

BMBF-Verbundprojekt

MultiplexLAB on NanoChip

Multiplexes elektrisches, mechanisches und optisches Auslesen von biologischen Membranprozessen an Silizium-Nanoporencchips

Förderkennzeichen 0312031

Abschlussbericht

Projektpartner

<p>Prof. Dr. Robert Tampé (Kordinator)</p>	<p>Johann Wolfgang Goethe Universität Institut für Biochemie Max-von-Laue-Str. 9 60438 Frankfurt am Main</p>
<p>Prof. Dr. Gerhard Abstreiter</p>	<p>Technische Universität München Walter Schottky-Institut Am Coulombwall 3 85748 Garching</p>
<p>Prof. Dr. Marc Tornow</p>	<p>Technische Universität Braunschweig Institut für Halbleitertechnik Hans-Sommer-Straße 66 38106 Braunschweig</p>
<p>Prof. Dr. Michael Huth</p>	<p>Johann Wolfgang Goethe-Universität Insitut für Experimentelle Physik Max-von-Laue-Str. 1 60438 Frankfurt am Main</p>
<p>NanoScale Systems GmbH</p>	<p>Technologiezentrum Darmstadt (TIZ) Robert-Bosch-Str. 7 64293 Darmstadt</p>

Inhalt

1	Aufgabenstellung und Planung	3
1.1	Aufgabenstellung	3
1.2	Planung und Ablauf	3
	A. Entwicklung einer generischen Siliziumchip-Architektur aus Nanoporen:.....	4
	B. Piezotunnel-resistiver Nanosensor für die Chipanwendung:	4
	C. Einzel-Molekül-Studien mit biochemischen Modellsystemen:.....	4
1.3	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens	5
1.4	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
2	Forschungsarbeiten und Ergebnisse	8
2.1	Teilprojekt A1 (Prof. Dr. Gerhard Abstreiter / Dr. Ulrich Rant)	8
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung	8
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung	16
2.2	Teilprojekt A2 (Prof. Dr. Marc Tornow).....	18
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung	18
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung	24
c)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	26
2.3	Teilprojekt B1 (Prof. Dr. Michael Huth).....	27
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung	27
b)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	36
2.4	Teilprojekt B2 (Nanoscale Systems GmbH).....	38
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung	38
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung	49
c)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	50
3.1	Teilprojekt C (Prof. Dr. Robert Tampé)	51
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung	51
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung	59
c)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	61
3.2	Verwertbarkeit der Ergebnisse, Verwertungsplan	62
3.3	Erfolge und geplante Veröffentlichungen	63
a)	Originalarbeiten (peer-reviewed).....	63
b)	Übersichtsartikel.....	65
c)	in Vorbereitung bzw. eingereicht	65

1 Aufgabenstellung und Planung

1.1 Aufgabenstellung

Sowohl aus akademischer als auch wirtschaftlicher Sicht ist die Untersuchung von Membranproteinen von größtem Interesse. Etwa ein Drittel aller menschlichen Proteine ist an der Membran organisiert; aufgrund ihrer zentralen Rolle in einer Vielzahl essentieller Prozesse wie Signaltransduktion, Zell-Zell-Kommunikation, Differenzierung und Energiewandlung stellen sie etwa 60% aller Zielmoleküle. Die Charakterisierung von Membranproteinen ist daher von eminenter Bedeutung für die Aufklärung von Krankheitsursachen sowie die Entwicklung neuer, effektiver Wirkstoffe für die Medizin. Um weitreichende *Screening*-Verfahren effizient realisieren zu können, sind automatisierbare Analyseverfahren im Nanomaßstab gefordert. Die Möglichkeit, Analysen auch kleinster Probenmengen – idealerweise an einzelnen Molekülen – in möglichst kurzer Zeit durchführen zu können, ist insbesondere für Membranproteine ein entscheidendes Kriterium, da diese meist nur in geringen Mengen verfügbar sind und bereits nach kurzer Zeit *in vitro* ihre native Funktionalität einbüßen.

Die ubiquitäre Rolle von Membranproteinen legt nahe, dass diese aufgrund unterschiedlicher Charakteristiken oftmals eine individuelle Wahl der geeignetsten Analysemethode erfordern. Es ist daher Ziel des Projekts, eine gemeinsame Analyseplattform für Membranproteine zu entwickeln, die mehrere hochempfindliche, komplementäre Auslesemethoden (optisch, mechanisch, elektrisch) in sich vereint. Diese Plattform wird auf einer ultraflachen nanostrukturierten Chipoberfläche realisiert, die geordnete Felder von unterätzen Nanoporen trägt. Durch die Aufbringung einer artifiziellen Lipidmembran bilden diese separate geschlossene Kompartimente, in denen parallelisiert Protein-vermittelter Transport bis hin zur Ebene der Einzelmolekülanalyse verfolgt werden kann. Insbesondere nicht-elektrogener Membrantransport soll so einer parallelen Analyse zugänglich gemacht werden.

Die direkte Integration eines mechanischen Nanosensors in die Geometrie der Chipoberfläche soll die Beobachtung biokinematischer Prozesse (Zelladhäsion, Motilität) unter Ausnutzung des piezotunnelresistiven (PTR) Effekts ermöglichen. Gleichzeitig würde der Sensor eine wirksame Auslese- bzw. Kontrollmöglichkeit für die Überspannung der Öffnungen durch die Lipidmembran und die Insertion von Membranproteinen darstellen.

