weitere Modifizierung. Somit könnten solche chemisch aktiven Beschichtungen mit bioinerten Beschichtungen kombiniert werden, um die Proteinresistenz einer großen Auswahl von Materialoberflächen zu verbessern.

Das Monomer [2.2]Paracyclophan-4-methyl-2-bromisobutyrat, das ATRP-Initiierungseinheiten enthält, wurde durch chemische Gasphasenabscheidung und Polymerisation auf verschiedene Oberflächen aufgebracht. PolyOEGMAs wurden dann direkt auf diese Beschichtungen polymerisiert, um sie proteinresistent zu machen.^[239] Eine andere Methode verwendete die Radiofrequenz-Magnetronkathodensteräubung von Nylon-6,6 zur Abscheidung auf Oberflächen. Bioinerte Polymerbürsten wurden dann an ATRP-Initiatoren polymerisiert, die an die Aminogruppen der Oberfläche gebunden waren.^[240] Des Weiteren wurden hydrophobe Oberflächen mit Proteinschichten modifiziert. Denaturiertes menschliches Serumalbumin wurde auf der Oberfläche adsorbiert und mit Glutaraldehyd vernetzt, um die Stabilität der Schicht zu erhöhen. Dann wurde eine ähnliche Nachbehandlung mithilfe der ATRP durchgeführt.^[241] Diese interessanten Methoden erweitern die Möglichkeiten, chemisch inerte Oberflächen, einschließlich Teflon, zu modifizieren. Allerdings waren die Beschichtungen mit [2.2]Paracyclophan-4-methyl-2-bromisobutyrat und Nylon-6,6 nur durch

hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, und die vernetzten Proteinbeschichtungen sind in physiologischer Umgebung vermutlich abbaubar. Somit könnte die Langzeitstabilität dieser Beschichtungen in biomedizinischen Anwendungen ein Problem werden. Die am häufigsten verwendete materialunabhängige Beschichtung ist das von Muscheln inspirierte Polydopamin, das auf praktisch allen Oberflächen haftet und nur ein einfaches Eintauchen unter milden Bedingungen erfordert.^[242,243] Viele Arten von bioinerten Polymeren wurden mittels Michael-Addition oder Schiff-Base-Reaktionen auf Polydopamin-Beschichtungen als proteinresistente Sekundärschichten aufgebracht.^[234,244-246]

Sternförmige bioinerte Polymere wie z.B. die Mischung aus epoxy- und aminofunktionalisierten Stern-PEGs, können auf Trägermaterialien als chemisch homogene Mehrlagenbeschichtungen mit einem hohen Vernetzungsgrad stabilisiert werden. Um die Stabilität zu erhöhen, können bioinerte Polymere mit den gleichen Anker- und Vernetzungsgruppen spontan bindende homogene Mehrlagenbeschichtungen in nur einem Schritt bilden.^[247] Brenzcatechine, die sowohl als Anker- als auch Vernetzungsgruppe fungieren können, wurden an die funktionalisierten Seitenketten von PEG^[248] oder die verzweigten Ketten von dendritischem Polyglycerol (dPG)^[249] gebunden, um eine mehrfache Verankerung und Vernetzung zu erreichen. Wenn nicht genügend Brenzcatechinheiten vorhanden waren, war die Verankerung des Polymers nicht effektiv, während zuviele Einheiten zur Adsorption von Proteinen führten. Eine gut ausbalancierte Menge an Brenzcatechin führte zu Beschichtungen mit einer sowohl hohen Stabilität als auch einer sehr guten Proteinresistenz.^[249]

Diese chemisch homogenen Beschichtungen präsentieren jedoch einige freie Vernetzungseinheiten auf der Oberfläche, die bei längerem Kontakt mit Proteinen deren Adsorption verursachen können. Die oben besprochenen materialunabhängigen Polydopamin-analogen Beschichtungen wechselwirken aufgrund ihrer hohen chemischen Aktivität stark mit Proteinen. Es ist schwer, die chemisch aktiven Stellen über die Immobilisierung bioinserter Monolagen komplett abzuschirmen. In einer aktuellen Studie konnten Wei et al. diese zwei Beschichtungsarten in einer hierarchischen Multilagenarchitektur kombinieren und so die Nachteile beider Materialien zu gleichen Teilen verringern (Abbildung 8D). Eine materialunabhängige Brenzcatechin- und Amin-reiche dPG-Beschichtung wurde als hochadhäsive Grundsicht verwendet. Darauf wurde eine bioinerte Mehrlagenschicht aus dPG mit einer geeigneten Brenzcatechinmenge appliziert, um die Aktivität der Grundsicht komplett abzuschirmen. Abschließend wurde aus Monobrenzcatechin-funktionalisiertem dPG eine flexible Monolage durch Anbindung an die freien Oberflächenbrenzcatechineinheiten der zweiten Schicht erzeugt, um alle aktiven Gruppen zu blockieren. In dieser hierarchisch aufgebauten Beschichtung sinkt die chemische Aktivität und es steigen die bioinerten Eigenschaften graduell von unten nach oben. Eine Struktur mit diesen Eigenschaften wurde zur Herstellung einer materialunabhängigen Beschichtung mit sehr guten Proteinresistenzeigenschaften und sehr hoher Langzeitstabilität verwendet.^[250]

Superamphiphobe und lubrifizierte selbstreinigende Beschichtungen

Die oben erwähnten hydrophilen Beschichtungen wechselwirken mit Wasser, wodurch die Proteinadsorption verhindert wird. In einem anderen Ansatz wurden durch Erniedrigung der Oberflächenenergie selbstreinigende Beschichtungen zur Verhinderung einer Kontaminierung entwickelt.^[251] Selbstreinigende Oberflächen wurden ausführlich untersucht, aber selten für biomedizinische Anwendungen in Betracht gezogen. Die Hauptprobleme betreffen die Biokompatibilität und Effektivität dieser Beschichtungen in physiologischer Umgebung. Trotzdem wurden vor einiger Zeit Studien veröffentlicht, die den Kontakt zwischen Blut und selbstreinigenden Oberflächen zum Thema haben. Die typischen superhydrophoben Oberflächen sind nicht in der Lage, Blutplasma abzustoßen, weil die hochkonzentrierten amphiphilen Proteine die Oberflächenspannung des Blutes stark erhöhen.^[252] Vollmer und Butt et al. haben eine superamphiphobe Beschichtung entwickelt, die aus einem fraktalartigen Netzwerk fluorierter Siliciumoxid-Nanosphären besteht (Abbildung 9 A–C). Zwischen den Nanosphären

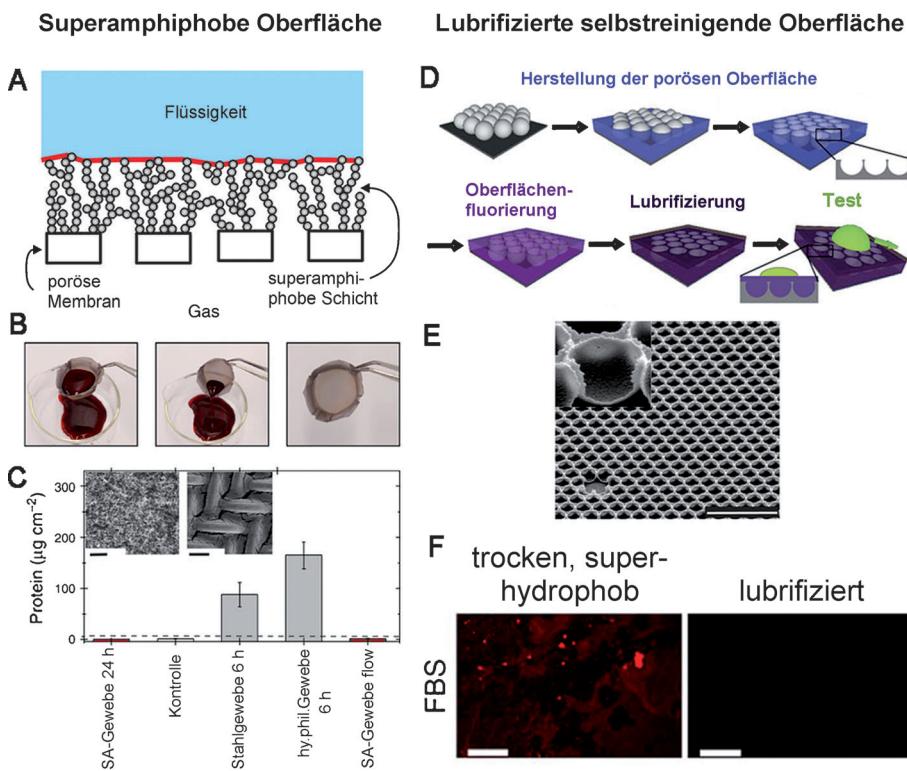
können Gase eingeschlossen werden, die Flüssigkeiten und damit auch Blut davon abhalten, mit der festen Oberfläche in Kontakt zu treten. Nach 48 h in menschlichem Vollblut konnten nur einige wenige Blutproteine auf der beschichteten Oberfläche nachgewiesen werden.^[252]

Die Geometrie von superhydrophoben oder superamphiphoben Oberflächen erzeugt eine Energiebarriere, die Flüssigkeiten davon abhält, in die Poren einzudringen. Wenn der Druck einen bestimmten kritischen Druck übersteigt, wird das Gleichgewicht zwischen den drei Phasen Gas, Flüssigkeit und Feststoff auf der Oberfläche zerstört.^[253] Dann verliert eine superamphiphobe Oberfläche ihre Effizienz bezüglich der Proteinabwehr. Vogel und Aizenberg et al. haben gleitfördernde, mit einem fluorierten Schmierstoff behandelte, poröse Beschichtungen als omniphobe Oberflächen entwickelt (Abbildung 9 D–F). Es wurden nanoporöse Oberflächenstrukturen erzeugt, die den fluorierten Schmierstoff auf der Oberfläche einschließen, wodurch eine fehlstellenfreie, selbstheilende flüssige Grenzschicht gebildet wird. Eine zweite Flüssigkeit mit gelösten Verunreinigungen konnte zuverlässig abgewehrt, wenn sie auf die Oberfläche gegeben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass unverdünntes fötales Rinderserum mit seinen Blutproteinen zwar die trockene Oberfläche beflecken kann, nicht aber die lubrifizierte Oberfläche. Zusätzlich waren die abwehrenden Eigenschaften dieser lubrifizierten Oberfläche unter hohem Druck stabil, und sie konnte starken Scherkräften und mechanischer Beschädigung widerstehen.^[254] Das Hauptproblem für eine biomedizinische Anwendung ist jedoch, dass die Freisetzung fluorierter Moleküle nicht ausgeschlossen werden kann.

