

# Biolithography

a tool to manipulate surfaces for DNA-assisted  
patterning in the micron- and nanorange

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Städler, Brigitte

**Publication date:**

2007

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005369228>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Doctoral Thesis ETH No. 17149

# Biolithography: A Tool to Manipulate Surfaces for DNA-Assisted Patterning in the Micron- and Nanorange

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences  
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by  
Brigitte Städler  
Dipl. Werkstoff-Ing. ETH  
born on October 6, 1978  
citizen of Altstätten (SG)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Janos Vörös, examiner  
Prof. Dr. Marcus Textor, co-examiner  
Prof. Dr. Alain Brisson, co-examiner  
Dr. H. Michelle Grandin, co-examiner

April 4, 2007

---

## Abstract

---

On the way to make personalized medical care accessible to a large number of people, many hindrances need to be overcome. Biosensors, consisting of active areas in a non-interacting background, are a crucial technology for which researches are seeking. The permanent update of the patients conditions e.g., the early detection of cancer, requires a fast, sensitive and selective analysis of a blood sample.

We gained more insight into the human genome and genetic mutations in healthy and diseased tissue through the DNA microarray technology. However, proteins, not only genes, provide information about a course of disease and the potential therapy. Furthermore, membrane proteins are the targets for more than 60 % of today's therapeutic drugs. The direct application of the DNA microarray technology to proteins is challenging, especially when membrane proteins are involved as these are prone to denaturation and loss of activity upon removal from their natural environment, the lipid membrane. Although fluorescence as an analytical tool is well-established and widely used in biology, it suffers from the fact, that the dyes bleach upon exposure to light and the biomolecules need to be chemically modified in order to label them. Nowadays, the expectations, that medical care can profit from nanotechnology, are high. On the one hand higher density of active spots on the surface, hence a higher throughput of more target molecules, might be feasible. On the other hand, novel sensing approaches, among them the electrical nanowire-based biosensing, the electrical sensing of ion channels positioned on nanopores/grooves, and the optical sensing based on noble metal colloids are potential approaches where biotechnology could benefit from nanotechnology.

Although the search for always smaller and faster devices is a central issue, there are still many open questions which can be addressed via microtechnology when the creation of oriented tissue and organs is of interest. Moreover, there is a need to locally *in situ* manipulate structured surfaces in the micron and in the nanorange, without the need of

UV-light. This would be very desirable for cell studies or local control over the density of immobilized nano-objects.

The aim of this thesis is to provide a universal patterning platform for biosensing, which is applicable in the micron- and nanorange and which is not limited to immobilizing one specific nano-object and can be extended to cells. The patterning approach is based on the Molecular Assembly Patterning by Lift-off (MAPL) method optimized for the micron-range which transforms photoresist patterns into a surface of active patches of biotinylated poly(L-lysine)-*grafted*-poly(ethylene glycol) (PLL-*g*-PEG/PEGbiotin) in a bio-resistant background of PLL-*g*-PEG. Such a surface was transformed into an array of single-stranded DNAs by selectively adsorbing complexes of biotinylated DNA (bDNA) and streptavidin (SA) via the avidin/biotin linkage. Then, different nano-objects tagged with the complementary DNA were selectively immobilized to the surface via the DNA-DNA interaction. Furthermore, a tool to *in situ* manipulate the multistep surface modification is provided.

Within this thesis, the possibility to convert such a single-stranded DNA array first into a homogenous vesicle array and then into a heterogenous functional vesicle array is presented. The multistep surface modification was characterized in detail using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D). It was found that the amount of adsorbed complexes of SA and bDNA and subsequently of the hybridized complementary DNA depended on the molar concentration ratio of SA to bDNA in solution and the ionic strength of the buffer. Furthermore, we were able to control the shape deformation of the immobilized vesicles by tailoring the DNA density on the surface and on the vesicles. Surface-sorting of different kinds of vesicles requires a stable linkage between the vesicles and the DNA, which could only be provided by the maleimide-thiol linkage and neither by the a single cholesterol tag nor by the incorporation of 'free' cholesterol into the vesicle membrane. Moreover, there were two ways identified, which allowed for the successful creation of a heterogenous vesicles array; 1) sequential vesicle immobilization using a crossed channel microfluidic device or 2) by spotting the linker complexes of SA and bDNA and subsequent surface-sorting of DNA-tagged Annexin functionalized or BSA loaded vesicles.