1.2 Planung und Ablauf

Das Gesamtprojekt gliederte sich in die folgenden Abschnitte:

- A1 Fertigung und Optimierung der Nanoporenoberflächen
- A2 Elektrische Messtechnik, Entwicklung einer vollständig transparenten Chiparchitektur

- B1 & B2 Entwicklung der piezotunnelresistiven (PTR) Nanosensoren, EBID, elektrochemische Prozesse
- C Biofunktionalisierung der Oberflächen und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von Protein-vermitteltem Membrantransport

Zeitplan

Halbjahr

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

A. Entwicklung einer generischen Siliziumchip-Architektur aus Nanoporen:

- A-1: Nanostrukturierungstechniken für Poren
- A-2: Elektrische Messtechnik, Kavitätenkonzept für direkten Elektrolytkontakt
- A-3: Strukturierung der Kavitätenoberseite zur elektromechanischen Auslesung
- A-4: Integration FET-Sensorik (EBID-Struktur)
- A-5: Integration in Mikrofluidiksysteme

■	■	■	■	■	■
■	■	■	□	□	□
□	■	■	■	■	■
□	■	■	■	■	■
□	□	□	□	■	■

B. Piezotunnel-resistiver Nanosensor für die Chipanwendung:

- B-1: Herstellung einzelner PTR-Sensoren mit elektrischer Kontaktierung
- B-2: Elektromechanische Charakterisierung der Membranspannung
- B-3: Sensorrauschen aufgrund Brownscher Molekularbewegung
- B-4: Entwicklung eines 5x5-Parallelfeldes von PTR-Sensoren

■	■	■	■	■	■
□	■	■	□	□	□
□	□	■	■	□	□
□	□	□	■	■	■

C. Einzel-Molekül-Studien mit biochemischen Modellsystemen:

- C-1: Membran-Deposition und Verifikation des Membranüberspannens
- C-2: Einsatz einfacher Membranproteinsysteme
- C-3: Etablierung der Einzelmolekülmikroskopie
- C-4: Kombination von optischen und elektr. Ausleseverfahren
- C-5: Einzelmolekülstudien an Membrantransportproteinen

■	■	□	□	□	□
■	■	■	□	□	□
□	□	■	■	■	■
□	□	□	■	■	■
□	□	□	□	■	■

1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

A. Präparation und Charakterisierung von Nanoporen-Kavitäten Arrays

Mittels einer Kombination von Elektronenstrahlolithographie, reaktivem Ionenätzen und selektivem, nasschemischen Ätzen konnten auf der Grundlage von *Silicon-on-Insulator* (SOI)-Substraten großflächige Arrays von Nanoporen-Kavitäten hergestellt werden. Die Strukturen wurden eingehend mittels Rasterelektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. In Kooperation mit Teilprojekt C gelang bereits frühzeitig die funktionelle Überspannung der Nanoaperturen mit Lipidmembranen mittels Vesikelfusion und deren Nachweis durch Fluoreszenz-Erholungsexperimente (FRAP) und AFM-Analytik.

B. Piezotunnel-resistiver Nanosensor für die Chipanwendung

Die standardmäßigen Verfahren für die Detektion der Auslenkung von Cantilever- und Membranstrukturen basieren hauptsächlich auf zwei Funktionsprinzipien:

- (i) Der optischen Detektion mittels eines reflektierten Laserstrahls
- (ii) Dem piezoresistiven Effekt in dotierten Halbleitern

Beide Prinzipien beinhalten jedoch signifikante Nachteile für die in diesem Projekt verfolgten Ziele, insbesondere für den Nachweis der Kraftsignaturen molekularer Ereignisse in den Lipiddoppelschichten.

Die optische Detektion ermöglicht zwar Messungen mit sehr hoher Empfindlichkeit, allerdings sind Mindestgrößen für Cantilever- und Membranstrukturen von $\sim 10 \mu\text{m}$ nötig, um eine hinreichend definierte Reflexion des Laserlichts zu gewährleisten. Für den Nachweis und die Detektion von Einzel-Molekülereignissen sind aber möglichst kleine und dünne Cantilever- und Membranstrukturen wünschenswert, bei denen die optische Detektion an Ihre Grenzen stößt. Die optische Detektion in Flüssigkeiten wird zusätzlich erschwert, da Grenzflächeneffekte berücksichtigt und kompensiert werden müssen. Gleichzeitig ist die Parallelisierbarkeit (Multi-Cantilever Arrays) nur mit hohem technischem Aufwand möglich.

Piezoresistive Sensoren bieten den Vorteil einer komplett elektrischen Messmethode und einer vollen Integrierbarkeit des Sensors auf dem Cantilever oder der Membran, wodurch Messungen in Flüssigkeiten erleichtert werden. Allerdings ist die Empfindlichkeit im Vergleich zu dem optischen Verfahren deutlich reduziert. Prinzipiell ließe sich die Empfindlichkeit durch Verkleinerung der Cantilever mit paralleler Vergrößerung des Dicken-zu-Längen-Verhältnisses erhöhen, wobei aber auch hier prozessbedingt enge Grenzen gesetzt sind. Die Herstellung der piezoresistiven Sensorschichten erfolgt in der Regel über Dotierung einer Siliziumschicht und anschließende thermische Prozesse, um eine homogene Verteilung der Dopanten im Sensorbereich zu gewährleisten. Für die Sensorfunktion ist es notwendig die Dotierung in die oberflächennahen Regionen zu beschränken, da anderenfalls der piezoresistive Effekt gegen Null geht.