Obwohl es noch ein langer Weg bis zu einer In-vivo-Anwendung in der Biomedizin ist, haben superamphiphobe und lubrifizierte selbstreinigende Beschichtungen eine neue Möglichkeit im Bereich der proteinresistenten und zellabweisenden Materialien eröffnet.

Leitlinien für die Entwicklung einer proteinresistenten Oberflächenbeschichtung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die meisten der oben genannten Beschichtungen sehr gute Proteinabwehreigenschaften haben, aber diese Systeme haben Vor- und Nachteile. Um eine proteinresistente Beschichtung für eine praktische Anwendung zu entwi-



ckeln, ist das Kosten-Nutzen-Verhältnis immer der erste und wichtigste Faktor. Deshalb sind kommerziell erhältliche Materialien und praktikable Beschichtungsmethoden notwendig. Obwohl die OEG/PEGylierung nicht die besten Methoden sind, so sind sie die derzeit noch am häufigsten verwendeten. Um gute Leistungen zu erreichen, können Polyglycerole oder zwitterionische Polymere als Alternativen in Betracht gezogen werden (vgl. das Frontispiece). Eine SAM kann einfach auf chemisch aktiven Trägermaterialien wie z.B. Gold als Monoschicht aufgebracht werden. Chemisch inerte Polymermaterialien sollten durch Bestrahlung oder eine aktive Grundbeschichtung aktiviert werden. Hierarchische Multilagenstrukturen können die Proteinresistenz von Beschichtungen erhöhen. Um die Stabilität zu erhöhen, sollten eine mehrfache Oberflächenbindung und die Vernetzung der inneren Schichten in Erwägung gezogen werden. Superamphiphobe und lubrifizierte selbstreinigende Beschichtungen wurden vor kurzem auch für In-vitro-Hilfsmittel verwendet werden, um die Blutplasmaadsorption zu verhindern, und kommen in weiterentwickelter Form auch für die Verwendung im lebenden Organismus in Frage. Insgesamt ist es notwendig, sowohl die 3D-Architektur als auch die chemische Struktur zu betrachten, um eine gänzlich proteinresistente Oberflächenbeschichtung zu entwickeln.

Weiterhin ist es wichtig zu bedenken, dass trotz der hervorragenden Leistungen dieser Beschichtungen im Labor nur einige wenige von ihnen in den anwendungsnahen Medien wie Blutplasma und -serum eine gute Performance haben. Die dem Fouling durch hoch komplexe proteinöse Spezies zugrundeliegenden Prinzipien sind nach wie vor nicht ausreichend untersucht. Huck und Mitarbeiter haben 98 Plasmaproteine identifiziert, die sich an derzeit verwendeten „proteinresistenten“ Beschichtungen ablagern.^[255] Es wurde gezeigt, dass die bioinerten Beschichtungen zwar die Menge der adsorbierten Proteine, aber nicht die Zusammensetzung der adsorbierten Schicht ändern können. Als der Hauptbestandteil der adsorbierten Schicht wurden in geringer Dichte abgelagerte Lipoprotein-Partikel (LDL) identifiziert, die aus Phospholipiden, Triglyceriden, Cholesterylester und Apolipoprotein B100 (apoB100) bestehen. Diese Entdeckung wird das Wissen um die Prinzipien der Wechselwirkungen zwischen komplexen Protein- und Polymer-beschichteten Oberflächen zu vertiefen und zur Entwicklung neuer proteinresistenter Beschichtungen führen.

3.2. Anwendungen in der Biomedizin

Neben der Verbesserung der In-vivo-Biokompatibilität implantierter Geräte sind proteinresistente Beschichtungen auch in vielen anderen biomedizinischen Anwendungen, wie z.B. in der Diagnostik, bei Blutkontaktmaterialien, Verpackungen und Biopharmazeutika, von großer Bedeutung. Einige der aktuellen Entwicklungen in diesen Bereichen sollen im folgenden Abschnitt besprochen werden.

In-vitro-Diagnostik

Beschichtungen für Festphasen-Immunoassays müssen hauptsächlich zwei Kriterien erfüllen. Sie müssen die unspezifische Adsorption aus Proteinlösungen oder komplexen Medien wie Blutplasma reduzieren und gleichzeitig die Immobilisierung eines Protein- oder Peptidliganden ermöglichen. Die einfachste Möglichkeit zur Immobilisierung von Proteinen wird für Mikrotiterplattenassays verwendet und beruht auf der Physisorption durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Polystyrol(PS)-Trägermaterial. Um die unspezifische Adsorption zu berücksichtigen, werden die verbliebenen Bindungsstellen nachträglich mit Detergentien oder Proteinen geblockt. Im Fall von Proteinmicroarrays ist die Physisorption auf Nitrocellulose-behandelten Glasoberflächen die am häufigsten verwendete Methode, da die poröse Struktur sowohl eine hohe Ligandendichte als auch eine Stabilisierung des Liganden ermöglicht.^[256] Genau wie bei den Mikrotiterplattenassays werden die verbleibenden Bindungsstellen mithilfe geeigneter Blockierungspuffer besetzt. Die Einfachheit dieser Methoden kann jedoch verschiedene Nachteile, wie eine erhöhte unspezifische Adsorption oder die Denaturierung der immobilisierten Liganden mit sich bringen.^[257,258] Während ersteres zu einem größeren Hintergrundrauschen führt, verringert der zweite Effekt die Signalintensität. Zusätzlich ist die mangelnde Regenerationsfähigkeit der ligandenbeschichteten Oberfläche nach jedem Messzyklus ein Problem, wenn Bindungs- oder Geschwindigkeitskonstanten über zeitaufgelöste Nachweismethoden wie SPR oder QCM bestimmt werden sollen. Eine proteinabweisende Polymermatrix mit passenden reaktiven Gruppen für die Ligandenimmobilisierung sollte alle der soeben genannten Probleme verbessern.

Glas, das ein häufig verwendetes Trägermaterial für Proteinmicroarrays ist, und Oxidoberflächen, wie sie in der Lichtleiterspektroskopie (OWLS) und in Siliciummikroring-resonatoren verwendet werden, besitzen die gleichen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche, nämlich Silanolgruppen.^[259] Daher können diese Oberflächen mithilfe von Silanchemie funktionalisiert werden. Der einfachste Weg zur Modifizierung von SiO₂-Oberflächen ist die Verwendung difunktioneller Standard-Silankupplungsreagentien wie 3-Aminopropyltriethoxsilan (APTS), 3-Isocyanatpropyltriethoxsilan (ICPTES) oder (3-Glycidyloxypropyl)triethoxsilan (GOPTES). Sie können für die direkte Modifizierung mit einem spezifischen Biomolekül oder als Haftvermittler für die weitere Funktionalisierung mit einer inertnen Matrix verwendet werden. Abgesehen vom Fehlen einer inertnen Matrix sind viele der primären Amine des gebundenen APTS aufgrund sterischer Hinderung nicht zugänglich. Pathak et al. haben versucht, dieses Problem durch Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol zu lösen, das als Haftvermittler auf Glas- und Siliciumoxidoberflächen für die nachfolgende Modifizierung mit Polypropylenimin(PPI)-Dendrimeren der 1. bis 5. Generation diente.^[260] Die Autoren konnten zeigen, dass die Zugänglichkeit der Amine mit höherer Generation deutlich steigt. Um das Problem der unspezifischen Adsorption zu behandeln, haben Hucknall et al. bis zu 100 nm dicke Poly(oligo(ethylenglykyl)methacrylat)-

Bürsten mittels ATRP auf Glasoberflächen erzeugt und diese dann für Proteinmicroarrays mit Fluoreszenzauslesung genutzt.^[221] Die Autoren haben durch Vergleich dieser Beschichtungen mit kommerziell erhältlichen Nitrocellulosemembranen gezeigt, dass die Verringerung des Hintergrundrauschens eine hundertfach niedrigere Nachweisgrenze (LOD) zur Folge hatte. Wenn diese auf Goldoberflächen aufgebracht wurden, verringerte sich die unspezifische Adsorption von unverdünntem Rinderserum soweit, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze eines kommerziellen SPR-Instrumentes lag. Zusätzlich konnten die Autoren zeigen, dass die Ligandenimmobilisierung ohne Ausbildung einer kovalenten Bindung möglich war, lediglich durch physikalische Verknüpfung innerhalb der oberflächengebundenen Polymerketten erfolgte. Eine vielversprechende Alternative zu hydrolytisch instabilen Siloxanbindungen ist die photochemische Anbindung von endständigen Alkenen an Silicium- und Siliciumoxidoberflächen.^[261, 262] Diese Methode kann sowohl für Kohlenstoffmaterialien als auch andere Halbleiteroberflächen wie Germanium, Gallium und Nitrid verwendet werden.