Down-scaling the multistep surface modification into the nanorange was successfully performed using Extreme UV Interference Lithography (EUV-IL) to create the resist nanopatterns. An adapted lift-off protocol enabled the transformation into a single-stranded DNA nanoarray. Gold colloids between 5 nm and 100 nm were tagged with

DNA and it was possible to guide single gold colloids onto pre-defined areas on the surface. The gold colloid dot array has the potential to be applied for optical biosensing using Localized Surface Plasmon Resonance spectroscopy (LSPR). The gold colloids on a nanoline array were brought into contact by enhancement. First direct current measurements showed that the gold nanolines were conductive and have therefore the potential to be used for electrical nanowire-based biosensing.

Fluorescence, a widely used detection method in biology, is considered to be a non-destructive technique. However, we found within this thesis that photobleaching can be used to locally manipulate surfaces. Photobleaching-induced patterning, a novel developed technique, is an approach which takes advantage of reactive oxygens ( $^1\text{O}_2$ ) which are created during photobleaching in order to damage/remove DNA as well as streptavidin. It was found that the effect could be suppressed by the addition of vitamin C and glutathione, the native agents to neutralize  $^1\text{O}_2$  in the body, to the buffer solution. Fluorescently labeled streptavidin within the multistep surface modification is used as a 'bio'-photoresist in this novel patterning technique. The hybridization of nano-objects tagged with the complementary DNA was suppressed in areas which had been exposed to laser light (photobleached). The density of immobilized vesicles or gold colloids via DNA was found to depend on the amount of fluorescently labeled streptavidin on the surface. Furthermore, the re-activation of the photobleached areas was made possible by adsorption of SA or complexes of SA and bDNA. By doing so, the local exchange of vesicles on the surface was shown. Although the degradation was limited times possible, this *in situ* patterning method, which can be used in aqueous solution without the need of UV light, has the potential to be applied for cell studies or to be combined with nanotechnology, e.g., to interconnect nanolines.

Biotechnology can benefit from nanotechnology for instance from novel detection methods such as LSPR or nanowire-based biosensing. Furthermore, nano-engineered surfaces can further improve known technology platforms. The electrical characterization of supported lipid bilayers (SLB) including incorporated ion channels on flat conductive substrates suffers from several problems. Among them are the accumulation of the ions underneath the channel which limits the sensitivity or the close proximity of the protein to the surface might interfere with the protein's performance. The use of an electrically insulating free-standing membrane on a nanotopography is expected to overcome these issues. In our approach, we are nano-engineering surfaces with the aim to create a free-standing membrane from vesicle fusion. We are optimizing the interaction between a nanostructured surface and vesicles by varying the composition of the surface

and the lipids in the vesicles. A SLB which contained lipids in the gel phase i.e., DPPC is expected to be more likely to form a spanning membrane over nanostructured surfaces. Vesicles containing DPPC and DOPC lipids formed a SLB on silica in a lipid composition ratio DPPC/DOPC = 3/1 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions at  $40^\circ\text{C}$ . Furthermore, we showed that the creation of a free-standing membrane on a silica nanotopography was not possible by using POPC or DPPC/DOPC vesicles. Moreover, a novel surface-engineering strategy is presented which might favor the spanning of a membrane over the direct contact to the underlying nanotopography. We try to benefit from the fact, that vesicles containing phosphatidylserine lipids can selectively adsorb and fuse into SLB on silica in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. The presence of a vesicle layer or a SLB was shown by AFM and a Fluorescent Recovery after Photobleaching (FRAP) on an metal oxide contrast between  $\text{SiO}_2$  and  $\text{TiO}_2$ , which was created via colloidal lithography, for instance. However, no reliable indication for the presence of a free-standing membrane has yet been found.

Although researchers have learnt a lot about how cells interact among each other or with their environment, there remain many unanswered questions e.g., there is not yet a lot known about the process of cell-cell fusion. Within this thesis the online monitoring by AFM of the local reorganization of the membrane-associated cytoskeletal network at points of apposition in fusing myoblasts was possible. First indications were found that Annexin VII might be one of the key factors involved in the formation of tubular structures between fusing cells.

Tissue engineering is aimed at the creation of well-organized (functional) tissues. MAPL had already proven its capability to create a cell array in previous studies. In this thesis, the MAPL process was adapted such that stripes of extracellular adhesion molecules (fibronectin or laminin) surrounded by PLL-g-PEG were created. Fibronectin was more suitable for our surface-engineering approach to linearly align myoblasts and the multinuclear myotubes. Moreover, it was possible to grow myoblasts inside of a microfluidic channel to  $\sim 60\%$  confluency. This will in future give access to investigate single myotubes in a fast and reliable way.

