

# Interdisziplinäre Entwicklung neuer Polymeroberflächen für Zellkulturen und Implantate

A. Welle, IMB

## Forschung an den Grenzen der Wissenschaften

Es ist zu beobachten, dass Fortschritte heute immer seltener aus der Kernkompetenz *einer einzelnen* Naturwissenschaft entspringen. Die Zeiten, da gewaltige Industrien (Stahl, Kunststoffe, Halbleiter) auf einer einzelnen Naturwissenschaft basierten, sind nach Ansicht vieler Experten vorüber. Vielmehr wird heute neues Wissen immer häufiger an den Grenzen zwischen den einzelnen Naturwissenschaften gesammelt. Weiterhin bildet sich in der nationalen [1] und internationalen Forschungslandschaft ein immer deutlicher werdender Themenschwerpunkt in der *Biologie* aus. Nach Angaben der AAAS [2] verdreifachte sich, ausgehend von einem nahezu identischen Finanzvolumen der Sparten Physik, Ingenieurwissenschaften und Biologie, in den letzten 3 Jahrzehnten das Budget der „Life Sciences“, während die beiden anderen Disziplinen auf dem Stand von 1970 stagnierten. Diese Entwicklung bewirkt, dass sich viele nicht-biologische Disziplinen, wie beispielsweise Physik, Materialwissenschaften und Informatik, derzeit verstärkt biologischen Fragestellungen zuwenden und in diesem Bereich äußerst wichtige Impulse liefern. Die bekannte Entwicklung der HGF und des Forschungszentrums Karlsruhe im Lauf der letzten Jahre verdeutlicht das in perfekter Weise [3].

Ein aktuelles Beispiel für derartige biologierelevante, interdisziplinäre Forschungsprojekte ist

die Entwicklung neuer Polymere für *in vitro* Zellkulturen und medizinische Implantate. Dabei spielen nicht nur gedankliche und methodische „Grenzen“ zwischen mehreren Naturwissenschaften eine Rolle, sondern die Eigenschaften einer realen Grenzfläche, hier zwischen dem künstlichen Substrat einerseits und lebenden Zellen andererseits, die im Zentrum des Interesses mehrerer Wissenschaftler aus verschiedenen Instituten des Forschungszentrums stehen.

## Oberflächen und Grenzflächen aus biologischer Sicht

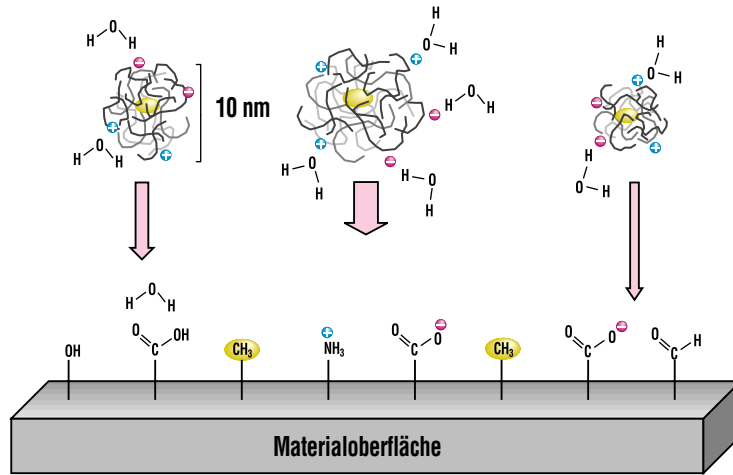
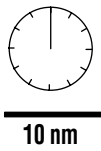
Sowohl bei medizinischen Implantaten, wie beispielsweise künstlichen Herzklappen, Kathetern und Zahnfüllungen, als auch bei Trägern für *in vitro* Zellkulturen sind neben den Volumeneigenschaften des verwendeten Materials (Härte, Elastizität, Permeabilität, Wasseraufnahme, etc.) insbesondere die Eigenschaften der *Materialoberfläche* wie Rauigkeit, Benetzbarkeit, chemische Zusammensetzung, Ladung, Mobilität und so weiter von größter Bedeutung. Ursache dafür ist, dass an der *Materialoberfläche* wichtige Vorgänge ablaufen, die entscheidend für die Verträglichkeit oder Abstoßung des Materials sind. Diese Prozesse, die etwa bei dem Kontakt einer Implantatoberfläche mit Blut und Gewebe *in vivo*, aber auch in einer Zellkultur ablaufen, sind äußerst komplex. Leo Vroman schrieb 1971 „... we have calculated on the basis of our present progress that the combined studies proposed above will require

$10^7$  years.“ [4]. In der Tat sind diese Vorgänge bis heute noch nicht vollkommen verstanden, können jedoch in groben Zügen, wie im folgenden Kasten, dargestellt werden.

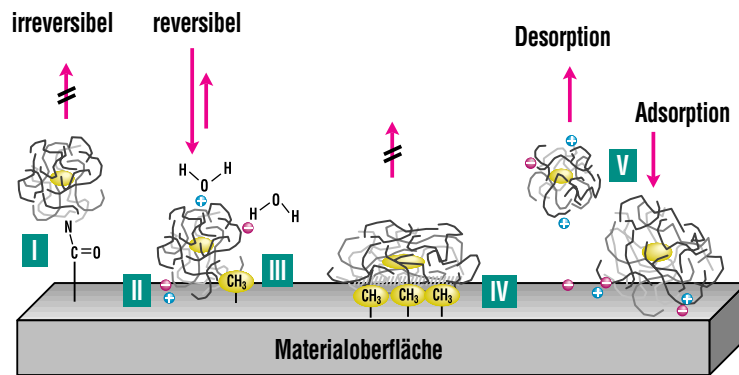
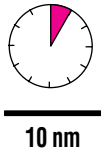
Wie in den Abbildungen 1a-c skizziert, wird die Zellantwort auf ein angebotenes Substrat von dessen physikalischen und chemischen Oberflächeneigenschaften ausgelöst, und über eine adsorbierte Proteinschicht an die Zelle weitergeleitet. Die einzelnen Schritte sind sowohl zeitlich als auch nach ihrer Größenordnung gestaffelt:

