

SURFACES FOR FUNCTIONAL AND PATTERNED IMMOBILIZATION OF PROTEINS

Von der Fakultät für Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

PETRA STEGMAIER

aus Mainz

Hauptberichter:	Prof. Dr. Herwig Brunner
Mitberichter:	Prof. Dr. Christian G. Bochet
Tag der mündlichen Prüfung:	11. Dezember 2007

Max-Planck-Institut für Metallforschung
und
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik IGVT der Universität Stuttgart

Stuttgart, Oktober 2007

Petra Stegmaier

SURFACES FOR FUNCTIONAL AND PATTERNED IMMOBILIZATION OF PROTEINS

Max Planck Institute for Metals Research and
Institute for Interfacial Engineering IGVT, University of Stuttgart, 2007
231 pages, 99 figures, 5 tables

Abstract

Functional and patterned immobilization of proteins onto solid substrates is an important issue in biotechnological processes involving protein purification or detection, or in the study of protein-protein interactions. This thesis presents a new strategy to functional immobilize proteins in selected microregions of a substrate based on photosensitive surface layers containing caged ligands and protein repellent EG chains. Special effort has been paid to the development of surface compositions and architectures that retain protein function in the surface mobilized state.

In the first part of the thesis, branched silanes containing protein repellent OEG arms terminated with one inert -OMe group and one photocleavable, caged amino functionality were synthesized. Silica surfaces were modified with these molecules and the properties of the surface layers were characterized. According to the ellipsometric data, submonolayers with amino surface densities lower than in SAMs of thiols were obtained after optimization of the conditions for the surface reaction. The photolytic properties of the surfaces were analyzed. Irradiation of the surface at 355 nm cleaved the photoremovable cage and liberated the amino functionalities. These were then used to immobilize protein targets from solution after appropriate biofunctionalization. Reflectance Interference Spectroscopy (RIFS) was used to monitor and quantify protein binding. Low non-specific adsorption of proteins onto the surfaces as a consequence of the presence of EG chains was proven. Binding efficiencies were shown to be better than binding onto surface layers containing linear and shorter EG chains. For surface layers with similar architectures (either linear or branched) binding results correlate with the surface density of ligands.

In the second part, silanes possessing different photocleavable groups able to be cleaved individually by using light of different wavelengths (NVoc and DEACM) were synthesized. UV measurements revealed that DEACM can be easily cleaved off upon UV irradiation at 412 nm, without damaging the NVoc group. The NVoc group can be removed at 345 nm. Surface layers containing a mixture of both groups were prepared and used for coupling two different fluorescent dyes to selected microregions of a surface. The expected fluorescence pattern was observed, confirming the possibility of generating complex chemical patterns by using different cages that can be independently addressed.

In a last part of the thesis, magnetite nanoparticles were modified with mixed silane layers containing amino and OH/ OMe terminal groups in different molar ratios and connected to the surface by EG spacers with different lengths. The influence of the amine density and accessibility on the protein loading capacity of the nanoparticles has been analyzed. The optimum silane surface composition for maximum protein loading was identified.

Petra Stegmaier

**OBERFLÄCHEN FÜR DIE FUNKTIONALE UND ORTSSELEKTIVE
IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN**

Max-Planck-Institute für Metallforschung und
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik IGVT, Universität Stuttgart, 2007
231 Seiten, 99 Abbildungen, 5 Tabellen