The presented patterning platform was proven to be applicable for vesicles, gold colloids or cells in the micron and nanorange. Moreover, the photobleaching-induced patterning opens up the possibility to locally manipulate pre-fabricated patterns. The multi-step surface modification might in future find key applications in the field of biosensing or tissue engineering, being it nanowire-based sensor or substrate for myoblast research, thanks to its stability, reproducibility and flexibility.

---

## Zusammenfassung

---

Auf dem Weg personalisierte medizinische Versorgung einer breiten Menschenmasse zugänglich zu machen, müssen viele Hindernisse überwunden werden. Eine Schlüsseltechnologie nach der Forscher suchen, sind Biosensoren, die aus aktiven Regionen umgeben von einem resistenten Hintergrund bestehen. Die ständige Aktualisierung der Patientendaten, z.B. die Früherkennung von Krebs, setzt ein schnelles, sensitives und selektives Analysieren einer Blutprobe voraus. Dank DNA Microarraytechnologie haben wir mehr Erkenntnisse über das menschliche Genom und genetische Mutationen in gesundem und krankem Gewebe gewonnen. Allerdings können Proteine und nicht nur Gene Erkenntnisse über den Verlauf einer Krankheit und deren Behandlung liefern. Membranproteine sind die Zielmoleküle von mehr als 60 % aller Medikamente. Die direkte Anwendung der Microarraytechnologie für Proteine ist eine Herausforderung, vor allem wenn Membranproteine involviert sind. Diese neigen zur Denaturierung und damit zum Verlust ihrer Funktion, wenn sie aus ihrer natürlichen Umgebung, der Lipidmembran, entfernt werden. Obwohl Fluoreszenzdetektion etabliert und weitverbreitete in der Biologie ist, hat sie Nachteile, da die Biomoleküle mit einem Fluoreszenzmarker chemisch modifiziert werden müssen und das Signal mit zunehmender Anregung ausbleicht. Die Erwartungen der medizinische Versorgung in die Nanotechnologie sind hoch. Einerseits ermöglicht eine grössere Dichte aktiver Stellen auf einer Sensoroberfläche einen höheren Durchsatz und eine gesteigerte Messeffizienz. Andererseits liefern neue Messmethoden, darunter die elektrische nanodrahtbasierte Messmethode, die elektrische Messung von Ionenkanälen, die über Nanoporen oder -rillen positioniert sind, und die optische Messung auf der Basis von Edelmetallkolloiden ermöglichen, vielversprechende Ansätze, bei denen die Biotechnologie von der Nanotechnologie profitieren kann.

Obwohl die Miniaturisierung im Trend ist, können viele offene Fragen bereits mit Mikrotechnologie angegangen werden, z.B. wenn die Herstellung von orientiertem Gewebe

oder Organe von Interesse sind. Ausserdem gibt es ein Bedürfnis, strukturierte Oberflächen im Mikro- und Nanometerbereich lokal und *in situ* manipulieren zu können. Das wäre hilfreich für Zellstudien oder um die Dichte immobilisierter Nanoobjekte zu kontrollieren.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, eine universelle Strukturierungsplattform für die Biosensorik herzustellen, die im Mikro- und Nanometerbereich anwendbar ist, die nicht auf die Immobilisierung eines Nanoobjektes beschränkt ist und ausserdem auf Zellstudien erweitert werden kann. Der Strukturierungsansatz basiert auf der “Molecular Assembly Patterning by Lift-off” (MAPL) Methode, die für den Mikrometerbereich optimiert wurde. Dabei wird eine Oberfläche fotolithographisch strukturiert, wobei aktive Stellen mit biotiniliertem Poly(L-lysin)-*grafted*-poly(ethylenglykol) (PLL-*g*-PEG/PEGbiotin) in einem bioresistenten PLL-*g*-PEG Hintergrund geschaffen werden. Durch die selektive Avidin/Biotinbindung können biotinierte DNA-Einzelstränge (bDNA) über Streptavidin (SA) immobilisiert werden und eine strukturierte Oberfläche in einen Array von DNA-Einzelsträngen umwandeln. Anschliessend können verschiedene Nanoobjekte, die mit der komplementären DNA markiert sind, selektive über die komplementäre DNA-DNA Bindung adsorbiert werden. Des Weiteren wurde ein Werkzeug zur *in situ* Manipulation der mehrstufigen Oberflächenmodifikation bereitgestellt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird die Möglichkeit untersucht, eine DNA-Einzelstranganordnung zuerst in eine homogenen Vesikelanordnung und dann in eine heterogene funktionalisierte Vesikelanordnung um zuwandeln. Die mehrstufige Oberflächenmodifikation wurde mit der optischen Wellenleiterspektroskopie (OWLS) und der Quatzkristall-Mikrowaage mit Energieverlustaufzeichnung (QCM-D) charakterisiert. Es hat sich herausgestellt, dass die Menge adsorbierter SA- und bDNA-Komplexe und die darauffolgende Hybridisierung der komplementären DNA abhängig ist vom molaren Konzentrationsverhältnis SA zu bDNA und der Ionenstärke der Pufferlösung. Ausserdem sind wir in der Lage, die Deformation der immobilisierten Vesikels zu kontrollieren, indem wir die DNA-Dichte auf der Oberfläche und um das Vesikel anpassen. Sortieren verschiedener Vesikelarten auf der Oberfläche setzt eine stabile Bindung zwischen dem Vesikel und der DNA voraus, die nur mit der Maleimid-Thiol-Bindung und weder durch eine einzelne Cholesterinmarkierung der DNA noch durch den Einbau “freier” Cholesterine in die Vesikelmembran erreicht werden konnte. Zusätzlich haben wir zwei Wege gefunden, um die erfolgreiche Herstellung einer heterogenen Vesikelanordnung zu ermöglichen: 1) sequentielle Vesikelimmobilisierung mit einem Crossed Channel-Microfluidic-Device oder 2) durch “spotten” der SA