Dreidimensionale Polymerschichten, die durch Grafting-from-Methoden erzeugt wurden, sind auch für Biosensoren auf Grundlage der Theorie des abklingenden Feldes von besonderem Interesse, da ihre Höhe leicht an die Abklinglänge des Feldes angepasst werden kann. Trotzdem muss die Beschichtungsdichte niedrig genug gehalten werden, um das Durchdringen mit Ligand- bzw. Analytmolekülen zu erlauben. In zeitaufgelösten Methoden wie der SPR oder QCM wird die unspezifische Adsorption normalerweise durch einen Referenzkanal kompensiert, der mit der gleichen Analytlösung in Kontakt steht und dessen Signal vom Messsignal abgezogen wird. Die Genauigkeit dieser Daten ist jedoch bedeutend höher, wenn die unspezifische Bindung auf ein Minimum begrenzt werden kann.^[36] Bei kommerziellen SPR-Chips wird dies normalerweise mit einer Beschichtung aus Carboxymethyldextran, einem halbsynthetischen Polysaccharid, erreicht, dessen Carbonsäuregruppen für die Ligandenimmobilisierung genutzt werden können. Leider berücksichtigen die Referenzkompensation und die proteinresistente Beschichtung nicht die unspezifische Adsorption, die durch den Liganden selbst verursacht wird. Eine alternative Referenzierungsmethode wurde von Springer et al. vorgeschlagen.^[263] Statt der Verwendung eines Referenzkanals, der mit einer unmodifizierten Matrix beschichtet wurde, wurde der Nachweiskanal mit dem immobilisierten Ligand mit einem Analyten untersucht, dessen Bindungsstellen mit demselben Ligand blockiert waren.

Eine substratunabhängige Methode für die Erzeugung funktionaler Oberflächen wurde von Rodriguez-Emmenegger et al. vorgestellt.^[240] Die Autoren zeigten, dass Nylon-6,6 als substratunabhängiger Adhäsionsschicht für die nachfolgende Anbindung von Oligoethylenglykolmethacrylaten und Carboxybatainacrylamiden über ATRP verwendet werden kann.

Bioinerte Beschichtungen haben sich in der Molekulardiagnostik zur Verbesserung der Signal-Rausch-Verhältnisse von Biosensoren großteils durchgesetzt, um die niedrigeren Nachweisgrenzen von Analyten messen zu können, die direkt

vom Patienten erhalten werden. Zum Beispiel konnten die Fälle von Gebärmutterhalskrebs, der die zweithäufigste Krebsart bei Frauen ist, durch die Früherkennung mithilfe von Screeningprogrammen deutlich verringert werden. Es ist mittlerweile fest etabliert, dass eine Infektion mit den gefährlichen Papillomavirus(HPV)-Typen der Hauptgrund für fast alle Gebärmutterhalskrebskrankungen ist. Der „PapilloCheck“^[264] beruht z.B. auf einer biospezifischen Polymeroberflächenbeschichtung (Abbildung 10). Dieser Micro-

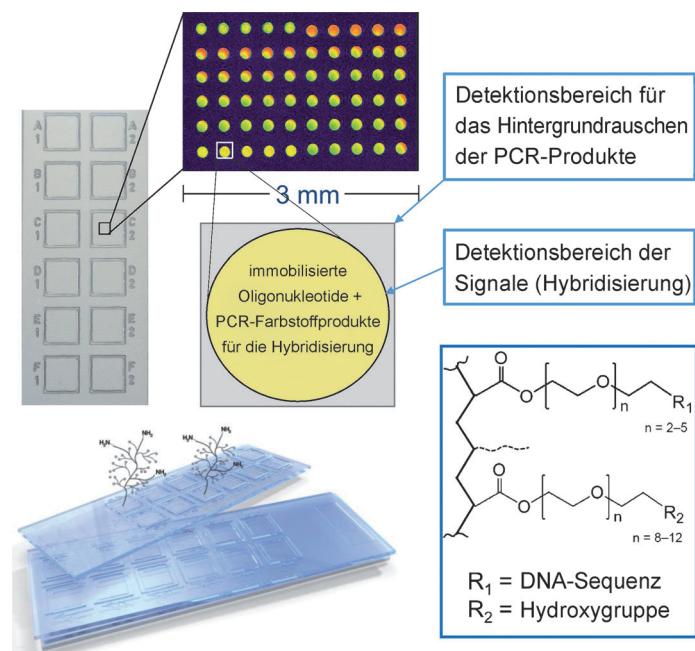


Abbildung 10. Der PapilloCheck für die frühzeitige Erkennung des gefährlichen Papillomavirus beruht auf einem DNA-Mikroarray-basierten Hybridisierungsassay. Die biospezifischen (R_1 = Amino-PEG-gebundene Oligonukleotide) und bioinerte Gruppen (R_2 = Hydroxy-PEG) auf der Polymerbürste können so kontrolliert werden, dass ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wird. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung der PolyAn GmbH, Berlin.^[264]

array-basierte DNA-Hybridisierungsassay kann PCR-amplifizierte Virusfragmente aus der Körperflüssigkeit von Patienten zuverlässig detektieren. In Abhängigkeit von der Seitenkettenfunktionalität kann durch die Mischung einer bioinerten und einer biospezifischen Polymerkomponente das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich verbessert werden.

Oberflächen im Kontakt mit Körperflüssigkeiten (Dialyse, Blutbehalter usw.)

Obwohl die ideale bioinerte Oberfläche noch gefunden werden muss, haben sich abhängig von der Anwendungsart verschiedene Polymere zu Standards entwickelt, die Oberflächen mit einer niedrigeren Proteinadsorption bieten. Einige wichtige Polymere für biomedizinische Anwendungen sind Polyethersulfone (PES; in der Dialyse), Polyvinylchloride (PVCs) als weichmacherhaltige PVCs (PVC-P, z.B. für Blutbeutel und Schlauchmaterialien) und Silicone (Shunts,

Schlauchmaterialien, Katheter, Implantate). Da alle diese Anwendungen auch in Zukunft von großer Bedeutung sind, müssen die Nachteile der derzeit verwendeten Systeme durch weitere Forschung adressiert werden. In der Dialyse werden Polymermembranen zu Entfernung von Toxinen aus dem Blut verwendet, z.B. bei Patienten mit Nierenversagen. Die Kapazität des Dialysators ist stark an die Proteinadsorption auf der Membran gekoppelt, während die möglichen thrombogenen oder Komplementaktivierungseigenschaften (siehe auch Abschnitt 2.4) einen großen Einfluss auf die Gesundheit der Patienten haben. Obwohl die Dialyse in der Klinik routinemäßig verwendet wird, ist die gleichzeitig notwendige Behandlung mit gerinnungshemmenden Medikamenten ein grundlegendes Problem. Ein interessanter Lösungsansatz ist die Adsorption von gerinnungshemmender Zitronensäure auf Polyurethanen und die Vermischung dieses funktionalisierten Polymers mit PES. Dadurch wurde eine deutlich geringere Proteinadsorption und Thrombozytenaktivierung erreicht.^[265] Die Oberflächenmodifizierung von PES, z.B. mit Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol oder Chitosan, ist ein anderer möglicher Ansatz zur Verringerung der Proteinadsorption und Verbesserung der Langzeitmembranleistung.^[266] Zusammengefasst haben bioinerte Oberflächen von Dialysatoren das Potenzial, die Parallelbehandlung mit gerinnungshemmenden Medikamenten zu verringern, das Wohlbefinden der Patienten zu verbessern und die Dialysatortrennleistung bei klinischen Anwendungen zu erhöhen.

Für biomedizinische Anwendung ist PVC trotz vieler Probleme immer noch das am häufigsten benutzte Material. Einer der Hauptkritikpunkte ist die Verwendung von bis zu 50% Weichmacher in biegsamen PVC-Materialien,^[267] ohne die die oben genannten Anwendungen nicht möglich wären. Des Weiteren ist PVC chemisch relativ inert, sodass die Funktionalisierung von PVC-Oberflächen ein interessantes Forschungsgebiet bleibt. Die Funktionalisierung ist z.B. mithilfe von Polymeren mit photoreaktiven Gruppen wie 2-Pyridyldithio- und Benzophenongruppen in den Seitenketten möglich, womit CD47 immobilisiert werden konnte. Die CD47-Funktionalisierung unterbindet sowohl die Adhäsion als auch die Aktivierung der Thrombozyten und Neutrophile deutlich. Während Silicon mit Blick auf die Hämokompatibilität besser geeignet zu sein scheint als PVC-P,^[269] hat es eine geringere mechanische Stabilität und wird öfter mit Ermüdungserscheinungen in Verbindung gebracht. Darum könnten Oberflächenfunktionalisierungen mit Mischungen von Silicon oder anderen funktionalen Polymeren ein guter Weg sein, um medizinische Hilfsmittel mit geeigneten Festkörper- und Oberflächeneigenschaften zu erhalten, als lediglich die mechanischen Festkörpereigenschaften von Silicon zu verbessern. Abbildung 11 zeigt einige typische medizinische Hilfsmittel, für die dringend kovalent gebundene bioinerte Polymerschichten benötigt werden. Der Stent ist ein gutes Beispiel für ein in Verwendung befindliches, aber nicht ideales Hilfsmittel, da Polymerbeschichtungen durch die Ausdehnung teilweise zerstört werden, wodurch Kanten freigelegt werden, die dann Angriffspunkte für Proteinadsorption und Thrombozytenaktivierung sind.^[270] Die Oberflächenfunktionalisierung von PVC, Silicon oder Stents könnte die Haltbarkeit von Blutprodukten erhöhen, die

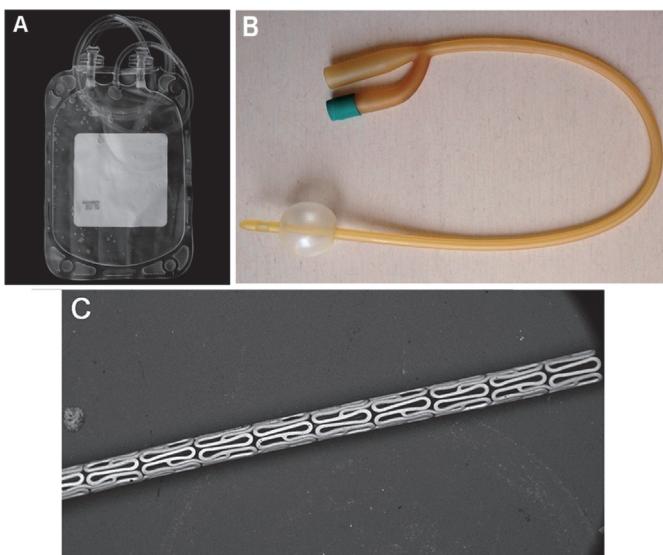


Abbildung 11. Typische Anwendungen von möglichst bioinerten Polymeren im Medizinbereich (von links nach rechts): A) Blutbeutel (Wiedergabe nach Lit. [271] mit Genehmigung von Elsevier). B) Katheter. C) Polyphosphaten-beschichteter Edelstahlstent.