Diffusionskontrolliert, und daher im Bereich von deutlich weniger als einer Millisekunde, erreichen kleine Proteine, wie Albumin, die im Kulturmedium gelöst vorliegen, die Substratoberfläche und treten mit ihr in Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen beruhen auf elektrostatischen und dispersiven (van der Waals-) Kräften sowie zum Teil auch auf Wasserstoffbrücken und auf chemischen Bindungen. Die Verdrängung von gebundenen Wassermolekülen von der Substratoberfläche und aus der Hydrathülle der gelösten Proteine (Abb. 1a) stellt einen hohen Entropiegewinn dar, der Enthalpieeffekte überkompensiert. Bei den meisten Substratmaterialien überwiegen die attraktiven Wechselwirkungen, so dass daraus eine *Proteinadsorption* auf dem Substrat resultiert.

Nach einer gewissen Verweilzeit können die adsorbierten, flexiblen Proteinmoleküle mehr und mehr deformiert werden und dabei weitere Bindungen zum Sub-

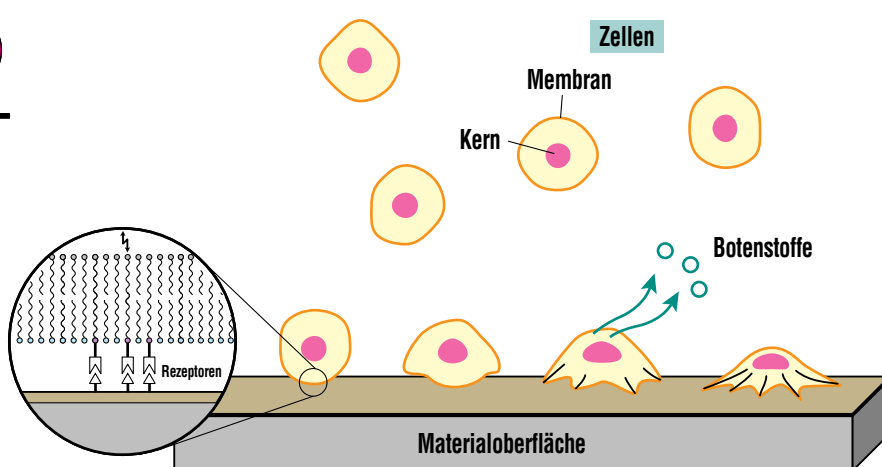
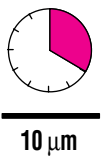


**a**



- I chemische Bindungen**
- II Ladungs-Wechselwirkung**
- III hydrophobe Wechselwirkungen**
- IV denaturiertes Protein**
- V Proteinverdrängung**

**b**



**c**

### Abb. 1: Proteinadsorption und Zelladhäsion an Biomaterialoberflächen

a) Ausgangssituation: Biomaterialien können eine Vielzahl verschiedener chemischer Gruppen an der Oberfläche tragen. Wichtige sind: Hydroxyl-, Carboxyl-, Alkyl-, Amino- und Aldehydgruppen. Proteine bestehen aus langen Polypeptidketten die durch Faltung und Quervernetzung des Strangs eine bestimmte Tertiärstruktur einnehmen, wobei hydrophobe Bereiche des Moleküls bevorzugt im Zentrum des Knäuels, hydrophile und geladene Gruppen dagegen an der Außenseite sitzen. Hydrophile Gruppen des Biomaterials und des Proteins sind von assoziierten Wassermolekülen umgeben.

b) Entstehung und Veränderung des Proteinadsorbates: Gelöste Proteine erreichen durch Diffusion rasch die Biomaterialoberfläche und treten mit ihr in Wechselwirkung. Wichtige Mechanismen dieser Wechselwirkung sind: Ausbildung kovalenter Bindungen, wie zum Beispiel zwischen Amino- und Carboxylgruppen des Substrats (nahezu irreversibel). Elektrostatische Anziehung zwischen negativen und positiven Ladungen. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Alkylgruppen. Obwohl diese Wechselwirkungen reversibel sind, können sie doch so stark werden, dass die native Faltungsform des Proteins zerstört wird. Sind verschiedene Proteine zugegen, können schwach gebundene kleinere Proteine von größeren Proteinen durch „Unterwanderung“ während temporärer Lösung einzelner Bindungen von der Substratoberfläche verdrängt werden.

c) Zelladhäsion: Zellen erreichen die Oberfläche des Biomaterials erst, nachdem bereits ein charakteristischer Proteinfilm gebildet wurde. Rezeptoren in der Zellmembran erkennen die Aminosäuresequenz und die Faltungsstruktur der adsorbierten Proteine. Dadurch werden Signale in das Innere der Zelle geleitet und die Zellen können auf einem geeigneten Substrat haften. Dabei verändert sich oft die Form der Zelle und wichtige Funktionen der Zelle (Stoffwechsel, Teilung, etc.) reagieren auf den Impuls von außen.

strat ausbilden. Dieser Effekt spielt insbesondere bei hydrophoben Oberflächen (Polyethylen, Polystyrol, fluorierte Polymere) eine große Rolle, da durch die Umorientierungen im Gerüst der adsorbierten Proteine günstige Wechselwirkungen zu den hydrophoben Proteinbereichen gebildet werden, die in wässriger Lösung durch die Faltung der Polypeptidkette besonders im Kernbereich des Moleküls zu finden sind. Bei hoher Packungsdichte der Proteine spielen zusätzlich zu den Protein/Substrat-Wechselwirkungen auch Protein/Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Adsorbates eine Rolle (Gelbildung). Beide Wechselwirkungen machen die Desorption eines Proteinmoleküls, die eine simul-

tane Lösung der zahlreichen Bindungen erfordert, immer unwahrscheinlicher. Durch die Deformation und Blockierung aktiver Zentren wird aber auch die biologische Funktion des adsorbierten Proteins gestört, es wird denaturiert (siehe Bild 1b, Mitte).

