



Doctoral Thesis

**Ultrathin, non-fouling coatings exploiting biomimetic surface anchorage concepts
a combination of electrostatic & coordinative binding mechanisms**

Author(s):

Saxer, Sina Simone

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006381898> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19303

Ultrathin, Non-fouling Coatings Exploiting Biomimetic Surface Anchorage Concepts -
A Combination of Electrostatic & Coordinative Binding Mechanisms

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

SINA SIMONE SAXER

Master of Science in Chemistry, University of Basel

born 10. September 1980

citizen of Sevelen (SG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner

Prof. Dr. Dieter Schlüter, co-examiner

Prof. Dr. Karl Gademann, co-examiner

Dr. Stefan Zürcher, co-examiner

2010

Abstract

In nature, adhesion-dependent organisms have developed elaborated strategies for the anchoring to diverse surfaces and under different environmental conditions. This non-specific adsorption, further termed biofouling, affects adversely the performance and function of a broad range of materials and devices, such as marine constructions, heat exchangers, filtering systems and biomedical devices. There is a great need for efficiently preventing biofouling with application of non-fouling coatings. Such coatings have to compete with fouling species, in particular proteins, bacteria, cells and higher organisms. They should be highly durable and stable, preferentially over the lifetime of a device. To this end, strong surface-coating interaction and stability under difficult environmental conditions (aqueous environment, salt and low/high pH) are key requirements. A similar interaction as used by the competing fouling organism. Approaches that exploit biomimetic concepts and translate them into engineering approaches have therefore become very popular in the biointerface community.

Natural adhesives are frequently protein-based. Examples include mussel adhesive proteins (MAP's) that consist of different amino acids, partly post-translationally modified, with surface-active side chains e.g. DOPA, lysine, hydroxyproline, phosphoserine.

Bioadhesives are often compatible with a great variety of different artificial substrates, ranging from metals to ceramics and polymers. This is typically achieved by a combination of different anchor chemistries and presentation of multiple anchors, thus exploiting multivalency to greatly increase affinity to surfaces.

To this end, we exploit the combination of electrostatic and coordinative binding sites. The graft-copolymer poly(L-lysine)-*graft*-poly(ethylene glycol) (PLL-*g*-PEG) was used as a well-characterized model system and starting material that has been successfully applied in the past as a non-fouling coating. PLL-*g*-PEG consists of a poly(L-lysine) backbone that is positively charged at neutral pH and can adsorb to negatively charged substrates through multiple electrostatic interactions. Long PEG chains are grafted to some of the lysine side

chains forming a PEG brush surface after self-assembly to a surface.

This polymer system was then modified with catechol, an aromatic molecule also found in the side chain of DOPA and presumed to be one of the major adhesion compound of the MAPs. Catechol can perform reversible binding, by coordination to metal oxides, and also irreversible binding, with polymers and it is known to interact with various substrates.

With three different functions of such a polymer (PEG, lysine and catechol) and the importance of screening many different assembly parameters (concentration, adsorption time, buffer, temperature), the matrix of experiments to be conducted becomes exceedingly large. There was thus a need to first develop a surface modification device (termed SuMo device), developed for conducting 70 independent and parallel experiments (different polymer types, different assembly conditions and tests of non-fouling properties) and utilizing low volumes of polymer solution (20 μ L). The device was designed and validated with PLL-*g*-PEG and fluorescently labeled fibrinogen (FITC-Fbg). The SuMo device is compatible with different substrate types and allows direct readout with a fluorescence scanner (when using labeled polymers or proteins) as well as with ellipsometry in a label-free manner.

In the second part of the project, two polymer architectures of PLL-*g*-PEG ($M_{r,PEG} = 2\ 000$, PEG grafting density of $d_{PEG}=0.29$ and $M_{r,PEG}=5\ 000$, $d_{PEG}=0.27$) were functionalized by linking catechols (3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DHPAA)) to the lysine side chains resulting in two sets of six polymers each, containing varying grafting densities of DHPAA (d_{DHPAA}).

The self-assembly of all PLL-*g*-(DHPAA; PEG) copolymers from aqueous solution was tested on three substrates: titanium oxide, silicon oxide and gold, and with variation of the assembly parameters: temperature and ionic strength of the assembly solution and assembly time. All adsorption experiments were performed with the SuMo device. Assembly of the polymer depended strongly on the value of d_{DHPAA} . Polymers with a large d_{DHPAA} range adsorbed on TiO_2 and were found to result in surfaces that resisted protein (fibrinogen) adsorption. In contrast, on SiO_2 and gold surfaces, only polymers with a specific, narrow range of DHPAA adsorbed in sufficient density to protect the surface against non-specific protein adsorption. This is most likely a consequence of lower interaction strength of the DHPAA with these two materials when compared to TiO_2 . Higher temperature of the assembly solution (50 °C instead of room temperature) and lower ionic strength (1 mM instead of 100 mM) resulted in thicker adlayers (higher coverage) and improved non-fouling properties. Polymer adsorption kinetics were found to be fast; saturation coverage was reached within 30 min.