Kurzzusammenfassung

Die funktionale und ortsselektive Immobilisierung von Proteinen auf festen Oberflächen ist ein wichtiger Aspekt in biotechnologischen Prozessen, der bei der Reinigung von Proteinen, ihrem Nachweis und der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Rolle spielt. In der vorliegenden Dissertation wurde eine neue Strategie zur funktionalen Immobilisierung von Proteinen in definierten Mikroregionen auf Substraten entwickelt. Diese Methode basiert auf der Herstellung von photosensitiven Oberflächenschichten, in denen geschützte Funktionalitäten und proteinabweisende Ethylenglykol (EG) Ketten eingebaut sind. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Zusammensetzung und Gestaltung der Oberflächenschicht gelegt, um die Funktion des Proteins auch nach der Anbindung an die Oberfläche zu bewahren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Silane synthetisiert, die eine aus protein-abweisenden TEG Armen aufgebaute verzweigte Struktur aufweisen, welche eine inerte Methoxygruppe an einem Ende und eine durch eine photolabile NVoc-Gruppe geschützte Aminofunktionalität am anderen Ende trägt. Siliziumdioxid-Oberflächen wurden mit diesen Silanen modifiziert und die erhaltenen Oberflächenschichten charakterisiert. Auf modifizierten Quarz-Substraten wurde die Abspaltung der photolabilen NVoc-Schutzgruppe durch Bestrahlung im Absorptionsmaximum (bei 355 nm) untersucht. Die bei der Photolyse freigesetzten Aminogruppen wurden nach geeigneter Biofunktionalisierung in der Immobilisierung von Proteinen aus Lösungen getestet. Die selektive Immobilisierung wurde mithilfe von reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIFS) verfolgt und quantifiziert. Aufgrund der vorhandenen OEG Ketten war die unspezifische Adsorption vernachlässigbar klein. Schichten aus verzweigten Silanen wiesen eine höhere Bindungsfähigkeit als die aus linearen und kürzeren EG Ketten aufgebauten Schichten auf. Für Schichten ähnlicher Gestalt (sowohl von linearen als auch von verzweigten Silanen) konnte ein Zusammenhang zwischen Bindungsfähigkeit und der Dichte funktioneller Gruppen auf der Oberfläche gefunden werden.

In einem zweiten Teil wurden Silane mit zwei verschiedenen photosensitiven Gruppen (NVoc und DEACM) synthetisiert, die durch Bestrahlung bei unterschiedlicher Wellenlänge individuell abgespalten werden können. Spektroskopische Untersuchungen der Photolyse beider photolabilen Gruppen zeigten, dass DEACM durch Bestrahlung bei 412 nm fast vollständig abgespalten wird, während NVoc nur wenig beeinträchtigt wird. Eine Abspaltung von NVoc kann bei 345 nm erfolgen. Gemischte Schichten beider Silane wurden hergestellt und in einem zweistufigen Bestrahlungsprozeß nacheinander orts-selektiv entschützt und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekuppelt. Das erhaltene Fluoreszenz-Muster bestätigt die Möglichkeit, mit diesen beiden Schutzgruppen gezielt chemisch komplex strukturierte Oberflächen zu erzeugen.

Im dritten Teil der Arbeit wurden magnetische Nanopartikel durch Co-Adsorption von verschiedenen Amin- und OH/ OMe-terminierten Silanen mit unterschiedlich langen EG Armen modifiziert. Eine Untersuchung der funktionalen Immobilisierung von Proteinen an diese gemischten Schichten erfolgte im Hinblick auf den Einfluss der Amingruppendichte sowie der Zugänglichkeit dieser funktionellen Gruppen. Somit konnte eine optimale Oberflächenzusammensetzung mit maximaler Bindungsfähigkeit für Proteine ermittelt werden.

-
-
-

Index

Index	1
Introduction	4
Chapter 1 Background and Literature Review.....	7
1.1 Surfaces in biotechnology.....	7
1.1.1 Bioarrays	9
1.1.2 Magnetic nanoparticles for magnetic separation processes.....	10
1.2 Strategies for immobilization of proteins onto surfaces	12
1.3 Protein resistant surfaces	15
1.4 Biofunctionalization of silica surfaces.....	17
1.4.1 Surface properties of silica	17
1.4.2 Activation of silica surfaces with organosilanes	19
1.5 Photochemical methods for surface patterning.....	21
1.6 Surface patterns with caged coupling agents.....	22
Chapter 2 Characterization methods.....	24
2.1 Contact angle measurement.....	24
2.2 Ellipsometry.....	25
2.3 Reflectance Interference Spectroscopy.....	26