In der Realität liegen, beispielsweise in Blutplasma und Zellkulturmedien, komplexe Proteingemische aus oft mehr als einhundert Einzelproteinen vor. Durch die kompetitive Adsorption der zahlreichen Proteine mit jeweils unterschiedlich starken Substratbindungen und Kinetiken wird das Bild wesentlich komplizierter. Große Proteine wie Fibrinogen und Fibronectin, die durch ihre geringere Diffusionsge-

schwindigkeit die Substratoberfläche etwas später erreichen, sind teilweise in der Lage die bereits adsorbierten Proteine in einem Zeitbereich von wenigen Minuten zu verdrängen, indem sie die Oberflächenplätze, die durch teilweise Ablösung kleinerer Proteine temporär freierwerden, besetzen und damit die kleineren Proteinmoleküle „unterwandern“ (Bild 1b, rechts). Daraus resultiert eine zeit- und konzentrationsabhängige Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht.

Wie in Abb. 1c gezeigt, erreichen Zellen die Materialoberfläche erst, nachdem sie bereits von dem Proteinadsorbat bedeckt ist. Damit ist dieser Proteinfilm die eigentliche Oberfläche, die von den

Zellen „analysiert“ und möglicherweise zur Anhaftung verwendet wird. Wie in Abb. 1c skizziert, verläuft auch die Zellanhaftung in mehreren Phasen, wobei zunächst einige Ligand/Rezeptor-Bindungen zwischen der Zelle und der Proteinschicht gebildet werden, die im weiteren Verlauf unter Deformation der Zellmembran zahlreicher und fester werden. Dabei formieren sich die zunächst einzelstehenden Rezeptoren zu größeren Bündeln, die die Zelle sehr fest verankern. Die Umgebung der Zelle, bestehend aus adsorbierten Proteinen und Nachbarzellen, bewirkt neben Strukturänderungen der Zellmembran weitere wichtige Impulse auf die gesamte Zelle (Organisation von Aktin-Cytoskelettfasern, die die Zelle resistenter gegen angreifende Scherkräfte machen; Ausschüttung von Botenstoffen sowie die Beeinflussung der Zellteilung und der Stoffwechselaktivität). Diese Abhängigkeit der Vitalität einer Zelle von ihrer Umgebung kann so weit gehen, dass Einzelzellen in Suspension absterben oder zumindest ihre physiologische Funktionen (Differenzierungszustand) nahezu vollständig verlieren.

Da das Proteinadsorbat auf einem Zellkultursubstrat, wie erläutert, die Haftung und Vitalität einer Zelle unmittelbar steuert, wird oft versucht einen klar definierten Protein- oder Peptidfilm durch eine gesteuerte Kopplung an die Substratoberfläche zu erzielen. Dieser Weg ist jedoch experimentell extrem aufwendig, da das möglichst reine Protein bzw. Peptid unter schonenden Reakti-

onsbedingungen fest an das Substrat gebunden werden soll [5].

Schließlich wirken bei der Besiedelung eines Kultursubstrates auch die haftenden Zellen selbst aktiv auf eine vorhandene Proteinschicht ein, indem sie eigene Haft- bzw. Matrixproteine freisetzen und das bestehende Proteinadsorbat teilweise abbauen oder verändern. Daher erscheint es nicht immer sinnvoll die Zusammensetzung des Proteinadsorbates durch aufwendige Immobilisationstechniken zu diktieren, sondern vielmehr technisch einfachere chemische Modifikationen der Substratoberfläche vorzunehmen und die spontane Bildung des Proteinadsorbates auszunutzen. Hierbei ist jedoch problematisch, dass bis heute oft nur empirische Zusammenhänge zwischen den einstellbaren Oberflächenparametern und der Proteinadsorption bzw. Zelladhäsion bekannt sind. Es bleibt zu hoffen, dass die verstärkten interdisziplinären Anstrengungen dazu beitragen dieses Gebiet nicht erst nach Leo Vromans Hochrechnung in Millionen Jahren zu verstehen.

### Oberflächenmodifikation zur Steuerung der Biokompatibilität

Der häufig gebrauchte Begriff Biokompatibilität wird je nach Verwendung eines Materials mitunter vollkommen gegensätzlich definiert. In der Orthopädie wird bei Gelenkprothesen am Metallschaff des Gelenks eine maximale Haftung der Knochenzellen gewünscht, um das Implantat im

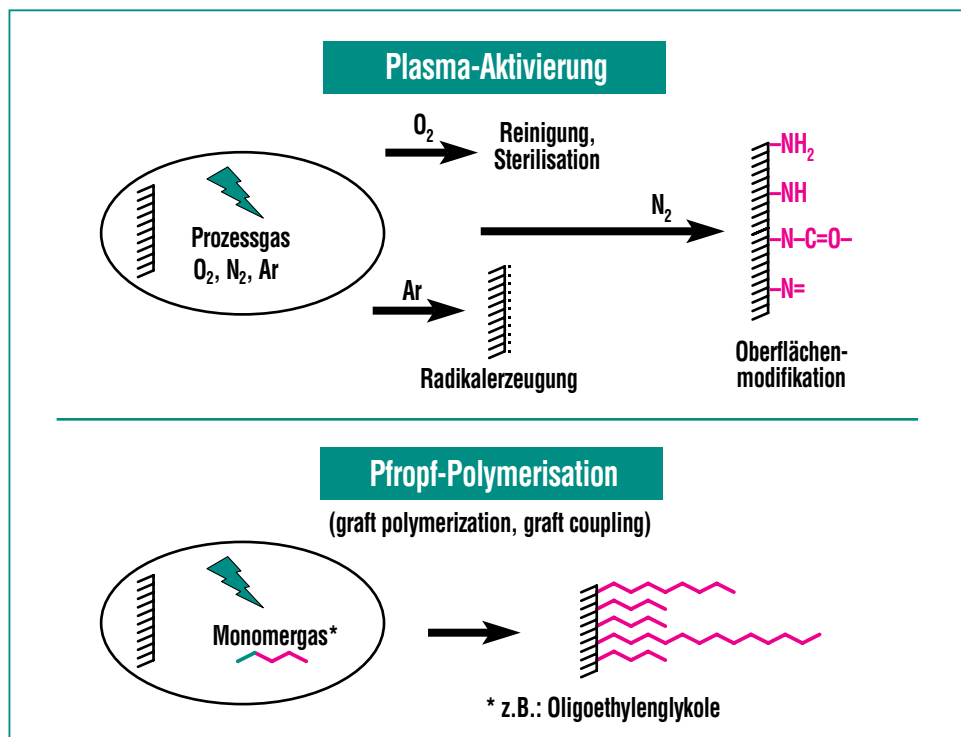
Skelett zu verankern. Im Gegensatz dazu muss bei vielen anderen Implantaten wie Stents<sup>1)</sup>, Herzklappen, verschiedenen Kathetern im cardiovascularen und urologischen Bereich, aber auch bei Kontaktlinsen die Zellhaftung unterdrückt werden. Die Anhaftung von Blutplättchen löst die Gerinnungskaskade aus, die zu Thrombosen und Embolien führen kann. Auch die Haftung von Bakterien auf Implantatoberflächen kann katastrophale Folgen für den Patienten haben, da Bakterien effektive Strategien entwickelt haben, die zur Ausbildung eines zähen Biofilms führen, der den Keimen optimale Lebensbedingungen bietet und sie vor der Wirkung von Antibiotika schützt. Endokarditis, eine bakteriell ausgelöste Entzündung nach Herzklappenersatz, macht in vielen Fällen die Entfernung der Klappe erforderlich.

