

Diss. ETH No. 14956

Ultrathin Organic Films as Biointerfaces: A Chemical Force Spectroscopy Study

A Dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

CHRISTIAN DICKE
Dipl. Phys.
Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany
born September 30th, 1973
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. N. D. Spencer, examiner
Prof. Dr. L. Gauckler, co-examiner

Zürich, 2002

Abstract

This thesis is concerned with the resistance to protein adsorption of synthetic biomaterial surfaces. Today, biomaterials play a vital role in everyday life and it is widely perceived that significant advances in their development and use will become the dominant focus of materials research in the near future.

One promising class of a great variety of potential technological applications is the specific recognition of proteins by biosensors. Substantial molecular understanding of the driving forces relevant for the resistance to non-specific protein adsorption is of utmost importance for the tailoring of suitable surface properties. Atomic force microscopy (AFM), employing chemically modified probes, represents a highly suitable tool in order to gain information on the underlying mechanism. On a structural level, from a reductionist point of view, proteins can be thought of as consisting of hydrophobic and charged patches. Therefore, hydrophobically and electrostatically functionalised AFM probes can be utilised to mimic the different local structures of proteins and thus to study separately the different contributions of these local structures to the overall interaction. Of particular interest is the fact that the nanometer-scale contact between probe and surface resembles the typical dimensions of the real contact area between proteins and biomaterials.

Poly(ethylene glycol) (PEG) modified surfaces have been recognised for their outstanding protein-resistant properties because of the high conformational flexibility of their solvated chains ('steric repulsion'). More recently, self-assembled monolayers (SAMs) of oligo(ethylene glycol) (OEG)-containing alkanethiols adsorbed on Au have been found to also resist the adsorption of proteins. Because the conformational freedom of the EG strands in the densely packed SAM is highly restricted, another mechanism must account for the remarkable protein-repelling properties of these self-assembled structures.

The goal of this work is to elucidate the driving forces rendering these self-assembled structures protein-resistant and thus making them so attractive for potential biotechnological applications.

Force-versus-distance measurements have been performed in aqueous electrolyte solutions while varying experimental parameters such as ionic strength, pH-value and type of dissolved ions in order to study the contributing factors to the interaction at the SAM/water interface in detail. The observed interaction force appears to be electrostatically promoted. In fact, an effective negative surface charge density can be ascribed to the SAM/water interface. Additional force measurements employing chemically functionalised (hydrophobic and charged) probes confirm the presence of a negative surface charge. The observed independence of the type of dissolved ions further suggests that the charges are most likely due to the adsorption of hydroxyl ions from solution. A model comprising a thin layer of interfacial water that is associated to the organic film via strong hydrogen bonds is proposed to support and stabilise the adsorption of hydroxyl ions.

The influence of the number of EG units terminating the synthetic organic surface has also been studied in depth in order to test for a transition in the interaction from the well-characterised polymer to the short-chain oligomers. In fact, force measurements performed on partially covered polymer films show an interaction behaviour that is similar to that of the SAM films. From this result, a conformation of the PEG chains in a two-dimensional layer similar to that of the EG tail at the top of the SAM surface is stressed.

In another approach to investigating the nature of the resistance to protein adsorption of these films in more detail, the hydrophobic character of OEG-containing SAMs has been altered by addition of terminal alkyl groups. The derivatised tri- and hexa(ethylene glycol)-containing SAMs have been found to adsorb proteins if a critical length of the hydrophobic alkyl tail is exceeded. Therefore, a simple model taking into account the charges established at the SAM/water interface as well as the degree of hydrophobicity of the SAM is proposed in order to describe the observed interaction forces in more detail.

Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich mit der Resistenz von synthetischen Oberflächen gegen Proteinadsorption. Heutzutage spielen Biomaterialien eine entscheidende Rolle im täglichen Leben, und es wird allgemein anerkannt, dass sich der Fokus zukünftiger Forschung im Bereich Materialwissenschaften auf signifikante Fortschritte in ihrer Weiterentwicklung konzentrieren wird.