A drawback of the PLL-*g*-PEG coating is the purely electrostatic nature of adhesion. This copolymer desorbs at low and high pH, and at high ionic strength as a consequence of screening of the electrostatic interaction. In strong contrast, the PLL-*g*-(DHPAA; PEG) copolymers were stable when exposed to solutions of high (5 M NaCl) ionic strength and preserved their non-fouling as judged by ellipsometry (film thickness) and fluorescent assays. Consistent with these findings, the surface-assembled DHPAA-functionalized polymers, but not the control PLL-*g*-

PEG, resisted fibrinogen adsorption. Additionally, the polymer-coated surfaces were incubated with cyanobacteria *Lyngbya sp.* EAWAG 140 and prevented attachment and colonization for up to 100 days

In conclusion, the novel polymer class characterized by both, multiple cationic sites and multiple catechol binding moieties proved to provide confluent monolayers of excellent stability on metal oxide surfaces. The concept of the dual (electrostatic/coordinative) binding approach is an attractive one: the electrostatic interaction of the polycationic copolymer with oppositely charged surfaces favors a fast assembly and controlled interfacial pre-organization thanks to long-range electrostatic forces (particularly at low ionic strength and higher temperature). In a second step, the catechols, already organized at close distance to the substrate, can efficiently engage in a coordinative, strong and site-specific binding to the surface metal cations. These polymeric adlayers have a substantially better long-term stability in demanding environments such as in high salt solutions, and probably also at lower and higher pH, when compared to the PLL-*g*-PEG system that binds exclusively through charge interactions.

The novel polymer type is expected to be compatible with a larger range of metal oxides that coordinate to catechols, in particular transition and non-transition metals and metal oxides with oxidation state +2 or higher.

Zusammenfassung

Die Natur hat raffinierte Strategien entwickelt, um unter verschiedensten Voraussetzungen mit Oberflächen zu interagieren. Biofouling, bedeutet die meist unspezifische Adsorption von biologischen Molekülen und Organismen (Proteinen, Bakterien, Zellen und höhere Organismen) und hat einen vorwiegend negativen Einfluss auf die Funktion oder Leistung der befallenen Bauteile, wie zum Beispiel Schiffskonstruktionen, Heizelemente, Filtersysteme oder medizinische Geräte und Hilfsmittel. Der breite Einflussbereich erklärt das grosse Interesse, Biofouling mit einer geeigneten Beschichtung effizient zu unterdrücken. Damit eine solche Beschichtung in ihrer späteren Anwendung effektiv vor Biofouling schützen kann, muss sie sehr widerstandsfähig und stabil sein, im Idealfall über die gesamte Lebensdauer des Bauteils hinweg. Folglich sind sowohl eine starke Interaktion zwischen Oberfläche und Beschichtung, als auch die Stabilität einer solchen Bindung in unterschiedlichen Milieus (wässrige Systeme mit verschiedenen Ionenkonzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten) wichtige Voraussetzungen für eine gute Haftung. Solch eine ideale Haftung unter diesen Bedingungen wird gerade von „Fouling“ Organismen hervorragend angewendet. Aus diesem Grund ist es interessant, gleiche oder ähnliche Bindungskonzepte wie die, die von „Fouling“ Organismen verwendet werden, für eine konkurrenzfähige synthetische Beschichtung aufzugreifen.

Natürliche Klebstoffe oder Adhäsions-Mittel bestehen vorwiegend aus einem ausgeklügeltem Proteincocktail, der die Haftung optimieren soll. So zum Beispiel erfolgt die Bindung von Muscheln über die Seitenketten von verschiedenen Aminosäuren. Diese werden oft in einem zweiten Schritt zu oberflächen-aktiven Seitenketten modifiziert, wie zum Beispiel bei DOPA, Phosphoserin, Hydroxyprolin und Hydroxyarginin, um die Haftung weiter zu verbessern. Solche Klebstoffe können an unterschiedlichste Oberflächen binden, angefangen von Metallen, Keramiken, bis zu Polymeren. Solche universellen Bindungen sind speziell durch die Kombination von verschiedenen Bindungsgruppen und der Präsenz von mehreren Bindungsstellen möglich. Deswegen sollen in dieser Arbeit Kombinationen von elektrostatisch

und koordinativ-bindenden Gruppen genauer untersucht werden. Als Modellsystem wurde Poly(L-lysin)-*pfropf*-poly(ethylenglykol) (PLL-*g*-PEG) verwendet. Es ist ein bekanntes und ausführlich charakterisiertes Pfropfcopolymer, das schon erfolgreich als Antifouling-Beschichtung eingesetzt wird. PLL-*g*-PEG besteht aus einem Poly(L-lysin)-Hauptstrang, der bei neutralem pH mehrfach positiv geladen ist und somit elektrostatisch mit mehreren Bindungsstellen auf negativ geladenen Oberflächen adsorbiert. Weiterhin sind mehrere, lange Poly(ethylenglykol)-Ketten über eine Amidbindung an die Amin-gruppen des Lysins gebunden. PLL-*g*-PEG kann sich spontan auf der Oberfläche ausrichten, wobei der PLL-Hauptstrang möglichst nahe an der Oberfläche orientiert und so eine Umlagerung der PEG-Ketten in die Lösung forciert. Ab einer gewissen Moleküldichte müssen die PEG-Ketten sich weiter ausstrecken und formieren sich ähnlich wie die Borsten einer Bürste (Brush regime).