Diese Beispiele verdeutlichen, dass die universelle Definition von Biokompatibilität per se noch keine Aussage zur Zelladhäsion liefert, sondern die erwünschten Substrat/Zell-Wechselwirkungen von dem jeweiligen Einsatzgebiet des Produkts abhängig sind.

Am Institut für Medizintechnik und Biophysik werden derzeit verschiedene Verfahren untersucht, die sowohl die Unterdrückung als auch die Steigerung der Zelladhäsion auf Kunststoffoberflächen ermöglichen. Eine Technik zur Modifikation von Polymeroberflächen basiert auf verschiedenen Varianten der Plasma-Aktivierung (siehe Abb. 2, oben) oder der „Plasma Enhan-

<sup>1)</sup> Gefäßstützen, die in verengte Blutgefäße eingebracht werden und sie von innen aufhalten sollen.

ced Chemical Vapor Deposition, PECVD“ (Propf-Polymerisation, Abb. 2, unten), das heißt der Abscheidung gewünschter Verbindungen aus der Gasphase unter Einwirkung eines kalten Plasmas [6-8]. Hauptbestandteil der PECVD Anlage, die ursprünglich in der Silicium-Mikrolithographie eingesetzt wurde, ist die Behandlungskammer mit zwei eingebauten Elektroden, daneben der Radiofrequenzgenerator sowie Vakuumpumpen, Steuerungs- und Gasversorgungseinrichtungen. Zur Plasmabehandlung werden die Proben über eine Schleuse in die Kammer eingebracht, die anschließend auf unter 0,05 Torr evakuiert wird. Nachdem Gasmischung und Druck in der Kammer eingestellt und eventuell ein Polymer-Precursor in der Kammer verdampft wurde, wird durch die Hochfrequenzanregung (13,56 MHz, max. 300 W) eine Gasentladung erzeugt. Die energiereichen freien Radikale, die aus dem Hilfsgas (im Allgemeinen Stickstoff oder Argon) und dem verdampften Precursor gebildet werden, sowie die freien Elektronen des Nichtgleichgewichtsplasmas<sup>2)</sup> und die emittierte UV-Strahlung wirken auf die Probenoberfläche ein. Dabei wird, wie in Abb. 2 oben dargestellt, das eingesetzte Polymer-substrat an seiner Oberfläche chemisch verändert werden (Bildung von Carboxyl-, Aminogruppen, etc.). Bei einer Plasma-behandlung mit einem Inertgas werden Radikale an der Polymeroberfläche erzeugt, die die kova-



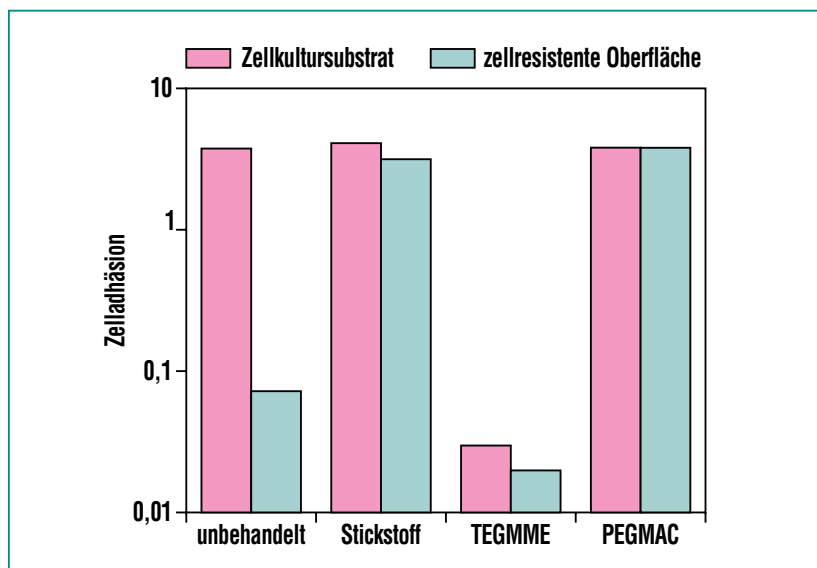
**Abb. 2: Möglichkeiten der Modifizierung von Polymeroberflächen durch Plasmaverfahren. Oben: Reinigung, Sterilisation, Erzeugung einfacher chemischer Gruppen und Radikalen an der Polymeroberfläche. Unten: Propf-Polymerisation neuer Polymere auf das Substrat.**

lente Ppropfung eines neuen Polymers *ex situ* ermöglichen („post plasma graft coupling“). Es kann auch ein vollkommen neues Polymer (aus dem gasförmigen Precursor) an die Oberfläche des Substrates gepropft werden („graft polymerization“), siehe Abb. 2 unten.