Chapter 3 Photoactive branched silanes for functional and patterned immobilization of proteins	28
3.1 Introduction	28
3.2 Objectives.....	30
3.3 Synthetic strategy	33
3.3.1 Considerations to molecular design.....	33
3.3.2 Proposed synthetic routes	38
Route I (via 3-Benzyloxy-1,2-propanediol).....	38
Route II (via solketal)	40
Route III (via epichlorhydrin).....	42
3.4 Experimental	45
3.5 Results	48
3.5.1 Synthesis.....	48
Route I	48
Route II.....	52
Route III.....	57
3.5.2 Surface modification and characterization	64
3.5.3 Photolytic experiments	67
3.5.4 Protein binding to functional surfaces	69
3.5.5 OND and protein patterns.....	72
3.5.6 Cell patterns.....	74
3.6 Discussion	81
Chapter 4 New Coumarin-4-ylmethyl protected silanes for wavelength-selective photoactivation.....	84
4.1 Introduction	84
4.2 Objectives and strategy	90
4.3 Experimental	91
4.4 Results	93

4.4.1	Synthesis.....	93
4.4.2	Properties of the surface layers	95
4.4.3	Photoactivation of the surface by irradiation: wavelength selective deprotection.....	99
4.4.4	Generating bi-functional patterned surfaces after two -step wavelength selective irradiation	104
4.5	Discussion.....	109
Chapter 5 Surface tailored magnetite nanoparticles for functional protein anchoring via mixed alkoxy silane layers		113
5.1	Introduction.....	113
5.2	Objectives	115
5.3	Experimental.....	116
5.4	Results and discussion	119
5.4.1	Synthesis of silanes	119
5.4.2	Surface modification	120
	Surface modification reaction.....	120
	Stability of the silane layer	121
	Surface density of amine groups in mixed layers	122
5.4.3	Surface charge dependent adsorption of polyanions (DNA) onto -NH ₂ modified nanoparticles	124
Summary and conclusions.....		132
Appendix (Experimental Part).....		134
Deutsche Zusammenfassung		202
References		212

-
-
-

Introduction

Solid supports modified with organic surface layers containing bioactive ligands are today well established tools in the biotechnology lab. Relevant examples are surface activated nanoparticles for isolation and detection of biomolecular species (eg. stationary phase in affinity chromatography or magnetic separation processes), or multidetection systems in array format (“microarrays”) for the investigation of biological interactions at the molecular level. The through-put of the separation process and the sensitivity and specificity of such detection systems strongly depend on the ability of the surface layer to permit natural biological interactions to occur in such a way that the results can be interpreted clearly and related to biology *in vivo*. Moreover, bioprocesses often involve the interplay of more than one molecular entity and, therefore, coexistence of different ligands on the surface may be required. In some cases the spatial localization of the immobilized species needs to be realized, or precise temporal control of the biomolecular interaction under investigation needs to be provided. This requires the development of surface layers whose bioactivity changes upon application of an external trigger.

The activity of a molecule can be inhibited by attaching a photoremovable protecting group to its reactive site. Subsequent light irradiation releases the cage and restores function. It has recently been demonstrated that different cages can be used to protect individual functionalities which can be then independently activated by using light of different wavelengths. When attached to bioactive ligands on a surface, such strategy

can be exploited to generate surfaces with triggerable affinity for more than one target. However, this requires the selection of cages with sensitivity to wavelengths above 320 nm, so that chromophores included in the biomolecular species do not interfere with the photoactivation process.