und bDNA Bindungskomplexe und darauffolgende Oberflächensortierung DNA markierter annexinfunktionalisierter oder BSA-geladener Vesikeln.

Die Miniaturisierung der mehrstufigen Oberflächenmodifikation in den Nanometerbereich wurde erfolgreich durchgeführt, indem die Fotolacknanostrukturen mit der Extrem UV Interferenz Lithographie (EUV-IL) hergestellt wurden. Ein angepasstes Lift-off Protokoll ermöglichte den Transfer in eine DNA-Einzelstranganordnung. Zwischen 5 nm und 100 nm grosse Goldkolloide wurden mit DNAs markiert. Dadurch war es möglich, die einzelnen Kolloide auf eine vordefinierte Stelle auf der Oberfläche zu dirigieren. Die Goldkolloidpunktanordnung hat das Potential, als optischer Biosensor basierend auf der lokalisierten Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (LSPR) eine Anwendung zu finden. Die Goldkolloide in einer Nanolinienanordnung würden untereinander in Kontakt gebracht indem sie vergrößert wurden. Erste Direktstrommessungen zeigten, dass die Goldnanolinien leitend sind und daher das Potential haben, für elektrische nanodrahtbasierte Messungen angewendet werden können.

Fluoreszenzdetektion ist eine nichtdestruktive und weitverbreitete Methode in der Biologie. Allerdings haben wir im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden, dass Fotobleichen dazu benutzt werden kann, die Oberfläche lokal zu manipulieren. Die neuentwickelte Technik "Photobleaching-induced Patterning" ist eine Möglichkeit, aus den reaktiven Sauerstoffradikale ( $^1\text{O}_2$ ), die durch Fotobleichen kreiert werden, Vorteile zieht, um DNA sowie Streptavidin zu beschädigen/entfernen. Es wurde herausgefunden, dass durch Hinzufügen von Vitamin C oder Glutathion, die natürlichen Zusätze um  $^1\text{O}_2$  im Körper zu neutralisieren, zur Pufferlösung dieser Effekt unterdrückt werden konnte. In dieser neuen Strukturierungsmethode kann fluoreszenzmarkiertes Streptavidin als "Bio"-Fotolack in der mehrstufigen Oberflächenmodifikation benutzt werden. Die Hybridisierung von Nanoobjekten, die mit der komplementären DNA markiert wurden, konnte in den Regionen unterdrückt werden, die zuvor dem Laserlicht ausgesetzt waren (fotogebleicht). Die Dichte der immobilisierten Vesikeln oder DNA-markierter Goldkolloiden hängt von der Menge fluoreszenzmarkierten Streptavidins auf der Oberfläche ab. Ausserdem war die Reaktivierung der fotogeblichten Regionen möglich, indem Streptavidin oder Komplexe aus Streptavidin und bDNA re-adsorbiert wurden. Das wurde getan, um lokal Vesikel loszulösen. Allerdings war die Degradation nur begrenzte Male möglich. Diese *in situ* Strukturierungsmethode, welche in wässriger Lösung bei neutralem pH ohne UV-Licht benutzt werden kann, hat das Potential für Zellstudien oder in Kombination mit Nanotechnologie, z.B. um Nanolinien zu verbinden.