Die hergestellten Beschichtungen sind, je nach Wahl des eingesetzten Prozessgases oder Polymerprecursors sowie des Gesamtgasdruckes, der Gasflussraten und der Anregungsleistung, entweder sehr zellabstoßend oder stimulierend auf die Zellhaftung. Wird Tri(ethylenglykol)-

monomethylether (TEGMME) in der Kammer verdampft und mit Stickstoff als Hilfsgas und geringer Leistungsdichte ein Polymerisat auf dem Substrat abgeschieden, bildet sich ein weniger als  $1\mu m$  dünner Film, der extrem resistent gegenüber Zelladhäsion ist (Abb. 3). Wird dagegen ausschließlich Stickstoff als Prozessgas oder Stickstoff zusammen mit Poly(ethylenglykol)methacrylat (PEGMAC) als Precursor verwendet, werden Filme gebildet welche die Zellhaftung unterstützen (Abb. 3). Als Substrate und Vergleichsmaterialien dienten in diesen Experimenten kommerzielle Polystyrolproben, die je nach

<sup>2)</sup> Die Bezeichnung Nichtgleichgewichtsplasma soll hervorheben, dass zwischen den freien Elektronen und den Ionen kein thermisches Gleichgewicht herrscht. Das Plasma ist im Gegensatz zu Flammen und Lichtbögen kalt.



**Abb. 3: Beeinflussung der Zelladhäsion durch verschiedene Plasmapbehandlungen.**

Von links nach rechts: Zahl haftender Hepatozyten auf zwei unbehandelten kommerziellen Referenzproben (Polystyrol, PS). Rot: Zellkultursubstrat. Grün: Zellabweisendes PS).

Die folgenden Balkenpaare stellen die Zellhaftung auf den beiden Substraten nach Behandlung mit einem Stickstoffplasma sowie nach plasmaunterstützter Abscheidung von Tri(ethylenglykol)monomethylether, TEGMME bzw. Poly(ethylenglykol)methacrylat, PEGMAC dar. TEGMME Beschichtungen sind extrem zellabweisend und übertreffen die unbehandelte zellabweisende Referenzprobe. PEGMAC Beschichtungen machen auch ursprünglich ungeeignete Proben sehr zellfreundlich.

Herstellungsverfahren zellabweisend bzw. zellfreundlich sind (jeweils grüne bzw. rote Balken in Abb. 3). Insbesondere die hervorragende Unterdrückung der Zellhaftung durch TEGMME-PECVD ist für einige der oben genannten Anwendungsgebiete in der Medizin sehr vielversprechend.

Die Resistenz einiger ähnlicher Polyethylenglykolschichten gegenüber Proteinadsorption und somit auch Zellanlagerung ist bereits seit Jahren bekannt [9] und

wird mit besonderen Molekularstrukturen dieser Filme erklärt, die jedoch im Detail noch nicht ganz verstanden sind. Es ist aber offensichtlich, dass der Zustand der PEG<sup>3)</sup>-Schicht in Form eines Hydrogels wichtig für diese Effekte ist. Hydrogele bestehen aus losen und flexiblen Polymerketten, die große Mengen relativ fest eingelagerter Wassermoleküle enthalten [10]. Nähert sich ein Proteinmolekül aus der Lösung diesen Oberflächen, werden die Poly-

merknäuel zusammengepresst und entwässert. Beide Vorgänge bewirken eine Abstoßung des Proteinmoleküls und verhindern so die Proteinadsorption an der Materialoberfläche („steric repulsion“). Da auch die Zellen keine Haftproteine auf der Oberfläche deponieren können, wird durch die aufgebrachte Polyethylenglykolschicht die Zelladhäsion wirksam unterdrückt.

Auffallend und zunächst überraschend ist jedoch, dass trotz einer relativ ähnlichen chemischen Struktur des Precursors Poly(ethylenglykol)methacrylat im Vergleich zum Tri(ethylenglykol)monomethylether (durchschnittlich 6 Ethylenglykol-Wiederholeinheiten in PEGMAC und 3 EG-Einheiten in TEGMME) die beobachteten Zellantworten auf die abgeschiedenen Filme vollkommen verschieden sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Acrylgruppen des PEGMAC durch die Plasmaanregung aktiviert werden und das abgeschiedene Polymerisat quervernetzen. Dadurch wird sowohl das Quellvermögen und die Wasseraufnahme, als auch die freie Beweglichkeit der einzelnen Polymerstränge blockiert. Trotz nahezu identischer chemischer Zusammensetzung wirken die „steric repulsion“-Effekte nicht mehr und Proteinadsorption sowie Zelladhäsion auf dem Substrat sind möglich.

Durch Steuerung der PECVD Parameter sollte es möglich sein, die Quervernetzung und damit die mikromechanischen Eigen-

<sup>3)</sup> Die Verhältnisse bei kurzkettingen Oligo(ethylenglykol)-(OEG) Monolagen sind nicht mit dem einfachen Modell der „steric repulsion“ das hier verwendet wird, erklärbar. Bei OEG-Schichten spielt zusätzlich die Packungsdichte und damit die Konformation der OEG-Kette (all-trans oder helikal) eine Rolle. PECVD-Poly(ethylenglykol)-Schichten sind amorph.

schaften der Polymerbeschichtung zu steuern. Eine für die Zellkultur optimale Oberfläche müsste die Charakteristika beider Beschichtungen kombinieren, indem sie Adhäsionspunkte (z.B. in Form geladener Gruppen) für Proteine und Zellen trägt, die flexibel an das Substrat gebunden sind. Damit soll erreicht werden, dass sich die Adhäsionspunkte der Protein- und in gewissem Umfang der Zell-Geometrie anpassen können, ohne Denaturierung bzw. mechanischen Stress auszulösen. Zusätzlich sollte ein hoher Wassergehalt im Hydrogel vorliegen, um durch möglichst gute Diffusion eine gute Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Selbstverständlich müssen auch technologische und biologische Anforderungen (einfache Herstellung, keine Cytotoxizität) erfüllt sein.