In order to achieve effective and stable binding of biomolecular targets, appropriate density and accessibility of the ligands at the surface need to be provided since crowding of receptors or hindered exposure difficulties the binding event. In addition, non-specific interactions between the molecules and the solid surface, which could interfere with the binding event and mask the obtained results, should be prevented. The target should also retain its activity in the surface immobilized state. If the target is a protein, these requirements are typically achieved by including oligoethyleneglycol (OEG) chains in the surface layer. The length, density and branching of the OEG, and the distribution and density of anchored ligands in the surface determine the final immobilization performance. Optimum surface architectures for maximum binding have been established for self-assembled monolayers of thiols on gold. However, these do not necessarily apply to more complex systems, like alkoxy silanes on metal oxide surfaces (eg. silica), of wider application in biotechnological fields.

In this context, this work combines photoresponsive molecules with well-defined OEG architectures (linear and branched) to generate bioactive and photoresponsive silica surfaces with up to three wavelength-selective functional levels. The synthesis of the surface modification agents was achieved, and the properties of the resulting surface layers were characterized. The performance of these layers in functional and selective capture of target proteins from solution was tested and analyzed with respect to surface architecture (ligand density, branching and surface exposure). The ability of the surfaces to generate complex protein patterns after light exposure through a mask has also been demonstrated.

The thesis is organized as follows. *Chapter 1* reviews reported literature and describes the state-of-the-art of the methods for the immobilization and patterning of proteins onto surfaces. *Chapter 2* describes some of the surface techniques employed for characterizing the surface layers and detecting and quantifying the protein binding events. *Chapter 3* presents the synthesis of two branched silanes containing photoresponsive ligands for protein anchoring and OEG-based inert arms. The influence of the length and branching of the OEG chain on the physical properties of the resulting layers, as well as on the protein binding efficiency is described. *Chapter 4* presents the synthesis and photolytic properties of two wavelength sensitive silanes which can be independently removed using light > 320 nm. The possibility of generating complex patterns with different proteins immobilized on selected microregions of a substrate after a two-step irradiation process is demonstrated. *Chapter 5* studies the influence of the ligand density and accessibility in the protein binding capacity of mixed silane layers. The optimum silane layer composition for maximum binding is identified and applied to the generation of bioactive magnetic nanoparticles with high binding efficiency.

-
-
-

Summary and conclusions

Photoremovable caging groups attached to surface layers can be used to generate chemical patterns on planar substrates. If the caged functionality can interact with a complementary species, such substrates can be used for capturing and site-selective immobilizing specific biomolecular targets from solution.

Different wavelength-sensitive cages have been identified to protect different surface active groups to render surfaces with several latent and independently addressable functional states. In particular, the possibility of generating trifunctional surfaces based on DEACM, NVoc and Bzn cages has been demonstrated. Sequential irradiation of such surfaces through different masks generates surface patterns with complex compositions which can be used for immobilizing different proteins onto selected microregions of the surface. Additional application of these surfaces for the study and activation of cellular processes at surfaces are envisioned.

The protein immobilization efficiency and selectivity depends not only on the nature of the photoactivated ligand, but also on the surface design. Protein resistant coatings (eg. long EG chains) are required to suppress non-specific attachment of the target and to retain its biological activity in the surface immobilized state. Different molecular architectures of the EG chain can be selected and render different surface properties.

The following tendencies were observed in this study when using EG chains coupled to silica surfaces through triethoxysilanes:

- (i) Surface layers containing linear EG chains form more dense layers (higher ligand density) than branched molecules.
- (ii) In spite of a general lower ligand density, surface layers of branched silanes are able to immobilize higher amounts of proteins. The branched structure seems to improve the accessibility of the ligand for binding.
- (iii) Hydrophobic interactions between alkyl spacers in branched silanes do not promote more dense packing, as expected from results reported on SAMs of long chain alkyl thiols. The presence of hydrophobic units in the layer increases non-specific adsorption of targets.
- (iv) In mixed layers, ligand density can be varied by modifying the molar ratio of the active and inert component of the feeding solution, or by using components of different molecular length. If the inert component is longer than the active one, the ligand will be “buried” in a non-reactive layer and binding will be hindered.