Biotechnologie kann von der Nanotechnologie profitieren, z.B. durch neue Detektionsmethoden wie LSPR oder nanodrahtbasierte Biosensorik. Zusätzlich können durch nanomanipulierte Oberflächen bekannte Technologieplattformen weiter verbessert werden. Die elektrische Charakterisierung von Lipiddoppelschichten inklusive eingebauter Ionenkanäle auf flachen, leitenden Substraten haben verschiedene Probleme. Darunter ist die Ansammlung von Ionen unterhalb des Kanals, welche die Sensitivität limitiert und die Nähe des Proteins zur Oberfläche kann die Proteinfunktion beeinträchtigen. Die Benutzung von elektrisch isolierenden, freistehenden Membranen oberhalb von Nanotopografien könnte diese Probleme überwinden. In unserem Ansatz manipulierten wir Oberflächen im Nanobereich mit dem Ziel, eine freistehende Membran durch Vesikelfusion zu kreieren. Wir optimierten die Interaktion zwischen der nanostrukturierten Oberfläche und den Vesikeln, indem wir die Zusammensetzung der Oberfläche und der Lipide in den Vesikeln variierten. Von einer Lipiddoppelschicht, die Lipide in der Gelphase enthält, d.h. DPPC, wird eher erwartet, dass sie eine überspannende Membran über eine nanostrukturierte Oberfläche bildet. Vesikel, die DPPC und DOPC Lipide enthalten, formen eine Lipiddoppelschicht auf Silikaoberflächen im Zusammensetzungsverhältnis DPPC/DOPC = 3/1 und in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei  $40^\circ\text{C}$ . Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die Herstellung einer freistehenden Membran über einer Silicananotopografie nicht möglich war, weder durch die Verwendung von POPC noch durch DPPC/DOPC Vesikel. Zusätzlich wird eine neue oberflächenmanipulations Strategie präsentiert, die das Spannen einer Membrane über eine Nanotopografie favorisieren sollte. Wir versuchen von der Tatsache zu profitieren, dass Vesikel, die Phosphatidylserinlipide enthalten, selektiv auf Silika ohne die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu adsorbieren und fusionieren. Die Präsenz von einer Vesikelschicht oder eine Lipiddoppelschicht konnte mit einer AFM und einer "Fluorescent Recovery after Photobleaching" Studie auf einem  $\text{SiO}_2$  und  $\text{TiO}_2$  Metalloxidkontrast, der z.B. durch Kolloidlithografie hergestellt werden kann, gezeigt werden. Allerdings konnten keine zuverlässigen Anzeichen für die Präsenz einer freistehenden Membrane gefunden werden.

Obwohl Forscher viel darüber gelernt haben, wie Zellen untereinander und mit ihrer Umgebung kommunizieren, bleiben viele Fragen offen. So ist z.B. noch nicht sehr viel über den Prozess bekannt, der die Zell-Zell Fusion ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit war die Online-Aufzeichnung lokaler Neuorganisation des membranassoziierten zytoskeletalen Netzwerkes an den Kontaktpunkten zwischen zwei fusionierenden Myoblasten mit AFM möglich. Erste Anzeichen wurden gefunden, dass Annexin VII als Schlüsselfaktor

bei der Formation von rohrförmigen Strukturen zwischen fusionierenden Zellen involviert ist.

“Tissue Engineering” hat zum Ziel, gutstrukturiertes (funktionales) Gewebe herzustellen. Dass mit MAPL Zellanordnungen hergestellt werden können, wurde bereits früher bewiesen. In dieser Arbeit wurde der MAPL Prozess so adaptiert, dass Streifen extrazellulärer Adhäsionsmoleküle (Fibronectin und Laminin) umgeben von PLL-g-PEG produziert werden konnten. Fibronectin war geeigneter für unseren Oberflächenmanipulationsansatz, um Myoblaste und die multinuklearen Myotubes linear anzuordnen. Ausserdem war es möglich, Myoblaste in einem Microfluidic-Channel zu 60 % Konfluenz wachsen zu lassen. Dadurch wird in Zukunft der Zugang zu einzelnen Myotubes zur schnellen und zuverlässigen Untersuchung eröffnet.

Die vorgestellte Strukturierungsplattform hat bewiesen, dass sie anwendbar für Vesikel, Goldkolloide und Zellen im Mikro- und Nanometerbereich ist. Zudem ermöglicht die “Photobleaching-induced Patterning” Methode das lokale Manipulieren von vorgefertigten Strukturen. Die mehrstufige Oberflächenmodifikation dürfte dank ihrer Stabilität, Reproduzierbarkeit und Flexibilität eine Schlüsselanwendung im Bereich der Biosensorik und dem “Tissue Engineering” werden, sei es als nanodrahtbasierte Sensoren oder als Substrat für die Myoblastenforschung.