Eine besonders vielversprechende Klasse aus einer Vielzahl von möglichen technologischen Anwendungen stellt die spezifische Erkennung von Proteinen mittels Biosensoren dar. Hierzu ist ein grundsätzliches Verständnis der für die Proteinresistenz relevanten Kräfte auf molekularem Level von grösster Wichtigkeit, um Materialoberflächen mit geeigneten Eigenschaften zu entwickeln. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) ist es durch den spezifischen Einsatz chemisch modifizierter Sonden möglich, Informationen über den zugrunde liegenden Mechanismus zu erlangen. Proteine können stark vereinfacht durch eine aus hydrophoben und geladenen Anteilen zusammengesetzte Struktur beschrieben werden. Aus diesem Grund können hydrophob beziehungsweise elektrostatisch funktionalisierte AFM-Sonden benutzt werden, um die unterschiedlichen lokalen Strukturen von Proteinen zu simulieren, und somit die verschiedenen Beiträge dieser lokalen Strukturen zur Gesamtwechselwirkung zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist dabei die Tatsache, dass die Kontaktfläche zwischen Sonde und Probenoberfläche auf Nanometer-Skala sehr gut mit der typischen Grössenordnung der realen Kontaktfläche zwischen Proteinen und Biomaterialien übereinstimmt.

Materialien, deren Oberflächeneigenschaften durch die Adsorption von Poly(Ethylen Glykol) (PEG) modifiziert wurden, sind bereits seit längerer Zeit für ihre hervorragende Proteinresistenz bekannt. Diese resultiert aus der hohen Konformationsflexibilität der solvatisierten Polymerketten, welche allgemein in dem Begriff 'sterische Repulsion' zusammengefasst wird. In der letzten Zeit konnten zudem selbst-organisierende Monolagen

(Self-Assembled Monolayers, SAMs) basierend auf Alkanthiolen mit funktionellen Endgruppen bestehend aus Oligo(Ethylen Glykol) (OEG) mit ähnlichen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Proteinadsorption nachgewiesen werden. Doch aufgrund der Einschränkung der Konformationsflexibilität der einzelnen EG-Einheiten in dem dicht gepackten Film muss ein anderer Mechanismus für die ausgezeichneten Protein-abweisenden Fähigkeiten solcher SAMs verantwortlich sein.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Kraft, welche diese selbst-organisierenden Strukturen proteinresistent und damit hochinteressant für biotechnologische Anwendungen macht, zu identifizieren.

Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit Kraft-Distanz Messungen in wässrigen Elektrolytlösungen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie der Salzkonzentration, dem pH-Wert und der Art der gelösten Ionen durchgeführt, um die verschiedenen zu der Wechselwirkung an der Film/Wasser Grenzfläche beitragenden Kräfte zu untersuchen. Die dabei beobachtete Kraft scheint grundsätzlich von elektrostatischer Natur zu sein. Zusätzliche Kraft-Distanz Messungen mit chemisch modifizierten (hydrophoben bzw. geladenen) Sonden bestätigen in diesem Zusammenhang das Vorhandensein einer negativen Oberflächenladungsdichte. Die beobachtete Unabhängigkeit von der Art der gelösten Ionen unterstützt weiter diesen Eindruck und lässt vermuten, dass die Ladungen mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Adsorption von Hydroxyl-Ionen aus der Elektrolytlösung stammen. Dazu wird ein Modell entwickelt, welches diese Ionen-Adsorption auf der Basis einer dünnen Wasserschicht, die sich über starke Wasserstoff-Brücken Bindungen an der SAM/Wasser Grenzfläche etabliert, beschreibt.

Darüber hinaus wird der Einfluss der Anzahl der EG-Einheiten, welche den synthetisch organischen Film kennzeichnen, im Detail untersucht, um einen möglichen Übergang von dem typischen und sehr gut verstandenen Verhalten des Polymers zu dem Oligomer zu finden. Tatsächlich weisen Kraft-Distanz Messungen an Polymer-Filmen mit unvollständiger Bedeckung ein Wechselwirkungsverhalten auf, welches dem der Oligomer-Filme sehr ähnlich ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine Modellvorstellung entwickelt, nach der die Polymer-Ketten auf der Goldoberfläche eine Konformation in einem zweidimensionalen Netzwerk ähnlich zu dem der EG-Gruppen am Kopf der SAM-Filme annehmen.

In einer weiteren Versuchsreihe, um das Wesen der Resistenz solch synthetischer organischer Filme gegen Proteinadsorption genauer zu ergründen, ist der hydrophobe Charakter der OEG-SAMs durch Zugabe weiterer Alkylgruppen verändert worden. Es wird nachgewiesen, dass Filme, bestehend aus derivatisierten Tri- und Hexa(Ethylen Glykol) SAMs, in Abhängigkeit von einer kritischen Länge der hydrophoben Endgruppe ihre Resistenz gegen Proteinadsorption verlieren. Daher wird ein einfaches Modell vorgeschlagen, welches sowohl die an der SAM/Wasser Grenzschicht ausgebildeten Ladungen als auch den Grad der Hydrophobizität des organischen Filmes berücksichtigt, um die beobachteten Wechselwirkungskräfte im Detail zu beschreiben.