zur Oberflächenmodifizierung von Silica in der ortsselektiven Immobilisierung von Proteinen angewendet. Die Untersuchungen an zwei Schutzgruppen zur wellenlängen-selektiven Oberflächenaktivierung (*Kapitel 4*) legen den Grundstein für die Herstellung anspruchsvollerer strukturierter Oberflächen mit zwei verschiedenen ortsselektiv immobilisierten Proteinen. Darüberhinaus wurde die spezifische Immobilisierung von Proteinen an gemischten Silanschichten untersucht und zur Herstellung bioaktiver magnetischer Nanopartikel mit hoher Bindungseffizienz eingesetzt (*Kapitel 5*).

Im Folgenden werden die Hauptinhalte der Kapitel 3 bis 6 kurz abgehandelt.

I Photoaktivierbare verzweigte Silane

Eine neue Klasse von photosensitiven Silanen mit einer aus Tetraethylglykol (TEG)-Armen aufgebauten, verzweigten Struktur, die an einem Ende eine Aminofunktionalität in photolabiler geschützter Form und am anderen eine inerte Methoxygruppe trägt, wurde vorgestellt. Die photosensitive NVoc-Schutzgruppe für die Aminofunktion, die bei Bestrahlung im UV-Bereich abgespalten werden kann, bietet das Instrument zur chemischen Strukturierung von mit diesem Silan modifizierten Oberflächen. Die bei der Photolyse freigesetzten reaktiven Aminogruppen bilden die Basis für eine Vielzahl von bekannten Immobilisierungsstrategien, wie z. B. die spezifische Anbindung von Streptavidin an mit Biotin modifizierte Substrate, die exemplarisch untersucht wurde.

Drei verschiedene Syntheserouten wurden zur Synthese von verzweigten Silanen aufgestellt. Ausgehend von Epichlorhydrin als dreifunktionalem Bindeglied, das die TEG-Arme zusammenhält, konnten schließlich zwei verschiedene Verbindungen, (Y-EG-NVoc) und (Y-alkyl-NVoc), deren Struktur in (Abb. I) dargestellt ist, synthetisiert werden. Die Trennung der Vorstufen erfolgte säulenchromatographisch und stellte das Hauptproblem in der Synthese dar. Es scheint, dass die polaren TEG-Ketten die Wechselwirkungen mit dem zur Trennung verwendeten Kieselgel-Trägermaterial dominieren, was zu breiten Verteilungen der Profukte auf der Säule und damit hohen Produktverlusten führte.