Notwendigkeit einer zusätzlichen medikamentösen Behandlung reduzieren und sowohl das Versagen von Implantaten als auch implantatverbundene Komplikationen reduzieren.

Primärverpackungen und Handhabung von Biopharmazeutika

Die Entwicklung rekombinanter therapeutischer Proteine hat in den letzten zwei Jahrzehnten deutliche Fortschritte gemacht. Die Herstellung, der Versand und die Lagerung von Proteinwirkstoffen stellt aber aufgrund der Denaturierungs- und Aggregationsneigung der Proteine eine Herausforderung dar. Obwohl lyophilisierte Proteine eine verbesserte Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung haben, sind flüssige Formulierungen einfacher zu verarbeiten, benötigen weniger Handhabungsschritte und sind darum einfacher zu verabreichen.^[272] In flüssigen Formulierungen sind Proteine jedoch sowohl chemischen als auch physikalischen Stressfaktoren stärker ausgesetzt, die während der angestrebten zwei Jahre Haltbarkeit zu ihrer Denaturierung, Aggregation oder Adsorption auf der Verpackungsoberfläche führen können.^[273] Das kann zu einem Verlust der therapeutischen Wirksamkeit führen und sogar immunogene^[274,275] und allergische Reaktionen auslösen.^[276,277]

Die bei weitem am häufigsten verwendeten Behälter für kleinmaßstäbliche Anwendungen sind Borosilikatgläser Typ I. Glasoberflächen können jedoch trotz ihrer relativen Trägheit und Hydrophilie große Proteinkonzessionen adsorbierten.^[278]

Frieß und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die Adsorption von IgG1 und IgG aus humanem Serum (h-IgG) auf Typ-I-Gläsern hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen bedingt ist und darum stark vom pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung abhängt.^[279] Dabei korreliert die erhöhte Ladungsdifferenz zwischen Oberfläche und Protein mit einer erhöhten Proteinadsorption (Abbildung 12).

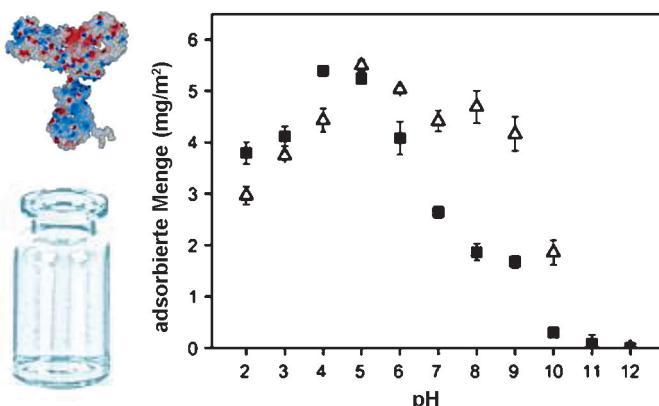


Abbildung 12. Adsorptionsprofile von monoklonalem IgG1 (■) und gesammeltem humanem IgG (△) in Borosilikatglasfläschen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Wiedergabe nach Lit. [279] mit Genehmigung von Elsevier.

Um die vorteilhaften Eigenschaften, wie die Undurchlässigkeit gegenüber Gasen und Feuchtigkeit, von Glas als Primärverpackungsmaterial zu bewahren und die unspezifische Adsorption zu reduzieren, können Glasfläschen mit bioinerten Materialien beschichtet werden. Aufbauend auf den oben diskutierten Ergebnissen wurden Glasbeschichtungen auf Basis von Polyglycerol (PG) in Hinblick auf die unspezifische IgG1-Adsorption untersucht.^[59] In diesem Fall konnte eine deutliche Verringerung des adsorbierten IgG1 beobachtet werden. Anders als bei den unbeschichteten Glasfläschen hatten der pH-Wert und die Ionenstärke der Formulierung keinen Einfluss auf die Menge des adsorbierten IgG. Des Weiteren wurden die Beschichtungen durch industriell relevante Sterilisierungsmethoden nicht beeinflusst. Langzeitstabilitätstests für bis zu drei Monate zeigten auch am Ende dieser Zeit noch eine hohe Proteinresistenz der PG-Oberflächen.

Eine Alternative zu Glas sind Behälter aus Cycloolefin-Polymeren (COP) bzw. Cycloolefin-Copolymeren (COC). COP/COC-Behälter sind transparent, was eine gute visuelle Kontrolle erlaubt, und deutlich leichter sowie bruchsicherer als Glas. Quadry et al. haben die Adsorption von niedrigkonzentrierten Formulierungen ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) zweier Proteine (75, 20 kDa)^[280] auf COP und Glasfläschen nach einem Tag Lagerung untersucht. Für beide Proteinformulierungen wurde bei den COP-Glasfläschen eine reduzierte Menge adsorbierten Proteins gefunden. Demgegenüber fanden Mathes et al. in Einzelproteinadsorptionsexperimenten mit IgG bei Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} im Vergleich zu Glasfläschen keine deutliche Verbesserung.^[279] Tatsächlich konnten sie zeigen, dass die Menge des adsorbierten IgG1 bei einer Reihe von Ionenstärken und pH-Puffern nach einem Tag Lagerung sogar erhöht war.

Wobei Probleme, die mit der Proteinadsorption auf Behälteroberflächen assoziiert werden, in der Regel durch die Zugabe von Hilfsmitteln wie humanem Serumalbumin (HSA), Zuckern oder nichtionischen Tensiden gelöst werden.^[281,283] Diese Hilfsmittel verringern nicht nur die Adsorption auf dem Primärbehälter, sondern erhöhen zu-

sätzlich die Löslichkeit, Festkörperstabilität und reduzieren die Proteinadsorption während des Herstellungsprozesses. Dies ist besonders bei Filtrationen der Fall, bei denen die Proteine großen Oberflächen ausgesetzt sind.^[284] Da HSA jedoch aus gesammeltem Plasma gewonnen wird, kann sein Gebrauch Probleme mit sich bringen, die mit Chargenstreuung oder Pathogenen aus dem Blut zu tun haben,^[283] während nichtionische Tenside die Oxidation, Denaturierung und Aggregation der Proteine erhöhen.^[285] Die Verwendung von Zuckern kann ebenfalls Probleme verursachen, die aus der Hyperosmolarität der Formulierung hervorgehen.

Obwohl Polymerbeschichtungen die Menge des adsorbierten Proteins deutlich reduzieren können, kann der Verlust an Proteinen bei hochdosierten Formulierungen, bei denen der Proteinverlust durch Adsorption üblicherweise unter 0.1 % liegt, als vernachlässigbar betrachtet werden.^[279,286] Wenn jedoch instabile Proteine und niedrig dosierte Formulierungen während der Rekonstitution oder bei ihrer Verdünnung (für eine einfache Anwendung) in Kontakt mit Behälterwänden kommen, dann ist der Proteinverlust durch Adsorption in der Regel recht erheblich. Zum Beispiel haben McLeod et al. den Verlust von Faktor VIII durch Adsorption während der Lagerung in PVC-Behältern vor der Anwendung beschrieben.^[287] Ein anderes Beispiel für einen erhöhten Proteinverlust bei stark verdünnten Proteinlösungen wurde von Quadry et al. beschrieben, die nach 24 h Lagerung in Glasfläschen einen deutlichen Verlust von bis zu 16 % bei Proteinkonzentrationen von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ gefunden haben.^[280] Page et al. haben die Adsorption von Flüssigformulierungen von rhIL-11 an Glasfläschen bei Konzentrationen von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ untersucht und nach 3 h bei Raumtemperatur einen 40 %igen Aktivitätsverlust gefunden.^[288] Dieser Aktivitätsverlust war hauptsächlich auf die Adsorption an die Glasoberfläche zurückzuführen.

Zusätzlich werden bei der Handhabung von Proteinen in der Diagnostik niedrig konzentrierte Proteinlösungen in der Regel mit einer Reihe von (Kunststoff-)Oberflächen in Kontakt gebracht.^[289] Der dabei auftretende Proteinverlust kann einen großen Einfluss auf das Ergebnis eines diagnostischen Assays haben. Zum Beispiel haben Dixit et al. den Aktivitätsverlust von humanem Fettuin A (HFA) in BSA-behandelten bzw. unbehandelten PP-Schläuchen bei Konzentrationen von 10 ng mL^{-1} mit drei verschiedenen Methoden untersucht.^[290] Sie konnten zeigen, dass der HFA-Aktivitätsverlust aufgrund von Adsorption und Konformationsänderungen nach 12 h Lagerung in unbehandelten PP-Schläuchen mehr als 60 % betrug, während der Verlust in BSA-behandelten Schläuchen bei unter 40 % lag. Insofern ist das Problem des Proteinanalytverlustes in diagnostischen Assays ein bislang wenig beachtetes Problem, das ist der Zukunft dringend behandelt werden sollte.

