

Design and application of surface-chemical gradients for biological investigations

Doctoral Thesis

Author(s):

Pei, Jia

Publication date:

2012

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009771305>

Rights / license:

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

DISS ETH NO. 20248

Design and Application of Surface-Chemical Gradients for Biological Investigations

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Jia Pei

Master of Sciences, Nanjing University
Born on November 5, 1982
Citizen of China

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Nicholas D. Spencer, examiner
Prof. Dr. Jan Genzer, co-examiner
Dr. Katharina Maniura, co-examiner

2012

Surface gradients constitute an advantageous platform, since they allow high-throughput and cost-effective experiments involving the exploration of a large variety of surface parameters for materials science, tribology and especially in biological studies (e.g. protein adsorption and cell response). This thesis is split into two separate projects related to the preparation and application of spatially controlled surface chemistry.

- For the first project, PEG-surface-density gradients were employed as screening tools for a systematic study of the influence of PEG chain density/conformation on protein adsorption, cell and bacterial adhesion behavior, as well as the correlation between them. These issues are central towards developing coatings for implants and related biomedical applications.

Briefly, gradients with a linear change in coverage of the polycationic polymer PLL(20)-g(3.5)-PEG(2) were prepared on titanium dioxide surfaces by a controlled dipping process, and characterized by variable-angle spectroscopic ellipsometry (VASE) and fluorescence microscopy (FM). To investigate the interactions of proteins, cells and bacteria as a function of PEG densities, a series of adsorption, adhesion and proliferation assays were carried out on PLL-g-PEG gradients.

For protein adsorption tests, the adsorption behavior of single proteins generally correlated with semi-empirical geometric models, illustrating the effect of the PEG-chain surface distribution on the inhibition of protein adsorption. Distinct differences could be observed between individual adsorbing proteins, attributable to their mode of surface attachment. The single and competitive adsorption of protein solutions containing albumin and fibrinogen was then investigated by fluorescence microscopy, indicating a larger amount of fibrinogen adsorption compared with albumin adsorption (in minutes to hours) along the entire PLL-g-PEG gradient samples.

For eukaryotic cell tests, to further elucidate the underlying mechanism of cell adhesion and spreading as a function of PEG coverage and the potential involvement of integrins, short-term cell-adhesion assays were carried out with human foreskin fibroblasts (hFF) and rat calvarial osteoblasts (RCO). Long-term proliferation and viability assays were also studied with hFF and RCO, and with different backfilling proteins (fibrinogen, albumin, fibronectin, serum) on PEG gradients.

For bacterial adhesion studies, similar assay conditions were applied. In physiological buffer, the adhesion behavior of both *E.coli* and *S.aureus* is similar to that of single-protein adsorption. Backfilling of proteins on PEG gradients decreased the initial bacterial

adhesion to different extents, depending on the type and amount of proteins, and also the strains of bacteria. The results are quite different from those of hFF and RCO.

The use of surface-gradient samples demonstrated the importance of PEG conformation, the amount of exposed titanium dioxide surface area (and its distribution), and the structure and chemistry of the proteins involved for protein adsorption. Correspondingly the influence of these factors on eukaryotic cell and bacterial adhesion could be directly observed. Insights were gained into the roles of both nonspecific binding and specific integrin binding in eukaryotic cell adhesion, and the differential adhesion between eukaryotic cell and bacteria possibly due to the physical (and bio)-chemical properties of the bacterial cell wall and eukaryotic cell membrane.

- The objective of the second project was to develop a reproducible preparation method for ultraflat, patterned surfaces of composite metals, and subsequently to combine current gradient techniques to ultimately produce more versatile surface (bio) chemical gradients platforms with a higher throughput than presently achieved.