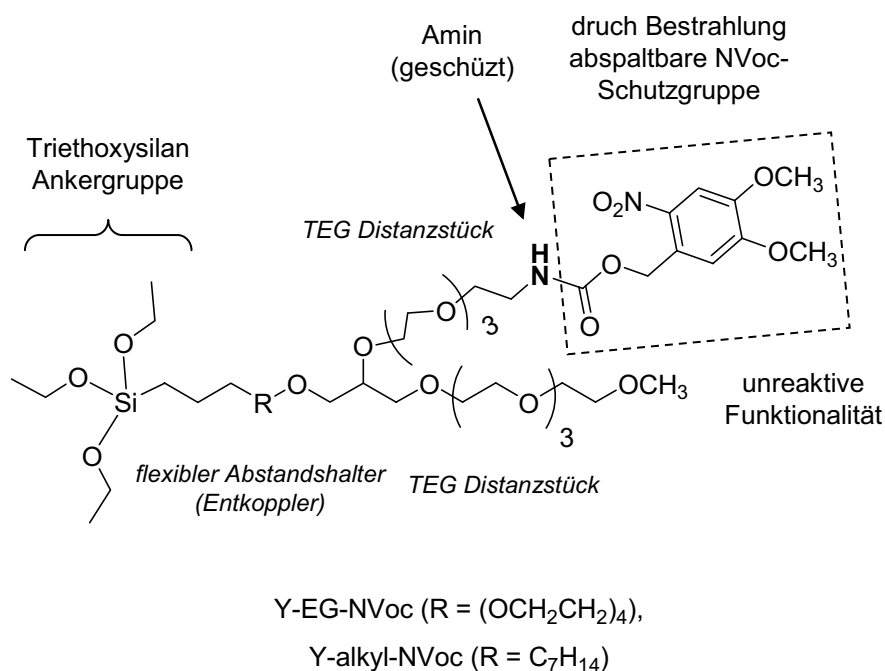


Abb. I: Strukturformeln der synthetisierten verzweigten Silane Y-EG-NVoc und Y-alkyl-NVoc.

Nach optimierten Silanisierungsbedingungen wurden Schichten von Y-EG-NVoc mit einem Kontaktwinkel von 51° und von Y-alkyl-NVoc mit einem Kontaktwinkel von 63° erhalten. Die ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken lassen auf Submonolagen schließen, die mit Oberflächenbedeckungen von 2,4 ng mm⁻² für Y-EG-NVoc und 1,6 ng mm⁻² für Y-alkyl-NVoc, unter denen von selbstorganisierten Thiol-Monoschichten (SAM) auf Gold liegen.

Die Abspaltung der photolabilen NVoc-Schutzgruppe wurde auf modifizierten Quarzsubstraten durch UV-Bestrahlung im Absorptionsmaximum bei 355 nm untersucht. Bei einer Bestrahlungszeit von 10 min wird eine maximale Entschützung von 50-60 % erreicht. Durch UV-Bestrahlung durch eine Maske konnten chemisch-strukturierte Oberflächen mit Strukturen im Mikrometerbereich hergestellt werden. Die Existenz der Aminogruppen in den bestrahlten Bereichen konnte durch Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffes belegt werden. Weitere Experimente mit haben verdeutlicht, dass diese photochemisch strukturierten Oberflächen nach geeigneter Biofunktionalisierung erfolgreich in der ortsselektiven Immobilisierung von ONDs, Antikörpern und Zellen eingesetzt werden können (Abb. II).