Neben den oben beschriebenen biomedizinischen Anwendungen wurden bioinerte Beschichtungen auch zum Schutz gegen marines Biofouling, Bakterien- und Biofilme, Infektionsresistenz usw. verwendet.^[193,291,292] Bioinerte Materialien wehren die proteininduzierte Adhäsion von Organismen ab. Die Kombination von bioinerten Materialien mit anderen spezifisch-funktionalen Materialien, wie beispielsweise hydrophoben Komponenten (z.B. fluorinierten Polyme-

ren) und aktiven Einheiten (z.B. quartären Ammoniumionen), verbessern die Eigenschaften und verringern die Zytotoxizität der verwendeten Beschichtungen. Aber auch in diesem Bereich fehlt es immer noch an langzeitstabilen bioinerten Beschichtungen.

4. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Trotz beachtlicher wissenschaftlicher Aktivität, sind die Wechselwirkungen zwischen polymeren Biomaterialien und Proteinen aus Körperflüssigkeiten oder -geweben immer noch nicht gut verstanden. Obwohl es viele Einzelveröffentlichungen zu diesem Thema gibt, haben nur wenige systematische Studien einige erste allgemeine Schlussfolgerungen geliefert. Sowohl wasservertmittelte hydrophobe und Hydrationskräfte als auch elektrostatische Wechselwirkungen werden als die Hauptfaktoren bei der Proteinadsorption angesehen. Auf der Grundlage von unzähligen systematischen Experimenten an selbstassemblierten Monolagen (SAMs) wurden die sogenannten „Whitesides-Regeln“ abgeleitet, um die Entwicklung von proteinresistenten Beschichtungen anzuleiten. Diese Regeln haben tatsächlich zu zahlreichen sehr guten proteinabwehrenden Monolagen geführt, die aber noch einige Einschränkungen aufweisen. Dank der schnellen Entwicklung analytischer Techniken konnten diese empirischen Regeln weiter verbessert werden. Auch die theoretische Modellierung hat sich im letzten Jahrzehnt deutlich verbessert. Insbesondere gibt es eine allgemeine Übereinstimmung bezüglich der vermuteten Hauptaspekte, die für die Proteinadsorption verantwortlich sind. Das Verständnis der Dynamik und der konkurrierenden Adsorption ist aber noch deutlich weniger entwickelt. Grundsätzlich fehlen auch systematische Studien, die Theorie und Experiment verbinden.

Die zukünftige Forschung sollte sich daher auf die folgenden Aspekte konzentrieren:

- Es werden mehr quantitative Studien benötigt, die theoretische Modelle mit Experimenten an gut verstandenen Oberflächenschichten vergleichen. Die Ergebnisse solcher Studien können dann zur weiteren Entwicklung und Optimierung empirischer Regeln, wie den „Whitesides-Regeln“, genutzt werden.
- Es besteht ein deutlicher Mangel an systematischen Studien, die sich mit der konkurrierenden Adsorption von Proteinen an gut untersuchten Oberflächen beschäftigen. Eine solche Studie muss die Zeitabhängigkeit einbeziehen, um das notwendige quantitative Verständnis der Langzeitproteinresistenz von Oberflächen in komplexen biologischen Medien zu liefern.
- Es sollte eingehend untersucht werden, wie die Konformationsänderungen bzw. Denaturierung der auf einer Oberfläche adsorbierten Proteine die Biokompatibilität beeinflussen.
- Weiterhin sollten, basierend auf dem stetig wachsenden theoretischen Verständnis, neue bioinerte Beschichtungen entwickelt werden, die die Proteinadsorption aus sehr komplexen Proteinmischungen wie Blutplasma effektiv verhindern.

- Da die meisten Beschichtungen während einer Langzeitimplantation enzymatisch abbaubar oder nur schlecht auf der Implantatoberfläche verankert sind, können die Zellen sich in die Implantatoberflächen integrieren, um die Beschichtungen mit Komponenten ihrer extrazellulären Matrix (ECM) zu ersetzen. Eine im lebenden Organismus durchgeführte Langzeitanwendungsstudie wurde bisher mit keiner proteinresistenten Oberfläche durchgeführt.
- Verschiedene biomedizinische Anwendungen wurden eingeführt, aber die Kombination von bioinerten und biospezifischen Oberflächen in einem optimalen Verhältnis bleibt weiterhin eine große Herausforderung für die Zukunft.

Die vorgeschlagenen Untersuchungen werden auch für ein besseres Verständnis der schwierigeren Systeme wie porösen Membranen, Blutbeuteln, Schlauchmaterialien und vielen anderen biomedizinischen Instrumenten sorgen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Helmholtz-Gemeinschaft und der Freien Universität Berlin unterstützt. Wir danken Achim Wiedekind für die Gestaltung vieler der hier beigelegten Abbildungen und Dr. Pamela Winchester für das Korrekturlesen des englischen Manuskripts.

Eingegangen am 17. Januar 2014
Online veröffentlicht am 15. Juli 2014

Übersetzt von Dr. Juliane Keilitz, Heidelberg

-
- [1] J. M. Anderson, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2001**, *31*, 81–110.
 - [2] B. D. Ratner, *J. Dent. Educ.* **2001**, *65*, 1340–1347.
 - [3] S. R. Meyers, M. W. Grinstaff, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1615–1632.
 - [4] I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 546–547.
 - [5] J. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2029–2030.
 - [6] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5761–5768.
 - [7] M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525–2534.
 - [8] G. Caracciolo, D. Pozzi, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Foglia, H. Amenitsch, A. Lagana, *Langmuir* **2011**, *27*, 15048–15053.
 - [9] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. Puntes, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3623–3632.
 - [10] M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggard, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7503–7509.
 - [11] R. Ganeshan, K. Kratz, A. Lendlein, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7322–7331.
 - [12] N. Scharnagl, S. Lee, B. Hiebl, A. Sisson, A. Lendlein, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 8789–8802.
 - [13] P. R. Dash, M. L. Read, L. B. Barrett, M. Wolfert, L. W. Seymour, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 643–650.
 - [14] D. E. Owens III, N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102.
 - [15] L. Vroman, A. L. Adams, *Surf. Sci.* **1969**, *16*, 438–446.