Ti/Au patterned ultraflat surfaces were developed by a modified template stripping method. The generated sample surface can be as large as several square centimeters, was free from residues from the silicon-based template (silicon wafer in our case), was robust enough to tolerate common solvents such as water and ethanol and many experimental conditions, and worked well with different area ratios of Ti vs. Au. Briefly, silicon wafers were used as ultraflat templates. A standard photolithography process followed by metal deposition was applied to generate patterns of different metals. Additionally, wafers were subjected to silanization to reduce the adhesion between Ti and silicon surfaces. After gluing glass slides as supports, the ultraflat surfaces of Ti/Au pattern were achieved by mechanical stripping from silicon wafer templates. The generated sample surfaces were characterized by atomic force microscopy (AFM), time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

Furthermore, the Ti and Au regions on the sample surfaces were independently chemically functionalized employing catechol-and thiol-based SAMs (self-assembled monolayers) systems, generating patterns of chemical differences without the interference of surface roughness. By incorporation of a gradient fabrication technique developed previously in our lab, the generated patterned ultraflat surfaces can be further modified as surface-chemical gradients. The characterization of chemical modification was performed by means of ToF-SIMS, XPS, microdroplet condensation and AFM.

Finally, preliminary applications of the generated samples were exhibited, including moving droplets on surface-wettability gradients in channels, and controlled localization of cell adhesion on the patterned surfaces.

Oberflächengradienten bieten gegenüber homogenen Oberflächen Vorteile, weil damit kostengünstige Hochdurchsatzexperimente durchgeführt werden können. In der Materialwissenschaft, der Tribologie und vor allem der Biologie (z.B. was die Proteinadsorption und die zelluläre Reaktion betrifft) können so eine grosse Anzahl Oberflächenparameter gleichzeitig untersucht werden. Diese Arbeit beinhaltet zwei Projekte, welche sich mit der Herstellung und Anwendung von Oberflächen mit räumlich kontrollierter Oberflächenchemie beschäftigen.

- Im ersten Projekt wurde mit Hilfe von PEG-Oberflächengradienten der Einfluss von Dichte und Konformation der PEG-Ketten auf die Proteinadsorption und die Adhäsion von Zellen und Bakterien, sowie deren Korrelation untersucht. Diese Fragestellungen sind von zentraler Bedeutung, wenn Beschichtungen für Implantate oder ähnliche biomedizinische Anwendungen entwickelt werden sollen.

Mit Hilfe eines kontrollierten Eintauchprozesses wurden Gradienten hergestellt, welche eine linear zunehmende Bedeckung mit dem polykationischen Polymer PLL(20)-g(3.5)-PEG(2) auf Titanoxid-Oberflächen aufweisen. Die Charakterisierung erfolgte durch Ellipsometrie (variable-angle spectroscopic ellipsometry, VASE) und Fluoreszenzmikroskopie. Um die Interaktion von Proteinen, Zellen und Bakterien in Funktion der PEG Dichte zu untersuchen, wurde eine Reihe von Adsorptions-, Adhäsions- und Proliferationsexperimenten durchgeführt.

Für die Proteinadsorptionsexperimente korrelierte das Adsorptionsverhalten einzelner Proteine generell mit halb-empirischen geometrischen Modellen, was der Verteilung der PEG-Ketten auf der Oberfläche zuzuschreiben ist. Es wurden deutliche Unterschiede zwischen einzelnen adsorbierten Proteinen beobachtet, welche auf deren Bindungsarten zurückgeführt werden können. In der Folge wurden mit Fluoreszenzmikroskopie die individuelle und die kompetitive Adsorption von Albumin und Fibrinogen aus gemischten Lösungen untersucht. Diese Experimente zeigten, dass entlang des kompletten PLL-g-PEG Gradienten eine grössere Menge Fibrinogen als Albumin adsorbiert (in Minuten bis Stunden).

Kurzzeit-Zelladhäsions-Experimente mit Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, hFF) und Osteoblasten (rat calvarial osteoblasts, RCO) wurden durchgeführt um aufzuklären, welcher Mechanismus der Adhäsion und der Ausbreitung der Zellen in Funktion der PEG Dichte zu Grunde liegt. Ausserdem wurde untersucht, in welcher Art Integrine möglicherweise beteiligt sind. Zusätzlich wurden auch Langzeit-Proliferations- und Viabilitätsexperimente mit hFF und RCO durchgeführt. Dazu wurden die PEG-

Gradienten mit verschiedenen Proteinen (Fibrinogen, Albumin, Fibronectin oder Serum) rückgefüllt und danach untersucht.

