



Doctoral Thesis

## **Cargo transport on engineered surfaces powered by molecular motors**

**Author(s):**

Brunner, Christian J.

**Publication Date:**

2007

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005466092> →

**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](#).

Doctoral Thesis ETH No. 17388

# Cargo Transport on Engineered Surfaces Powered by Molecular Motors

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

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

presented by  
Christian J. Brunner  
Dipl. Werkstoff-Ing. ETH  
born on September 11, 1977  
citizen of Laupersdorf (SO)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Viola Vogel, examiner  
Prof. Dr. Vahid Sandoghdar, co-examiner  
Prof. Dr. Marcus Textor, co-examiner  
Dr. Christian Wahnes, co-examiner

August 27, 2007

# Abstract

Biomolecular motors, such as myosin and kinesin, are the workhorses in nature's protein toolbox. They are not only responsible for macroscopic movements such as muscle contraction (myosin), but also account for active intracellular transport along a network of protein filaments called microtubules, protein polymers assembled from many tubulin subunits. Bioengineers have begun to exploit this transport system for technological purposes. Based on the concept of molecular shuttles—microtubule filaments propelled by surface-adsorbed kinesin motors—various types of applications, such as sensoric, nanomechanical or information processing devices, have been proposed. This thesis purposes to develop new, and to expand existing concepts and tools towards an *in vitro* transport system based on molecular shuttles. More specifically, we address important design criteria of a future device, *i.e.* (1) the expected lifetime of a final device, (2) suitable methods of visualizing transport within the device, and (3) the specific binding, transport and pick-up of cargo on plain and micro-engineered surfaces.

The lifetime of a molecular motor-based device depends on the stability of its most fragile component. In order to define a benchmark for the loss of performance over time, we investigated the stability of molecular shuttles operating in flowcells consisting of different synthetic materials. In this study, we could demonstrate that microtubules are most prone to degradation, and exhibit a lifetime of several hours under stable conditions. This lifetime, however, is dramatically decreased if casing materials, such as PDMS or PMMA, which promote the effusion of oxygen into the solution, are applied. Under such conditions and in combination with intense illumination, microtubule filaments degrade within seconds. On the other hand, kinesin motor proteins were active for at least 1–2 days independent of environmental conditions.

Fluorescent Microscopy is the most common method for live-imaging of microtubule shuttles. However, due to photobleaching and possible destabilizing effects of intense fluorescent illumination, alternative methods are sought to visualize microtubule filaments, protein assemblies, and even biological samples, which may serve as cargo. We therefore expanded the range of application of an interferometric optical imaging technique—originally developed for the detection of nanometer-sized gold colloids—to visualizing unlabeled microtubules. In motility assays, the filaments could be detected with sufficient contrast of 3–5% against the background.

Specific binding of cargo—key in a transport system—was investigated using biological interactions such as biotin–streptavidin, antibody–antigen, and DNA–DNA. By these means, cargo ranging in size from tens of nanometers to several micrometers could be specifically adsorbed and transported by molecular shuttles. However, due to the random orientation of adsorbed kinesins on a surface, microtubule shuttles move in a random, directionless manner. Therefore, to optimize the guidance of shuttle movement, new fabrication processes for open micro-channels featuring adjustable channel-overhangs were developed. Characterization of the transport of 40 nm gold particles by microtubule filaments inside these structures revealed a correlation between increased cargo-loss and increased curvature of the channels.

The loading of functionalized microtubules with cargo dispersed in solution is straightforward and effective, but lacks the spatial separation of the origin of loading and the destination of the load. We therefore aimed to fabricate cargo loading stations, which are spatially confined on a surface. In addition, these loading stations were shown to permit release of cargo upon contact to passing microtubule shuttles. Successful pick-up of 40 nm gold particles could be achieved by using DNA–DNA interactions to tether the cargo to the surface. In addition, we could demonstrate that co-existence of motors and cargo inside the loading stations was crucial for efficient pick-up, even if the average length of microtubule filaments exceeded the width of the loading stations by a factor of 4. Finally, we integrated loading stations into a micro-engineered channel system to combine shuttle guiding as well as pick-up and transport of cargo. The feasibility of cargo pick-up from loading stations inside the channels could be demonstrated. However, the average transport distance of cargo after pick-up ( $\sim 16 \mu\text{m}$ ) was found to be below the requirements of an envisioned *in vitro* transport device. A functional and efficient integrated design therefore depends on further optimization and development.