- [16] S. Y. Jung, S. M. Lim, F. Albertorio, G. Kim, M. C. Gurau, R. D. Yang, M. A. Holden, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12782–12786.
- [17] H. Noh, E. A. Vogler, *Biomaterials* **2007**, *28*, 405–422.
- [18] M. Lejars, A. Margallan, C. Bressy, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4347–4390.
- [19] T. Chandy, G. S. Das, R. F. Wilson, G. H. R. Rao, *Biomaterials* **2000**, *21*, 699–712.
- [20] M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Muller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 101–113.
- [21] E. A. Vogler, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *74*, 69–117.
- [22] D. Chandler, *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
- [23] M. Kanduć, E. Schneck, R. R. Netz, *Langmuir* **2013**, *29*, 9126–9137.
- [24] F. Müller-Plathe, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 754–769.
- [25] S. O. Nielsen, C. F. Lopez, G. Srinivas, M. L. Klein, *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16*, R481–R512.
- [26] M. Praprotnik, L. Delle Site, K. Kremer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 545–571.
- [27] V. Tozzini, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 144–150.
- [28] M. Zacharias, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2013**, *81*, 81–92.
- [29] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 5605–5620.
- [30] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8303–8304.
- [31] O. R. Bolduc, C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, J. F. Masson, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6779–6788.
- [32] A. R. Statz, R. J. Meagher, A. E. Barron, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7972–7973.
- [33] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, *252*, 1164–1167.
- [34] M. Calderón, M. A. Quadir, S. K. Sharma, R. Haag, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 190–218.
- [35] S. Y. Jiang, Z. Q. Cao, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 920–932.
- [36] N. B. Holland, Y. X. Qiu, M. Ruegsegger, R. E. Marchant, *Nature* **1998**, *392*, 799–801.
- [37] B. Pidhatika, J. Moller, E. M. Benetti, R. Konradi, E. Rakhamatullina, A. Muhlebach, R. Zimmermann, C. Werner, V. Vogel, M. Textor, *Biomaterials* **2010**, *31*, 9462–9472.
- [38] L. Deng, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5136–5137.
- [39] A. Higuchi, K. Shirano, M. Harashima, B. O. Yoon, M. Hara, M. Hattori, K. Imamura, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2659–2666.
- [40] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. K. Wu, D. Li, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1059–1087.
- [41] E. Lieb, M. Hacker, J. Tessmar, L. A. Kunz-Schughart, J. Fiedler, C. Dahmen, U. Hersel, H. Kessler, M. B. Schulz, A. Gopferich, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2333–2341.
- [42] S. Sharma, R. W. Johnson, T. A. Desai, *Langmuir* **2004**, *20*, 348–356.
- [43] T. V. Kryuk, V. M. Mikhal'chuk, L. V. Petrenko, O. A. Nelepoava, A. N. Nikolaevskii, *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*, 32.
- [44] F. Kawai, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 30–38.
- [45] J. K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L. S. Chan, T. Fisher, H. J. Meiselman, G. Garratty, *Cancer* **2007**, *110*, 103–111.
- [46] R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong, G. Garratty, P. Richette, *Expert Opin. Drug Delivery* **2012**, *9*, 1319–1323.
- [47] A. Sunder, R. Mülhaupt, R. Haag, H. Frey, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 235–239.
- [48] A. Sunder, R. Hanselmann, H. Frey, R. Mülhaupt, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4240–4246.
- [49] R. K. Kainthan, S. R. Hester, E. Levin, D. V. Devine, D. E. Brooks, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4581–4590.
- [50] C. Siegers, M. Biesalski, R. Haag, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2831–2838.
- [51] M. Lange, S. Braune, K. Luetzow, K. Richau, N. Scharnagl, M. Weinhart, A. T. Neffe, F. Jung, R. Haag, A. Lendlein, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1487–1492.
- [52] M. Wyszogrodzka, R. Haag, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1043–1054.
- [53] M. Wyszogrodzka, R. Haag, *Langmuir* **2009**, *25*, 5703–5712.
- [54] M. Imran ul-haq, B. F. Lai, R. Chapanian, J. N. Kizhakkedathu, *Biomaterials* **2012**, *33*, 9135–9147.
- [55] A. J. Pertsin, M. Grunze, *Langmuir* **2000**, *16*, 8829–8841.
- [56] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goede, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- [57] M. Weinhart, T. Becherer, N. Schnurbusch, K. Schwibbert, H. J. Kunte, R. Haag, *Adv. Eng. Mater.* **2011**, *13*, B501–B510.
- [58] A. S. Mcfarlane, *Nature* **1958**, *182*, 53–53.
- [59] K. Höger, T. Becherer, W. Qiang, R. Haag, W. Friess, S. Kuchler, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 756–764.
- [60] H. W. Ma, D. J. Li, X. Sheng, B. Zhao, A. Chilkoti, *Langmuir* **2006**, *22*, 3751–3756.
- [61] D. Song, D. Forciniti, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *221*, 25–37.
- [62] M. S. Wagner, S. L. McArthur, M. C. Shen, T. A. Horbett, D. G. Castner, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2002**, *13*, 407–428.
- [63] B. J. Tarasevich, U. Perez-Salas, D. L. Masica, J. Philo, P. Kienzle, S. Krueger, C. F. Majkrzak, J. L. Gray, W. J. Shaw, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3098–3109.
- [64] N. Welsch, Y. Lu, J. Dzubiella, M. Ballauff, *Polymer* **2013**, *54*, 2835–2849.
- [65] J. Wang, S. M. Buck, Z. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11666–11672.
- [66] N. Schwierz, D. Horinek, S. Liese, T. Pirzer, B. N. Balzer, T. Hugel, R. R. Netz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19628–19638.
- [67] C. Hänel, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 91–100.
- [68] H. Vaisocherová, W. Yang, Z. Zhang, Z. Q. Cao, G. Cheng, M. Pilariak, J. Homola, S. Y. Jiang, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7894–7901.
- [69] F. Hook, M. Rodahl, B. Kasemo, P. Brzezinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12271–12276.
- [70] J. Homola, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 462–493.
- [71] X. D. Hoa, A. G. Kirk, M. Tabrizian, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 151–160.
- [72] R. Konradi, M. Textor, E. Reimhult, *Biosensors* **2012**, *2*, 341–376.
- [73] M. A. Cooper, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 515–528.
- [74] N. J. Cho, C. W. Frank, B. Kasemo, F. Hook, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1096–1106.
- [75] R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, London, **2008**, Kap. 2.
- [76] E. T. Gedig, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, London, **2008**, Kap. 6.
- [77] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513–526.
- [78] E. A. Vogler, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1201–1237.
- [79] G. Anand, F. M. Zhang, R. J. Linhardt, G. Belfort, *Langmuir* **2011**, *27*, 1830–1836.
- [80] F. Höök, J. Voros, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Boni, J. J. Ramsden, M. Textor, N. D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo, *Colloids Surf. B* **2002**, *24*, 155–170.
- [81] M. Rodahl, F. Hook, A. Krozer, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 3924–3930.
- [82] I. Reviakine, D. Johannsmann, R. P. Richter, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8838–8848.
- [83] M. S. Wagner, D. G. Castner, *Langmuir* **2001**, *17*, 4649–4660.
- [84] M. S. Wagner, T. A. Horbett, D. G. Castner, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1897–1908.
- [85] D. S. Mantus, B. D. Ratner, B. A. Carlson, J. F. Moulder, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1431–1438.

- [86] S. Muramoto, D. J. Graham, M. S. Wagner, T. G. Lee, D. W. Moon, D. G. Castner, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 24247–24255.
- [87] A. K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof, *Analyst* **2013**, *138*, 1619–1627.
- [88] M. S. Wagner, T. A. Horbett, D. G. Castner, *Langmuir* **2003**, *19*, 1708–1715.
- [89] S. Lindman, I. Lynch, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 914–920.
- [90] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2050–2055.
- [91] K. Henzler, B. Haupt, K. Lauterbach, A. Wittemann, O. Borisov, M. Ballauff, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3159–3163.
- [92] A. L. Becker, N. Welsch, C. Schneider, M. Ballauff, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3936–3944.
- [93] K. M. Chen, Y. S. Xu, S. Rana, O. R. Miranda, P. L. Dubin, V. M. Rotello, L. H. Sun, X. H. Guo, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2552–2561.
- [94] N. Welsch, A. L. Becker, J. Dzubiella, M. Ballauff, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1428–1436.
- [95] N. Welsch, J. Dzubiella, A. Graebert, M. Ballauff, *Soft Matter* **2012**, *8*, 12043–12052.
- [96] C. Yigit, N. Welsch, M. Ballauff, J. Dzubiella, *Langmuir* **2012**, *28*, 14373–14385.
- [97] J. B. Chaires, *Biophys. Chem.* **1997**, *64*, 15–23.
- [98] D. J. Winzor, C. M. Jackson, *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 389–407.
- [99] K. Henzler, B. Haupt, M. Ballauff, *Anal. Biochem.* **2008**, *378*, 184–189.
- [100] N. Dingenaouts, J. Bolze, D. Potschke, M. Ballauff, *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *144*, 1–47.
- [101] S. Rosenfeldt, A. Wittemann, M. Ballauff, E. Breininger, J. Bolze, N. Dingenaouts, *Phys. Rev. E* **2004**, *70*, 061403.
- [102] K. Henzler, A. Wittemann, E. Breininger, M. Ballauff, S. Rosenfeldt, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3674–3681.
- [103] K. Henzler, S. Rosenfeldt, A. Wittemann, L. Harnau, S. Finet, T. Narayanan, M. Ballauff, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 158301.
- [104] K. Henzler, B. Haupt, S. Rosenfeldt, L. Harnau, T. Narayanan, M. Ballauff, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 17599–17605.
- [105] I. H. M. van Stokkum, H. Linsdell, J. M. Hadden, P. I. Haris, D. Chapman, M. Bloemendaal, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10508–10518.
- [106] F. N. Barrera, M. T. Garzon, J. Gomez, J. L. Neira, *Biochemistry* **2002**, *41*, 5743–5753.
- [107] A. Wittemann, M. Ballauff, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2813–2819.
- [108] A. Wittemann, M. Ballauff, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 13–20.
- [109] X. Jiang, U. G. Jiang, Y. D. Jin, E. K. Wang, S. J. Dong, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 46–53.
- [110] H. S. Mandal, H. B. Kraatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6356–6357.
- [111] J. Nowak, C. Watala, M. Boncler, *Blood Coagulation Fibrinolysis* **2014**, *25*, 52–60.
- [112] S. M. Slack, S. E. Posso, T. A. Horbett, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1991**, *3*, 49–67.
- [113] W. B. Tsai, J. M. Grunkemeier, T. A. Horbett, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *67*, 1255–1268.
- [114] D. Kohavi, L. Badihi, G. Rosen, D. Steinberg, M. N. Sela, *Biofouling* **2013**, *29*, 1215–1224.
- [115] M. Schäffler, M. Semmler-Behnke, H. Sarioglu, S. Takenaka, A. Wenk, C. Schleh, S. M. Hauck, B. D. Johnston, W. G. Kreyling, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 265103.
- [116] A. Backovic, H. L. Huang, B. Del Frari, H. Piza, L. A. Huber, G. Wick, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 376–381.
- [117] S. Guha Thakurta, A. Subramanian, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 137–149.
- [118] V. Leszczak, B. S. Smith, K. C. Popat, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 1529–1548.
- [119] M. Fountoulakis, H. W. Lahm, *J. Chromatogr. A* **1998**, *826*, 109–134.
- [120] S. Mathew, A. Lendlein, C. Wischke, **2014**, eingereicht.
- [121] M. Casiano-Maldonado, G. T. Lim, X. Li, D. H. Reneker, J. E. Puskas, C. Wesdemiotis, *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, *354–355*, 391–397.
- [122] M. F. Ewles, M. Abrar, L. Goodwin, D. Bakes, *Chromatogr. Today* **2010**, *3*, 26–29.
- [123] J. E. Noble, M. J. Bailey, *Methods Enzymol.* **2009**, *463*, 73–95.
- [124] C. Daniel, Y. Roupioz, D. Gasparutto, T. Livache, A. Buhot, *PLoS One* **2013**, *8*, e75419.
- [125] H. Xu, K. Gorgy, C. Gondran, A. Le Goff, N. Spinelli, C. Lopez, E. Defrancq, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 90–95.
- [126] Y. X. Chen, G. Triola, H. Waldmann, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 762–773.
- [127] M. Rashidian, J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277–1294.
- [128] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4182–4200; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106.
- [129] M. Holmberg, K. B. Stibius, S. Ndoni, N. B. Larsen, P. Kingshott, X. L. L. Hou, *Anal. Biochem.* **2007**, *361*, 120–125.
- [130] J. Benesch, G. Hungerford, K. Suhling, C. Tregidgo, J. F. Mano, R. L. Reis, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *312*, 193–200.
- [131] C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernandez-Suarez, S. Putthenveetil, A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10914–10919.
- [132] M. Filice, O. Romero, J. M. Guisan, J. M. Palomo, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5535–5540.
- [133] U. Reichert, T. Linden, G. Belfort, M.-R. Kula, J. Thommes, *J. Membr. Sci.* **2002**, *199*, 161–166.
- [134] B. Sivaraman, R. A. Latour, *Biomaterials* **2010**, *31*, 832–839.
- [135] M. Auton, C. Zhu, M. A. Cruz, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1192–1201.
- [136] K. P. Fears, R. A. Latour, *Langmuir* **2009**, *25*, 13926–13933.
- [137] B. Sivaraman, R. A. Latour, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1036–1044.
- [138] F. Jung, S. Braune, A. Lendlein, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2013**, *53*, 97–115.
- [139] F. Bexborn, A. E. Engberg, K. Sandholm, T. E. Mollnes, J. Hong, K. N. Ekdahl, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *89*, 951–959.
- [140] I. Mackie, P. Cooper, A. Lawrie, S. Kitchen, E. Gray, M. Laffan, B. C. S. Haematology, *Int. J. Lab. Hematol.* **2013**, *35*, 1–13.
- [141] S. Braune, G. Alagoz, B. Seifert, A. Lendlein, F. Jung, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2012**, *52*, 349–355.
- [142] T. Takubo, M. Hino, K. Suzuki, N. Tatsumi, *Biotech. Histochem.* **1998**, *73*, 310–315.
- [143] T. Ishida, H. Kiwada, *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 889–891.
- [144] „The Complement System“: R. J. Johnson, *Biomaterials Science*, 3edrd edElsevier, Amsterdam, **2013**.
- [145] J. Andersson, K. N. Ekdahl, J. D. Lambris, B. Nilsson, *Biomaterials* **2005**, *26*, 1477–1485.
- [146] B. Nilsson, K. N. Ekdahl, T. E. Mollnes, J. D. Lambris, *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 82–94.
- [147] T. Roch, A. Kruger, K. Kratz, N. Ma, F. Jung, A. Lendlein, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2012**, *52*, 375–389.
- [148] T. Roch, J. Cui, K. Kratz, A. Lendlein, F. Jung, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2012**, *50*, 131–142.
- [149] P. H. Nilsson, K. N. Ekdahl, P. U. Magnusson, H. Qu, H. Iwata, D. Ricklin, J. Hong, J. D. Lambris, B. Nilsson, Y. Teramura, *Biomaterials* **2013**, *34*, 985–994.
- [150] T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggad, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse, K. A. Dawson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5856–5858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5754–5756.
- [151] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K. A. Dawson, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–35*, 167–174.
- [152] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 428–437.

