



Doctoral Thesis

## **Chemical and nanotopographical substrate design for AFM analysis of proteins in supported biomembranes**

**Author(s):**

Zaugg, Frank G.

**Publication Date:**

1999

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003846048> →

**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 Nr. 13182

# **Chemical and Nanotopographical Substrate Design for AFM Analysis of Proteins in Supported Biomembranes**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

FRANK G. ZAUGG  
Dipl. Nat. Sciences, ETH Zürich

Born January 3, 1972  
Citizen of Röthenbach i.E., Switzerland

Prof. Dr. N. D. Spencer, examiner  
Prof. Dr. G. Semenza, co-examiner  
Prof. Dr. U. W. Suter, co-examiner

Zürich, 1999

## Summary

The goal of this thesis was the development of a suitable support to render protein-containing artificial membranes accessible to scanning probe microscopy (SPM) under physiological conditions. Bilayer membranes directly supported on flat substrates as well as bilayer membranes suspended over topographically and chemically defined nanocavity surfaces were produced and studied.

A method based on thin-film technology and etching has been devised for the production of a flat gold/silicon substrate containing a defined density of round nanohole structures with diameters ranging from 50 - 200 nm and a depth varying between 5 and 300 nm. The geometry of a single nanohole consisted of a hydrophilic silicon cavity covered by a thin Au layer containing a hole.

These, as well as flat and ultraflat gold substrates, were then chemically modified using alkanethiols. We were able to tune the physical and/or chemical properties of the substrates—hydrophilic or hydrophobic, positively- or negatively charged, and inert or amino-reactive—by the formation of self-assembled monolayers with different end-group functionalities. Based on micro-contact printing ( $\mu$ CP), a method was then developed to direct an aminoreactive crosslinker molecule to predefined, micrometer-sized areas on a gold surface. By exposing such substrates to collagen V, semliki forest virus (SFV) or peroxidase (POD) it could be shown, that biomolecules do selectively bind to the reactive SAM areas and that they retain their functionality. A new route was then studied for the chemical modification of metal- and metal-oxide surfaces, based on hydrosilanes and a catalyst. This chemistry did lead to stable, organic thin films with a linear growth rate over time and of a molecular order inferior to alkanethiol SAMs.

In the next step, the deposition of bilayer membranes on the chemically modified and structured substrates were investigated. Three techniques were compared for the formation of homogeneous supported membranes: the black lipid membrane (BLMs) technique, the Langmuir-Blodgett technique (LB) and the direct fusion of lipid vesicles onto hydrophilic surfaces. Homogeneous bilayers were obtained very reproducibly on amine-terminated, self-assembled monolayers and on  $\text{SiO}_2$  substrates using the lipid vesicle method. The phase behavior of these supported bilayers was then investigated using photobleaching experiments and fluorescently labeled lipids. On SAM-modified gold surfaces, mainly crystalline lipid bilayers were obtained, whereas on  $\text{SiO}_2$  surfaces, the bilayers retained their fluidity. By fine-tuning the lipid composition of liposomes containing cholesterol, the crystalline-to-fluid phase transition temperature of the supported bilayers could be varied from below room temperature to 60°C. This allows the bilayer-state to be switched from solid to liquid by means of small temperature

changes in an experimental setup, making it possible to control the lateral diffusion of inserted membrane proteins.

The insertion of a model pore-forming protein (Streptolysine O (SLO)) into the supported bilayers was then studied and optimized to finally test the resolution that can be obtained with the atomic force microscope (AFM) on such systems. High-resolution images of the round-shaped membrane pores were obtained in an aqueous environment and without fixation, showing that the retrieval of molecular information from native membrane samples is possible.

Finally, after chemical modification of a substrate containing 100 nm nanocavities, the suspension of a bilayer membrane over these structures was achieved. AFM images revealed the presence of a lipid bilayer spread across the small holes, which under certain conditions was stable enough not to be indented by the AFM tip. These membrane/cavity substrates are ideal supports for the accommodation of large membrane proteins making them accessible to SPM.

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung eines geeigneten Substrats, das Proteine in künstlichen Phospholipid Membranen dem Raster Sonden Mikroskop zugänglich macht. Es wurden einerseits direkt auf flachen Oberflächen gespreitete Membranen hergestellt und untersucht, als auch solche, die über chemisch definierte Nanokavitäten gespannt waren.