Die zweite angewandte Methode nutzt energiereiche ultraviolette Strahlung mit  $\lambda = 185 \text{ nm}$ , um Kunststoffoberflächen (untersucht wurden Polycarbonat, Poly(methylmethacrylat) und Polystyrol) zu aktivieren und chemisch zu modifizieren [11]. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht werden an der Polymeroberfläche kurzlebige Radikale<sup>4)</sup> und stabile Carboxylatgruppen erzeugt. Da die chemischen Veränderungen bei der UV-Belichtung lediglich in der äußersten Schicht des Polymers stattfinden, eignen sich nur oberflächensensitive Analysemethoden, wie Kontaktwinkelmessungen, Farbstoffbindung und die Röntgenphotoelektronen-

spektroskopie zur Detektion. In Abb. 4 ist das Kohlenstoff-Photoelektronenspektrum<sup>5)</sup> einer UV-behandelten Polycarbonatprobe gezeigt. Zusätzlich zu den bereits bei unbehandelten Proben auftretenden Peaks 1 und 2 zeigt der hinzugekommene dritte Peak die entstandenen Carboxylgruppen

an. Durch Kontaktwinkelmessungen konnte gezeigt werden, dass es sich um deprotonierbare Carbonsäuregruppen handelt. Tab. 1 zeigt, dass die UV-Belichtung bereits ohne eine Nachbehandlung zelladhäsionsfördernd wirkt.

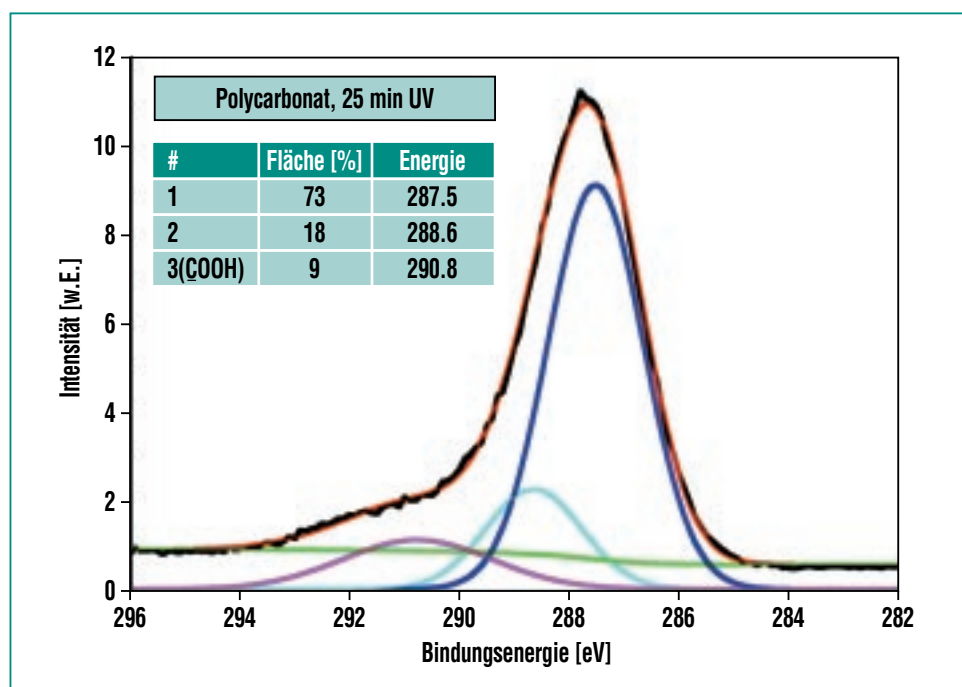


Abb. 4: C1s-Photoelektronenspektrum einer UV-belichteten Polycarbonatoberfläche. Die Hauptpeaks 1 (blau) und 2 (cyan) stammen von den verschiedenen Kohlenstoffspezies im Polycarbonat. Peak 3 bei 290,8 eV Bindungsenergie ist dem Kohlenstoff der erzeugten Carbonylgruppen zuzuordnen.

UV-Belichtungszeit (min)	0	2	5	20	60
Zellhaftung L929	2%	89%	97%	98%	98%
Zellhaftung HepG2	6%	25%	77%	99%	99%

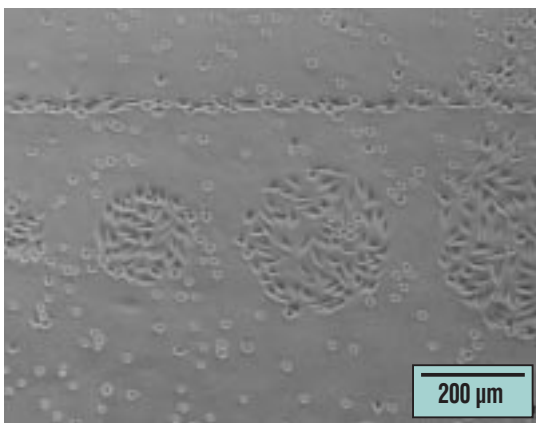
Tab. 1: Anteil haftender Zellen im Vergleich zur Menge der insgesamt aufgebrauchten Zellen (Mausfibroblasten L929, sowie humane Hepatomzelllinie HepG2). Substrat: Polystyrol ohne Vorbehandlung sowie nach unterschiedlichen UV-Belichtungszeiten.

<sup>4)</sup> Die gebildeten Radikale ermöglichen analog zum „post plasma grafting“ eine kovalente Anbindung gewünschter Substanzen.