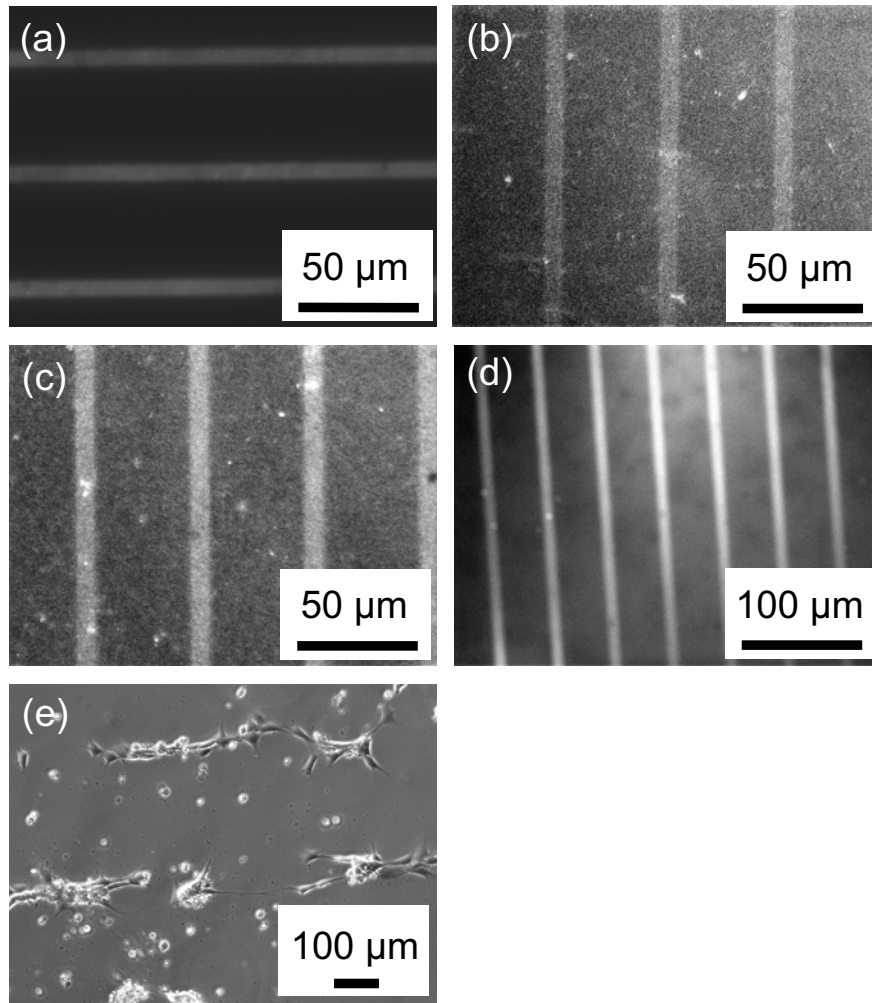


Abb. II: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von mit Y-EG-NVoc modifizierten Substraten, an die Alexa Fluor®647 Farbstoff angebunden wurde (a) sowie verschiedene mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Biomoleküle, ein mit Fluorescein markiertes OND nach Immobilisierung des komplementären OND-Stranges (b), ein mit FITC markierter IgG-Antikörper nach Immobilisierung von IgG (c), Fluorescein-markiertes Biotin an immobilisiertes Streptavidin (d). Bild (e) zeigt eine Lichtmikroskopaufnahme von NIH/ 3T3-Fibroblasten, die auf diese Oberfläche gesetzt wurden. Genauere Informationen können dem *Kapitel 4* der Arbeit entnommen werden.

Die selektive Immobilisierung von Streptavidin an die im Entschützungsprozeß freigesetzten Aminogruppen wurde mithilfe von reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIFS) verfolgt und quantifiziert (Abb. III). Während die unspezifische Adsorption an geschützte Substrate aufgrund der vorhandenen OEG Ketten (wie erwartet) vernachlässigbar klein war, korrelierte die Bindungsfähigkeit von Streptavidin an photochemisch aktivierte Y-EG-NVoc und Y-alkyl-NVoc mit der Packungsdichte der beiden Schichten, was ebenso für lineare EG-Ketten zutrif

(EG-NVoc). Im Vergleich mit linearen EG-Ketten zeigte die verzweigte Struktur Y-EG-NVoc eine höhere Bindungsfähigkeit und eignet sich somit besser für empfindliche Anwendungen.

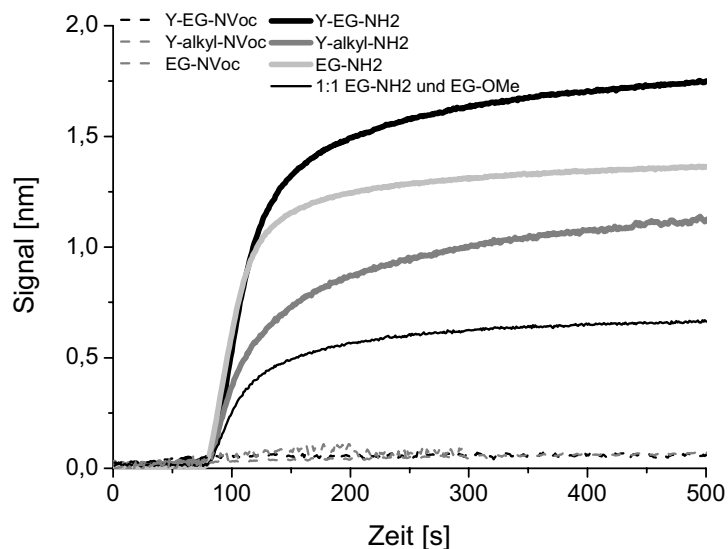


Abb. III: Mit RIFS verfolgte Bindung von Streptavidin an biotin-gekuppelte Oberflächen.