Basierend auf einer Dünnschichttechnik und auf Aetzen wurde ein Silizium/Gold Substrat mit kleinen Nanolöchern entwickelt. Diese „Nanokavitäten“ hatten Durchmesser von 50 bis 200 nm und eine Tiefe von wahlweise 5 bis 300 nm. Grob beschrieben bestanden diese kleinen Löcher aus einer in Silizium geätzten, hydrophilen Kavität, bedeckt von einer dünnen aber stabilen Goldschicht, in der ein Loch eingelassen ist.

Diese strukturierten Oberflächen sowie flaches und ultraflaches Gold wurden dann mittels Alkanthiolen chemisch modifiziert. Es gelang, durch die Wahl von entsprechenden  $\omega$ -terminierten Thiolen, diese Oberflächen wasseranziehend oder -abstossend, positiv- oder negativ geladen oder inert oder aminoreaktiv zu gestalten. Durch Anpassung einer neuen, chemischen Strukturierungsmethode - dem sogenannten „micro-contact printing ( $\mu$ CP)“ - an die Bedürfnisse einer in unserem Labor synthetisierten, aminoreaktiven Substanz, gelang es dann, reaktive, sich selbst organisierende Schichten (SAMs) gezielt im Mikrometermassstab auf Goldoberflächen zu deponieren. Auf solcherart „chemisch“ strukturierten Oberflächen war es möglich, Collagen V, Semliki Forest Viren und das Enzym Peroxidase gezielt und ausschliesslich an jenen Stellen zu binden, die das aminoreaktive Alkanthiol enthielten. Mittels Peroxidase konnte dann im Weiteren gezeigt werden, dass Proteine (einen Teil) ihrer Aktivität bewahren, wenn sie kovalent an das Gold gebunden werden.

Parallel zu den Bestrebungen, Gold chemisch zu modifizieren, wurde auch ein neues hydrosilan/katalysator system auf seine Fähigkeit untersucht, auf Metall oder Metalloxid Oberflächen dünne Organische Schichten auszubilden. Es zeigte sich, dass langkettige Hydrosilane in einer katalysierten Reaktion sehr wohl zu stabilen organischen Filmen auf Gold führen, dass diese aber nicht so dünn und geordnet wie Alkanthiolschichten sind.

In einem nächsten, wichtigen Schritt wurde dann die Spreitung von Lipid-Membranen auf den verschiedenen Oberflächen untersucht. Drei Techniken wurden diesbezüglich

erwogen: Die „Black Lipid Membrane“ Methode, Die Langmuir-Blodgett Technik sowie das direkte Fusionieren von Lipidmembranen auf Oberflächen. Die letztere Methode führte schliesslich zu sehr reproduzierbaren, homogenen Membranen auf SiO<sub>2</sub> Oberflächen und auf gold modifiziert mit einem aminofunktionalen SAM. Mittels Photobleaching Experimenten wurde das Phasenverhalten dieser Membranen untersucht. Hier zeigte sich, dass auf SAM modifizierten Oberflächen die Membranen in den allermeisten Fällen in einer kristallinen Phase vorlagen, während sie sich auf SiO<sub>2</sub> wie eine zweidimensionale Flüssigkeit verhielten. Durch die Wahl geeigneter Lipidzusammensetzungen der Liposomen, konnte der Schmelzpunkt der Membranen zwischen unterhalb der Raumtemperatur und 60° eingestellt werden. Dies erlaubt es, die Diffusion von membran-integrierten Proteinen zu steuern.

Schliesslich wurde die Insertion eines porenformenden Modell-Proteins (Streptolysin O) in die gespreiteten Membranen untersucht. AFM Bilder sehr hoher Auflösung konnten nach dem Optimieren der Insertionsbedingungen bekommen werden, die die kringelförmige Gestalt dieser Löcher zeigen. Das Besondere dabei war, dass diese molekulare Auflösung beim Messen in wässriger Lösung und ohne die Probe zu fixieren, erhalten wurde.

Schlussendlich wurden die Anfangs erwähnten, nanostrukturierten Si/Au Oberflächen mit einer Alkanthiolschicht modifiziert und Liposomen darüber gespreitet. Mit dem AFM konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode Membranen hergestellt werden können, die zwischen dem Wasser in der Nanokavität und dem restlichen Wasservolumen aufgehängt waren. Von diesen hängenden Membranen wird erwartet, dass sie Membranproteinen eine besonders naturgetreue Umgebung Schaffen, damit diese in ihrer natürlichen Art Raster-Sonden Mikroskop Untersuchungen unterzogen werden können.