- [153] Y. Li, Z. S. Zhang, H. P. van Leeuwen, M. A. C. Stuart, W. Norde, J. M. Kleijn, *Soft Matter* **2011**, *7*, 10377–10385.
- [154] F. Ganazzoli, G. Raffaini, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3651–3663.
- [155] W. Wang, O. Donini, C. M. Reyes, P. A. Kollman, *Annu. Rev. Biophys. Biomater.* **2001**, *30*, 211–243.
- [156] D. L. Ermak, J. A. McCammon, *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 1352–1360.
- [157] E. Dickinson, S. R. Euston, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1992**, *42*, 89–148.
- [158] L. A. Pugnaloni, E. Dickinson, R. Ettelaie, A. R. Mackie, P. J. Wilde, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *107*, 27–49.
- [159] P. Vilaseca, K. A. Dawson, G. Franzese, *Soft Matter* **2013**, *9*, 6978–6985.
- [160] K. Kubiak-Ossowska, P. A. Mulheran, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8891–8900.
- [161] M. Panos, T. Z. Sen, M. G. Ahunbay, *Langmuir* **2012**, *28*, 12619–12628.
- [162] T. Wei, M. A. Carignano, I. Szleifer, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10189–10194.
- [163] T. Wei, M. A. Carignano, I. Szleifer, *Langmuir* **2011**, *27*, 12074–12081.
- [164] B. M. Rubenstein, I. Coluzza, M. A. Miller, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 208104.
- [165] T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer, K. Park, *Langmuir* **1998**, *14*, 176–186.
- [166] C. Johansson, J. Gernandt, M. Bradley, B. Vincent, P. Hansson, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *347*, 241–251.
- [167] F. Fang, I. Szleifer, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 1053–1065.
- [168] F. Fang, J. Satulovsky, I. Szleifer, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1516–1533.
- [169] J. Satulovsky, M. A. Carignano, I. Szleifer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9037–9041.
- [170] F. Fang, I. Szleifer, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2568–2589.
- [171] M. A. Carignano, I. Szleifer, *Colloids Surf. B* **2000**, *18*, 169–182.
- [172] A. Halperin, M. Kroger, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6986–7005.
- [173] A. Halperin, M. Kroger, *Langmuir* **2009**, *25*, 11621–11634.
- [174] P. M. Biesheuvel, F. A. M. Leermakers, M. A. C. Stuart, *Phys. Rev. E* **2006**, *73*, 011802.
- [175] P. M. Biesheuvel, A. Wittemann, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4209–4214.
- [176] W. M. de Vos, P. M. Biesheuvel, A. de Keizer, J. M. Kleijn, M. A. C. Stuart, *Langmuir* **2008**, *24*, 6575–6584.
- [177] Y. B. Zhulina, V. A. Pryamit syn, O. V. Borisov, *Vysokomol. Soedin. Ser. A* **1989**, *31*, 185–194.
- [178] S. T. Milner, T. A. Witten, M. E. Cates, *Macromolecules* **1988**, *21*, 2610–2619.
- [179] B. Amsden, *Macromolecules* **1998**, *31*, 8382–8395.
- [180] C. C. Lin, A. T. Metters, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1379–1408.
- [181] S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, J. A. Denman, O. U. Sezerman, M. M. M. Bilek, *Colloids Surf. B* **2013**, *103*, 395–404.
- [182] D. Dell'Orco, M. Lundqvist, C. Oslakovic, T. Cedervall, S. Linse, *Plos One* **2010**, *5*, e10949.
- [183] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovich, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772–781.
- [184] U. M. B. Marconi, P. Tarazona, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 8032–8044.
- [185] J. P. Hansen, I. MacDonald, *Theory of Simple Liquids*, 4th edn Academic Press, New York, **2013**.
- [186] P. Schaaf, J. Talbot, *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 4401–4409.
- [187] I. Banerjee, R. C. Pangule, R. S. Kane, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 690–718.
- [188] C. Blaszykowski, S. Sheikh, M. Thompson, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5599–5612.
- [189] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554.
- [190] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.
- [191] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Labinis, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426–436.
- [192] D. Schwendel, T. Hayashi, R. Dahint, A. Pertsin, M. Grunze, R. Steitz, F. Schreiber, *Langmuir* **2003**, *19*, 2284–2293.
- [193] A. Rosenhahn, S. Schilp, H. J. Kreuzer, M. Grunze, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4275–4286.
- [194] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9359–9366.
- [195] M. Weinhart, T. Becherer, R. Haag, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1553–1555.
- [196] C. Perrino, S. Lee, S. W. Choi, A. Maruyama, N. D. Spencer, *Langmuir* **2008**, *24*, 8850–8856.
- [197] K. Kim, C. Kim, Y. Byun, *Langmuir* **2001**, *17*, 5066–5070.
- [198] Y. Chang, W. L. Chu, W. Y. Chen, J. Zheng, L. Y. Liu, R. C. Ruaan, A. Higuchi, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *93*, 400–408.
- [199] Y. B. Wang, M. Gong, S. Yang, K. Nakashima, Y. K. Gong, *J. Membr. Sci.* **2014**, *452*, 29–36.
- [200] D. L. Elbert, J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 55–65.
- [201] N. P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, *Langmuir* **2001**, *17*, 489–498.
- [202] H. Ogawa, T. Chihara, K. Taya, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1365–1369.
- [203] S. Onclin, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6438–6462; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6282–6304.
- [204] R. Hofer, M. Textor, N. D. Spencer, *Langmuir* **2001**, *17*, 4014–4020.
- [205] J. L. Dalsin, P. B. Messersmith, *Mater. Today* **2005**, *8*, 38–46.
- [206] Y. F. Zhou, W. Huang, J. Y. Liu, X. Y. Zhu, D. Y. Yan, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4567–4590.
- [207] R. G. Chapman, E. Ostuni, M. N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, G. Pier, H. S. Warren, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 1225–1233.
- [208] S. R. Benhabbour, H. Sheardown, A. Adronov, *Macromolecules* **2008**, *41*, 4817–4823.
- [209] M. J. L. Felipe, R. R. Ponnappati, R. B. Pernites, P. Dutta, R. C. Advincula, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 3401–3405.
- [210] M. Weinhart, I. Grunwald, M. Wyszogrodzka, L. Gaetjen, A. Hartwig, R. Haag, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1992–2000.
- [211] T. Gillich, E. M. Benetti, E. Rakhmatullina, R. Konradi, W. Li, A. Zhang, A. D. Schlüter, M. Textor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10940–10950.
- [212] D. Rana, T. Matsuura, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2448–2471.
- [213] A. T. Neffe, M. von Ruesten-Lange, S. Braune, K. Luetzow, T. Roch, K. Richau, F. Jung, A. Lendlein, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1720–1729.
- [214] C. Trimpert, G. Boese, W. Albrecht, K. Richau, T. Weigel, A. Lendlein, T. Groth, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 274–284.
- [215] B. Seifert, G. Mihantzi, T. Groth, W. Albrecht, K. Richau, Y. Missirlis, D. Paul, G. von Sengbusch, *Artif. Organs* **2002**, *26*, 189–199.
- [216] W. Mussard, N. Kebir, I. Kriegel, M. Esteve, V. Semetey, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11063–11066; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10871–10874.
- [217] J. F. Jhong, A. Venault, C. C. Hou, S. H. Chen, T. C. Wei, J. Zheng, J. Huang, Y. Chang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 6732–6742.
- [218] T. Thiele, R. Storm, H. Matuschewski, U. Schedler, EP 1390126B1, **2004**.