Dieses System wurde mit Brenzcatechin erweitert, welches auch in der Seitenkette von L-DOPA vorkommt und vermutlich eine der wichtigsten Bindungsgruppe der Adhäsions-Proteine von Muscheln ist. Brenzcatechin kann reversible Bindungen mit Metalloxiden und irreversible Bindungen mit Polymeren eingehen. Die unterschiedlichen Kombinationen der drei Molekülteile PEG, PLL und Brenzcatechin, sowie die zusätzlichen Parameter des Beschichtungsprozesses, führen schnell zu vielen, Zeit- und Material-intensiven Experimenten.

Deshalb sollte zuerst eine geeignete Plattform für den effizienten Test von diversen Oberflächenmodifikationen entwickelt werden. Das beinhaltet ein System, mit dem mehrere Experimente gleichzeitig durchgeführt werden können und nicht nur Material und Zeit sparend ist, sondern auch die Beschichtungen unter gleichen Voraussetzungen prüft und so Handhabungsfehler limitiert. Die entwickelte Plattform wurde einfach gehalten, um einen möglichst breiten Anwendungsbereich abzudecken. Mit dem neuen System werden auf verschiedenen Oberflächen jeweils siebenzig Inkubationsgefäße geformt, in denen ebenso viele Beschichtungsexperimente durchgeführt werden können. Die Charakterisierung kann mit Ellipsometrie, Fluoreszenz oder Röntgenstrahl-Photoelektronen Spektroskopie erfolgen.

Im zweiten Projektteil wurden zwei Sets mit jeweils sechs Poly(L-lysin)-*pfropf*-(3,4-Dihydroxyphenyl)essigsäure, Poly(ethylenglykol) (PLL-*g*-(DHPAA; PEG)) Copolymeren synthetisiert. Die zwei Sets unterscheiden sich in der PEG-Kettenlänge, ($M_{rPEG} = 2000$ & 5000) und deren *pfropf*-Dichte ($d_{PEG} = 0.29$ & 0.27). Die sechs Polymere pro Set enthalten ausserdem unterschiedliche Konzentrationen von DHPAA und somit verschiedene DHPAA *pfropf*-Dichten (d_{DHPAA}).

Die Bildung der monomolekularen Polymer-Schicht wurde auf drei verschiedenen Substraten gemessen: Titanoxid, Siliziumoxid und Gold. Die Adsorption der Polymere war stark abhängig von den Substraten, der DHPAA *pfropf*-Dichte, der Ionenstärke und der Temperatur. Auf allen drei Substraten führte eine tiefe DHPAA *pfropf*-Dichte und eine erhöhte Temperatur (>50 °C) zu dickeren Schichten und umgekehrt. Der Einfluss der Ionenstärke ist abhängig vom Substrat. Die Antifouling-Charakteristik der adsorbierten PEG-Ketten wurde mit fluoreszenzmarkiertem

Fibrinogen getestet, wobei die adsorbierte Menge entweder mit einem "Microarray-Scanner" oder mit Ellipsometrie gemessen werden konnte. Um den Einfluss der elektrostatischen und koordinativen Bindung zu untersuchen, wurden einige Polymerbeschichtungen in gesättigter Kochsalz Lösung inkubiert. Die Ionen schirmen die Ladungen auf der Oberfläche und am PLL ab und reduzieren so die elektrostatischen Wechselwirkungen. Die rein elektrostatisch gebundene PLL-g-PEG Beschichtung wurde somit stark reduziert. Aber schon ein geringer Anteil DHPAA verbesserte die Stabilität erheblich.

Abschliessend kann man sagen, dass die neue Polymerklasse, mit jeweils mehreren Kationen- und Brenzcatechinbindungsstellen, zu konfluenten, monomolekularen Beschichtungen, mit einer exzellenten Stabilität auf Metalloxiden führten.

Dasduale Bindungskonzept (elektrostatisch/koordinativ) kombiniert die zwei Adsorptionssysteme optimal, wobei die weitreichenden, elektrostatischen Kräfte zu einer schnellen, elektrostatischen Adsorption und einer kontrollierten Organisation auf der Oberfläche führen. In einem zweiten Schritt kommen die Brenzcatechine dank dem positiven PLL-Hauptstrang nahe genug zur Oberfläche und können so eine koordinative Bindung eingehen. Diese Polymere sind unter schwierigen Bedingungen, wie zum Beispiel in konzentrierter Salzlösung und wahrscheinlich auch bei verschiedenen pH-Werten, viel beständiger.

Es wird erwartet, dass das neue Polymersystem auch auf anderen Metalloxidoberflächen, speziell von Metallen und Übergangsmetallen mit einer Oxidationsstufe von +2, angewendet werden kann.