Für die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion wurden ähnliche Bedingungen verwendet. In physiologischer Pufferlösung ist das Adhäsionsverhalten von *E.coli* und *S.aureus* ähnlich wie das Adsorptionsverhalten einzelner Proteine. Wenn die PEG Gradienten mit unterschiedlichen Proteinen rückgefüllt werden, nimmt die Bakterienadhäsion im Vergleich zu vorher ab. Die Abnahme hängt vom Typ und der Menge der Proteine wie auch dem Bakterienstamm ab. Diese Resultate unterscheiden sich von den Resultaten, welche für eukaryotische Zellen (hFF und RCO) gefunden wurden.

Die Verwendung von Oberflächengradienten hat gezeigt, wie wichtig die PEG Konformation, die Grösse (und Verteilung) der exponierten Titandioxidfläche, und die Struktur und Chemie der involvierten Proteine für die Proteinadsorption sind. Dementsprechend konnte der Einfluss dieser Faktoren auf die Adhäsion von eukaryotischen Zellen und Bakterien direkt beobachtet werden. Diese Experimente haben es erlaubt, einen Einblick in die Rolle von unspezifischen, aber auch spezifischen (Integrin) Bindungen bei der Adhäsion von eukaryotischen Zellen zu erhalten. Auch kann das unterschiedliche Adhäsionsverhalten von eukaryotischen Zellen und Bakterien durch die unterschiedlichen physikalischen und (bio)chemischen Eigenschaften der Bakterien-Zellwand und der eukaryotischen Zellmembran erklärt werden.

- Das Ziel des zweiten Projekts war es, eine reproduzierbare Methode zur Herstellung von ultraflachen, gemusterten Oberflächen von Verbundmetallen zu entwickeln, und anschliessend die gängigen Techniken zur Herstellung von Gradienten so zu kombinieren, dass eine noch vielseitigere (bio)chemische Plattform mit einem noch höheren Durchsatz entsteht.

Um mit Ti/Au gemusterte ultraflache Oberflächen herzustellen, wurde eine bereits bekannte Methode, genannt "template stripping", modifiziert. Die so hergestellte Oberfläche war bis zu mehreren Quadratzentimeter gross, war frei von Rückständen der Silizium-basierten Matrize, war widerstandsfähig gegenüber gewöhnlichen Lösungsmitteln wie Wasser oder Ethanol und anderen experimentellen Bedingungen, und funktionierte auch mit unterschiedlichem Ti/Au Flächenverhältnis. Für die Herstellung wurden Siliziumwafer als ultraflache Matrizen verwendet. Diese Wafer wurden silanisiert, um die Adhäsion zwischen der Beschichtung und der Silizium-Oberfläche zu verringern. Dann wurde ein Standardprozess aus der Photolithographie, gefolgt von einer Beschichtung mit Metallen dazu verwendet, um unterschiedliche Metallmuster herzustellen. Nachdem man ein Objektträger als Haltevorrichtung angeklebt hatte, wurde die mit Ti/Au gemusterte, ultraflache Oberfläche durch mechanisches Abziehen ("stripping") freigelegt. Diese Proben wurden mit Rasterkraftmikroskopie (AFM),

Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) und Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) charakterisiert.

Des Weiteren wurden die Au und Ti Bereiche der Probenoberfläche unabhängig voneinander mit Hilfe von Thiol-, respektive Katechol-basierten SAMs-Systemen chemisch funktionalisiert. So konnte ein chemisches Muster hergestellt werden, ohne dass die Oberflächenrauigkeit verändert wurde. Mit Hilfe einer früher in unserem Labor entwickelten Methode zur Herstellung von Gradienten konnten die gemusterten, ultraflachen Oberflächen weiter zu chemischen Oberflächengradienten entwickelt werden. Die Charakterisierung der chemischen Modifikation erfolgt mit ToF-SIMS, XPS, der Kondensation von Mikrotropfen ("microdroplet condensation") und AFM.

Zum Schluss wurden erste Anwendungen der hergestellten Proben gezeigt, wozu in Kanälen und auf Benetzbarkeitsgradienten "wandernde" Tropfen, oder die kontrollierte Eingrenzung der Zelladhäsion auf gemusterten Oberflächen gehören.