II Wellenlängen-selektive Photoaktivierung

Zwei photosensitive Schutzgruppen, (1) die bereits in *Kapitel 4* erwähnte, erfolgreich verwendete 6-Nitroveratryloxycarbonyl (NVoc)-Schutzgruppe und (2) Diethylamin-coumarin-4-yl (DEACM), wurden auf wellenlängenselektive Abspaltung getestet. Dazu wurden Siliziumdioxidsubstrate mit den entsprechenden beiden zuvor synthetisierten geschützten Aminopropyltriethoxysilanen (NVoc-APTS und DEACM-APTS, Abb. IV) modifiziert. Nach optimierten Silanisierungsbedingungen wurden Schichten mit unterschiedlichen Oberflächenbedeckungen von $9,7 \times 10^{11}$ für NVoc-APTS und $2,4 \times 10^{12}$ für DEACM-APTS erhalten, die auf eine unterschiedliche Neigung beider Silane zur Siliziumdioxid-Oberfläche deuten. Die höhere Packungsdichte der DEACM-APTS Schichten ist vermutlich auf höhere π -Wechselwirkungen zwischen den einzelnen aromatischen Gruppen zurückzuführen. Konsequenterweise wurde auch für gemischte Schichten aus 1:1 Mischungen beider Silane ein höherer Anteil an DEACM-

APTS gefunden.

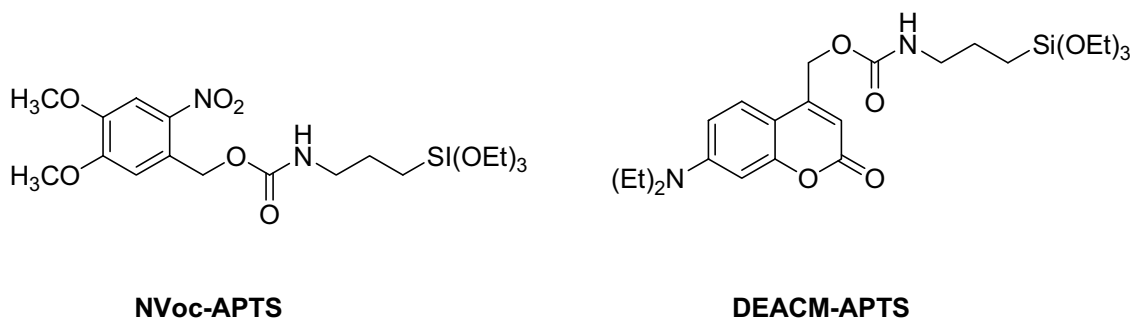


Abb. IV: Strukturformeln der beiden synthetisierten geschützten Aminopropyltriethoxysilane, NVoc-APTS und DEACM-APTS.

Spektroskopische Untersuchungen der Entschützungen beider photolabilen Gruppen bei unterschiedlichen Wellenlängen ergaben, dass DEACM bei 412 nm fast vollständig abgespalten wird, während NVoc bei dieser Wellenlänge relativ wenig beeinträchtigt wird. Da DEACM höhere Photosensitivität besitzt als NVoc und außerdem im gesamten Absorptionsbereich von NVoc absorbiert, ist eine Orthogonalität beider Gruppen ausgeschlossen. Bei Anwesenheit beider photosensitiven Gruppen kann jedoch DEACM zunächst selektiv abgespalten werden und anschließend NVoc bei 345 nm, wenn DEACM in den entsprechenden Bereichen nicht mehr vorliegt (Abb. V) Gemischte Schichten beider Silane wurden in einem zwei-stufigen Bestrahlungsprozess nacheinander ortsselektiv entschützt und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekuppelt. Das erhaltene Fluoreszenz-Muster bestätigte die Möglichkeit, mit diesen beiden Schutzgruppen gezielt komplexe chemisch strukturierte Oberflächen zu erzeugen.