- [219] Y. K. Feng, H. Y. Zhao, M. Behl, A. Lendlein, J. T. Guo, D. Z. Yang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 61–70.
- [220] H. W. Ma, M. Wells, T. P. Beebe, A. Chilkoti, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 640–648.
- [221] A. Hucknall, S. Rangarajan, A. Chilkoti, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2441–2446.
- [222] J. Yang, J. Lv, M. Behl, A. Lendlein, D. Yang, L. Zhang, C. Shi, J. Guo, Y. Feng, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1681–1688.
- [223] G. Gunkel, M. Weinhardt, T. Becherer, R. Haag, W. T. S. Huck, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 4169–4172.
- [224] L. Mi, S. Y. Jiang, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1774–1782; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1746–1754.
- [225] W. Yang, S. F. Chen, G. Cheng, H. Vaisocherova, H. Xue, W. Li, J. L. Zhang, S. Y. Jiang, *Langmuir* **2008**, *24*, 9211–9214.
- [226] J. Ladd, Z. Zhang, S. Chen, J. C. Hower, S. Jiang, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1357–1361.
- [227] C. Rodriguez Emmenegger, E. Brynda, T. Riedel, Z. Sedlakova, M. Houska, A. B. Alles, *Langmuir* **2009**, *25*, 6328–6333.
- [228] L. Mi, M. T. Bernards, G. Cheng, Q. M. Yu, S. Y. Jiang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2919–2925.
- [229] Y. Li, M. Giesbers, M. Gerth, H. Zuilhof, *Langmuir* **2012**, *28*, 12509–12517.
- [230] J. A. Dougan, C. Karlsson, W. E. Smith, D. Graham, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3668–3675.
- [231] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksch, J. Dernedde, C. Graf, E. W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10622–10650; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498.
- [232] J. P. Bearinger, S. Terrettaz, R. Michel, N. Tirelli, H. Vogel, M. Textor, J. A. Hubbell, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 259–264.
- [233] R. Rodríguez, M. A. Blesa, A. E. Regazzoni, *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *177*, 122–131.
- [234] B. Mizrahi, X. Khoo, H. H. Chiang, K. J. Sher, R. G. Feldman, J. J. Lee, S. Irusta, D. S. Kohane, *Langmuir* **2013**, *29*, 10087–10094.
- [235] R. H. Li, T. A. Barbari, *J. Membr. Sci.* **1995**, *105*, 71–78.
- [236] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- [237] R. Heuberger, G. Sukhorukov, J. Voros, M. Textor, H. Möhwald, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 357–366.
- [238] S. Y. Wong, L. Han, K. Timachova, J. Veselinovic, M. N. Hyder, C. Ortiz, A. M. Klibanov, P. T. Hammond, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 719–726.
- [239] X. W. Jiang, H. Y. Chen, G. Galvan, M. Yoshida, J. Lahann, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 27–35.
- [240] C. Rodriguez-Emmenegger, O. Kylian, M. Houska, E. Brynda, A. Artemenko, J. Kousal, A. B. Alles, H. Biederman, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1058–1066.
- [241] K. K. Goli, O. J. Rojas, J. Genzer, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3769–3779.
- [242] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- [243] Q. Wei, F. L. Zhang, J. Li, B. J. Li, C. S. Zhao, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1430–1433.
- [244] Q. Wei, B. J. Li, N. Yi, B. H. Su, Z. H. Yin, F. L. Zhang, J. Li, C. S. Zhao, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *96*, 38–45.
- [245] O. Pop-Georgievski, S. Popelka, M. Houska, D. Chvostova, V. Proks, F. Rypacek, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3232–3242.
- [246] T. S. Sileika, H. D. Kim, P. Maniak, P. B. Messersmith, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 4602–4610.
- [247] N. Meyerbröker, T. Kriesche, M. Zharnikov, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 2641–2649.
- [248] H. Lee, K. D. Lee, K. B. Pyo, S. Y. Park, H. Lee, *Langmuir* **2010**, *26*, 3790–3793.
- [249] Q. Wei, T. Becherer, R. C. Mutihac, P.-L. M. Noeske, F. Paulus, R. Haag, I. Grunwald, *Biomacromolecules* **2014**, DOI: 10.1021/bm500673u.
- [250] Q. Wei, T. Becherer, P.-L. M. Noeske, I. Grunwald, R. Haag, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 2688–2693.
- [251] K. S. Liu, L. Jiang, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2012**, *42*, 231–263.
- [252] M. Paven, P. Papadopoulos, S. Schottler, X. Deng, V. Mailänder, D. Vollmer, H. J. Butt, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2512.
- [253] H. J. Butt, C. Semprebon, P. Papadopoulos, D. Vollmer, M. Brinkmann, M. Ciccotti, *Soft Matter* **2013**, *9*, 418–428.
- [254] N. Vogel, R. A. Belisle, B. Hatton, T. S. Wong, J. Aizenberg, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2176.
- [255] G. Gunkel, W. T. S. Huck, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7047–7052.
- [256] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762–9792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618–9647.
- [257] M. Cretich, F. Damin, G. Pirri, M. Chiari, *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 77–88.
- [258] Y. Moskovitz, S. Srebnik, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 22–31.
- [259] M. Jäger, J. Bruns, E. Ehrentreich-Förster, K. Petermann, *Adv. Photonics* **2013**, ST4B.3.
- [260] S. Pathak, A. K. Singh, J. R. McElhanon, P. M. Dentinger, *Langmuir* **2004**, *20*, 6075–6079.
- [261] X. Y. Wang, R. E. Ruther, J. A. Streifer, R. J. Hamers, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4048–4049.
- [262] J. ter Maat, R. Regeling, M. L. Yang, M. N. Mullings, S. F. Bent, H. Zuilhof, *Langmuir* **2009**, *25*, 11592–11597.
- [263] T. Špringer, M. Bocková, J. Homola, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5637–5640.
- [264] Informationen zum linken Teil unter <http://www.greinerbioone.com> und zur funktionalen Oberflächenmodifizierung unter <http://www.poly-an.de>.
- [265] L. L. Li, C. Cheng, T. Xiang, M. Tang, W. F. Zhao, S. D. Sun, C. S. Zhao, *J. Membr. Sci.* **2012**, *405*, 261–274.
- [266] S. X. Liu, J. T. Kim, S. Kim, M. Singh, *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112*, 1704–1715.
- [267] F. Chiellini, M. Ferri, A. Morelli, L. Dipaola, G. Latini, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1067–1088.
- [268] M. J. Finley, L. Rauova, I. S. Alferiev, J. W. Weisel, R. J. Levy, S. J. Stachelek, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5803–5811.
- [269] M. F. Harmand, F. Briquet, *Biomaterials* **1999**, *20*, 1561–1571.
- [270] K. Matschke, S. M. Tugtekin, U. Kappert, F. Jung, J. W. Park, M. Knaut, *Herz* **2004**, *29*, 201–207.
- [271] S. Talwar, D. Malankar, S. K. Choudhary, B. Airan, *Heart Lung Circ.* **2010**, *19*, 673–674.
- [272] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne, D. S. Katayama, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 544–575.
- [273] S. K. Singh, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 354–387.
- [274] A. S. Rosenberg, *AAPS J.* **2006**, *8*, E501–E507.
- [275] H. Schellekens, *Clin. Ther.* **2002**, *24*, 1720–1740.
- [276] A. Hawe, M. Wiggenhorn, M. van de Weert, J. H. Garbe, H. C. Mahler, W. Jiskoot, *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 895–913.
- [277] S. Hermeling, D. J. Crommelin, H. Schellekens, W. Jiskoot, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 897–903.
- [278] J. Blümmel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, J. P. Spatz, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4739–4747.
- [279] J. Mathes, W. Friess, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78*, 239–247.
- [280] S. S. Qadry, T. H. Roshdy, H. Char, S. Del Terzo, R. Tarantino, J. Moschera, *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 207–212.
- [281] B. A. Kerwin, M. C. Heller, S. H. Levin, T. W. Randolph, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1062–1068.
- [282] E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1325–1336.
- [283] A. Hawe, W. Friess, *Pharm. Dev. Technol.* **2007**, *12*, 223–237.
- [284] K. Nakamura, K. Matsumoto, *J. Membr. Sci.* **2006**, *280*, 363–374.

- [285] W. Wang, Y. J. Wang, D. Q. Wang, *Int. J. Pharm.* **2008**, *347*, 31–38.
- [286] C. J. Burke, B. L. Steadman, D. B. Volkin, P. K. Tsai, M. W. Bruner, C. R. Middaugh, *Int. J. Pharm.* **1992**, *86*, 89–93.
- [287] A. G. Mcleod, I. R. Walker, S. Zheng, C. P. M. Hayward, *Hæmophilia* **2000**, *6*, 89–92.
- [288] C. Page, P. Dawson, D. Woollacott, R. Thorpe, A. Mire-Sluis, *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 19–26.
- [289] M. Goebel-Stengel, A. Stengel, Y. Tache, J. R. Reeve, *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 38–46.
- [290] C. K. Dixit, S. K. Vashist, B. D. MacCraith, R. O’Kennedy, *Analyst* **2011**, *136*, 1406–1411.
- [291] J. A. Callow, M. E. Callow, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 244.
- [292] D. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, *Biomaterials* **2013**, *34*, 8533–8554.