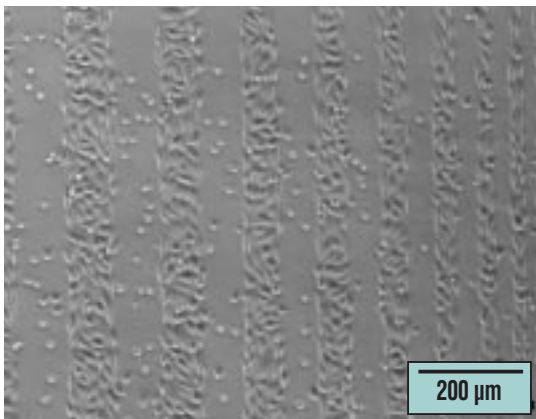
<sup>5)</sup> Die Verschiebung von ca. 1,5 eV gegenüber den Referenz-Peaks ist auf die Aufladung der isolierenden Probe zurückzuführen.

## Strukturierung von Oberflächen

Ein besonders wichtiger Aspekt der photochemischen Oberflächenmodifikation durch UV-Bestrahlung ist die Möglichkeit der



**Abb. 5:** Fibroblasten (L929) auf modifiziertem Polystyrol. 30-minütige UV-Belichtung einer Linie und mehrerer Kreise. Phasenkontrastaufnahme lebender Zellen 3 Stunden nach Beginn der Zellkultur. Maßstab: 200μm. Die Zellen haften auf den UV-belichteten Bezirken und flachen sich dabei ab. Auf unbelichteten Bezirken bleiben die Zellen rund und sind durch Mediumwechsel zu entfernen.



**Abb. 6:** Fibroblasten (L929) auf modifiziertem Polystyrol. 30-minütige UV-Belichtung mit Streifenmuster. Phasenkontrastaufnahme lebender Zellen 3 Stunden nach Beginn der Zellkultur. Maßstab: 200μm.

einfachen Erzeugung strukturierter Oberflächen<sup>6)</sup> zur lateralen Steuerung der Zelladhäsion. An derartigen Strukturierungen wird derzeit an verschiedenen Stellen intensiv geforscht [12-17], da sie zur Untersuchung neuronaler Zellen und Netzwerke, Cokulturen verschiedener Zellen und der embryonalen Organentstehung gebraucht werden und wichtige Werkzeuge im Bereich des „Tissue Engineering“ darstellen. Die Mehrheit der heute angewandten Techniken zur chemischen Mikrostrukturierung basieren entweder auf der spontanen Bildung von Thiol-Monolagen („self assembled monolayers“, SAM) auf Edelmetallen oder Silanen auf Glas, wobei die Struktur oft durch miniaturisierte Stempel („micro contact printing“) vorgegeben, oder durch Laserablation in einen kontinuierlichen SAM geschrieben wird [16, 18-20]. Obwohl Kunststoffsubstrate sehr häufig für Zellkulturen verwendet werden, existieren wenige Publikationen über die Strukturierung dieser Substrate. Viele der vorgestellten Verfahren sind im Vergleich zu der UV-Bestrahlung mittels der Metall/Quarz-Maske sehr aufwendig (Sauerstoffplasma-Behandlung unter Zuhilfenahme konventioneller Photoresisttechnologie [15]), oder sie erreichen nur geringe Ortsauflösung (Kohlenstoffabscheidung aus der Gasphase [21]).

Da gezeigt werden konnte, dass die chemischen Veränderungen der Polymeroberflächen nicht durch die Wirkung von Ozon,

sondern durch die Bestrahlung selbst ausgelöst werden, lag es nahe unter Verwendung entsprechender Masken Muster im Größenbereich weniger Mikrometer zu erzeugen, die eine räumliche Kontrolle der Zelladhäsion erlauben. Wie in den Abb. 6 und 7 gezeigt, lagern sich Zellen, in diesem Fall L929-Mausfibroblasten, nur an den belichteten Stellen an. Dieser Effekt ist bereits kurz nach Aufgabe der Zellsuspension zu erkennen. Zellen, die auf unbelichtete Bezirke der Probe sedimentiert sind, bleiben rund und haften nicht am Substrat an, so dass sie beim Wechsel des Kulturmediums weggeschwemmt werden. Besondere Vorteile des vorgestellten Verfahrens sind seine Unkompliziertheit, die geringen Kosten des Substratmaterials, die Vermeidung jeglicher chemischer Behandlungen, die ein Kontaminationsrisiko darstellen, die Raumkompatibilität und die gute Auflösung.

## Zusammenfassung und Ausblick

Biologische Vorgänge an Oberflächen haben erstaunlich weitreichende Konsequenzen<sup>7)</sup>. Besonders offensichtlich sind diese Prozesse beim Einsatz von Implantaten in unserem Körper. Für derart lebenswichtige Anwendungen stehen bisher nur sehr wenige Materialien zur Verfügung, die noch keineswegs optimal sind, wie beispielsweise das hohe Risiko (ca. 30%) einer chronischen

<sup>6)</sup> Zum Patent angemeldet.

<sup>7)</sup> Wahrscheinlich spielen Gesteins- oder Tonoberflächen eine wichtige Rolle bei der eigentlichen Entstehung lebender Systeme in der „Ursuppe“ [22].



Infektion eines Dauerkatheters zeigt. Über diese Spezialgebiete hinaus sind Wechselwirkungen zwischen biologischen Systemen und künstlichen Oberflächen weniger offensichtlich, jedoch praktisch allgegenwärtig, wie folgende Beispiele aus verschiedensten Dimensionen zeigen sollen: Vom störendem Wachstum von Mikroorganismen und Muscheln an Schiffsrümpfen das mit hochtoxischen Verbindungen (TBT) bekämpft wird; über die gezielte Bakterienbesiedlung von Trägermaterialien (Rieselkörpern) für die Abwasserbehandlung (wie auch für die Essigherstellung) und Suspensionskulturen von Zellen in Bioreaktoren zur Gewinnung von Pharmazeutika bis hin zu kariesverursachenden, bakteriellen Biofilmen auf Zähnen. Allen Beispielen ist gemeinsam, dass komplexe, gestaffelte Adsorptionsvorgänge ablaufen, sobald die Oberfläche des künstlichen Materials mit einer biologischen Umgebung in Kontakt kommt. Diese Prozesse führen in der Regel zur Bildung eines wenige Nanometer dicken Proteinfilms. Die Zusammensetzung dieses Proteinadsorbats und der Zustand der gebundenen Proteine wird von den Zellen, die das Fremdmaterial umgeben, erkannt und steuert die -erwünschte oder unerwünschte- Haftung der Zellen am Substrat sowie deren Differenzierung und Vitalität.

Mit Hilfe der vorgestellten Verfahren können verschiedene Polymeroberflächen so modifiziert oder mit einem geeigneten Polymer überzogen werden, dass die Anhaftung von Zellen in die er-

wünschte Richtung gesteuert werden kann:

- Durch plasmagestützte Gasphasenabscheidung geeigneter Polymere, und auch durch Bestrahlung mit kurzwelligem ultraviolettem Licht, wurden sehr zellfreundliche Oberflächen erhalten. Die UV-Bestrahlung beinhaltet zusätzlich eine praktikable Möglichkeit der Strukturzeugung, die für einige Anwendungen wichtig ist.
- Eine hohe Zellresistenz wurde durch eine plasmagestützte Gasphasenabscheidung unsubstituierter Polyethylenglykole (TEGMME) erreicht.

In Zukunft werden die Ansprüche an geeignete Oberflächen durch die Miniaturisierung drastisch steigen. Je kleiner die geplanten Analysen- oder Zellkultursysteme werden, desto wichtiger werden schon aus geometrischen Gründen ihre Oberflächen. Dies trifft insbesondere für Bauteile für die Mikrofluidik, Bioanalytik und mikrostrukturierte Zellkultursubstrate zu. Der *de novo* Aufbau eines kompletten und funktionierenden Organersatzes erfordert nicht nur eine möglichst realitätsnahe Architektur, bestehend aus verschiedenen Zelltypen, einer Gefäßversorgung, etc., sondern auch eine sehr präzise Anpassung der Zellkulturbedingungen (verwendete Zellarten, teilweise Konzentrationsgradienten usw.) und insbesondere der Oberfläche des künstlichen Zellkultursubstrates. Daher ist die weitere Erprobung der Beschichtungen unter klinischen Bedin-

gungen bzw. in anspruchsvollen Zellkulturmodellen, die Organe simulieren, ein vorrangiges Ziel. Zu den geplanten Einsatzgebieten zählen sowohl dreidimensionale Mikrostrukturen aus Polycarbonat der Poly(methylmethacrylat) [23], zweidimensionale Träger zur Kultur von Nervenzellen, als auch verschiedene intrakorporale medizintechnische Systeme. Daneben sollen immunologische Identifizierungen der adsorbierten Proteine und Bestimmungen der Vitalität immobilisierter Zellen einen weiteren Schritt zum besseren Verständnis der Zell/Substrat-Interaktionen liefern. Diese Untersuchungen sollen durch die Infrarotspektroskopie ergänzt werden, um das Proteinadsorbat möglichst detailliert zu charakterisieren.

## Danksagung

Nur die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen mehreren Instituten machte diese Arbeit möglich.

Ich möchte mich bei den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die durch ihren Einsatz zu dieser Arbeit beigetragen haben: Leo Hörner, Siegfried Horn, Josef Schweinfurter (IMB); Joachim Schulz und Paul Abaffy (IMT); Michael Bruns, Hanns Klewe-Nebenius und Hans Deutsch (IFIA); Marian Dirschka und Ullrich Stahl (IFIA); Olaf Fuhr, Thomas Koch und Hartmut Gliemann (INT) und viele weitere innerhalb und außerhalb des Forschungszentrums.

## Literatur

- [1] BMBF, *Biotechnologie*, <http://www.bmbf.de/foerde01/forschung/3-2-5-1.htm>, 2000
- [2] M.L. Green, *MRS Bull.*, 2001. 26(1), S. 3.
- [3] U. Knapp, *Nachrichten – Forschungszentrum Karlsruhe*, 2000. 32(1-2), S. 7.
- [4] L. Vroman, et al., *Federation Proceedings*, 1971. 30(5), S. 1494.
- [5] H. Sigrist, et al., *Opt. Engin.*, 1995. 34(8), S. 2339.
- [6] E. Piskin, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 1992. 4(1), S. 45.
- [7] C. Oehr, et al., *Surf. Coat. Technol.*, 1999. 116-119, S. 25.
- [8] J. Piglowski, et al., *Biomaterials*, 1994. 15(11), S. 909.
- [9] S. Nagaoka, et al., in *Polymers as Biomaterials*, S.W. Shalaby, et al., Editors. 1984, Plenum Press: New York. p. 364.
- [10] Z. Xu, R.E. Marchant, *Biomaterials*, 2000. 21(10), S. 1075.
- [11] A. Welle, et al., *Structured Polymeric Substrates for Cell Culture Applications*, Jan 2001, in preparation
- [12] S.N. Bhatia, et al., *Biotechnol. Prog.*, 1998. 14, S. 378.
- [13] R. Singhvi, et al., *Science*, 1994. 264, S. 696.
- [14] T. Bohanon, et al., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 1996. 8(1), S. 19.
- [15] E. Deraït, et al., *J. Neurosci. Methods*, 1998. 84(1-2), S. 193.
- [16] M. Mrksich, *Chem. Soc. Rev.*, 2000. 29, S. 267.
- [17] D.T. Chiu, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(6), S. 2408.
- [18] D.A. Stenger, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992. 114, S. 8435.
- [19] C.N. Dulcay, et al., *Science*, 1991. 252, S. 551.
- [20] H.G. Craighead, et al., *J. Biomed. Microdevices*, 1998. 1(1), S. 49.
- [21] M. Kaibara, et al., *J. Biomed. Mat. Res.*, 1996. 31(3), S. 429.
- [22] P.v. Sengbusch, *Welche Voraussetzungen müssen für eine Entstehung lebender Systeme gegeben sein?*, [http://www.rz.uni-hamburg.de/biologie/b\\_online/d41/41b.htm](http://www.rz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/d41/41b.htm), 1999
- [23] G. Knedlitschek, et al., *J. Biomed. Eng.*, 1999. 121, S. 35.