Overall, we were able to provide valuable engineering concepts and principles for the further development of a future cargo transport device based on molecular shuttles. The integration of the independently developed key elements, *i.e.* pick-up and transport of cargo and the guidance of shuttles, into a final system as presented in this work is an important step towards this goal.

# Zusammenfassung

Biomolekulare Motoren, wie beispielsweise Kinesin und Myosin, sind die Arbeitspferde in der Protein-Werkzeugkiste der Natur. Sie sind nicht nur verantwortlich für makroskopische Bewegungen wie der Muskelkontraktion, sondern auch für den aktiven intrazellulären Transport entlang von Mikrotubuli, Biopolymere bestehend aus vielen Tubulin-Protein Einheiten. Bioingenieuren haben nun begonnen, das biologische System für technologische Zwecke zu nutzen. Basierend auf dem Konzept der molekularen Shuttles—so werden Mikrotubulifilamente genannt, welche von oberflächenadsorbierten Kinesinmotoren angetrieben werden—wurden verschiedene Anwendungen im sensorischen, nanomechanischen oder informationsaufbereitenden Bereich vorgeschlagen. Ziel dieser Arbeit ist es, Konzepte und Werkzeuge zu entwickeln oder erweitern, welche es erlauben, die Bewegung von molekularen Shuttles, deren Beladung sowie den Transport von Ladung zu kontrollieren. Wir behandeln und untersuchen wichtige Designkriterien für ein künftiges *in vitro* Transportsystem, darunter (1) die zu erwartende Lebensdauer des Systems, (2) geeignete Methoden der Visualisierung und (3) das spezifische Beladen der Shuttles, sowie den Transport und das Auflösen von Ladung auf mikrostrukturierten Oberflächen.

Die Lebensdauer eines auf molekularen Motoren basierenden Systems ist abhängig von der Stabilität der schwächsten Komponente. Um einen Richtwert für die abnehmende zeitabhängige Leistung der molekularen Shuttles in synthetischer Umgebung definieren zu können, wurde die Stabilität der Mikrotubuli und Motoren in Flusskammern getestet, welche aus verschiedenen Materialien zusammengesetzt wurden. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass Mikrotubuli am anfälligsten sind sich aufzulösen und unter stabilen Bedingungen eine Lebensdauer von einigen Stunden aufweisen. Allerdings wird diese Lebensdauer dramatisch verkürzt, wenn Materialien wie PDMS oder PMMA, welche die Effusion von Sauerstoff begünstigen, zum Aufbau der Flusskammern verwendet werden. Unter diesen Konditionen und in Kombination mit intensiver Beleuchtung depolymerisieren die Mikrotubuli innerhalb weniger Sekunden. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass Kinesin Motoren unabhängig von den Umgebungsbedingungen für mindestens ein bis zwei Tage aktiv bleiben.

Fluoreszenzmikroskopie ist die populärste Methode, molekulare Shuttles in Echtzeit zu beobachten. Aufgrund von Photobleaching (das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe) und potentiell destabilisierender Effekte, ausgelöst durch intensives Fluoreszenzlicht,

werden aber alternative Methoden gesucht, nicht nur um Mikrotubulifilamente, sondern auch um Proteinaggregate und biologische Objekte im Allgemeinen zu visualisieren. Aus diesen Gründen haben wir den Anwendungsbereich eines Interferenz-basierten optischen Bildgebungsverfahrens – ursprünglich entwickelt zur Detektion von Goldpartikeln im Nanometerbereich – erweitert, um un-markierte (ohne Fluoreszenzmoleküle) Mikrotubuli abzubilden. Auf diese Weise können Mikrotubuli, welche von Kinesin-Motoren bewegt werden, mit genügend Kontrast von  $\sim 3\text{--}5\%$  gegenüber des Hintergrundes detektiert werden.

Das spezifische Binden von Ladung spielt eine Schlüsselrolle in einem Transportsystem und wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe biologischer Wechselwirkungen, wie Biotin–Streptavidin, Antikörper–Antigen und DNA–DNA, untersucht. Mittels solcher Interaktionen konnte Ladung im Nano- und Mikrometerbereich spezifisch auf molekularen Shuttles adsorbiert und transportiert werden. Da die Kinesin Motorproteine auf der Oberfläche zufällig ausgerichtet sind, ist die resultierende Bewegung der Mikrotubuli orientierungslos. Aus diesem Grund wurden offene Kanäle im Mikrometerbereich angewendet, welche die Bewegung der Shuttles lenken sollen. In einem neuen Fabrikationsverfahren konnten die Dimensionen der Überhang-Struktur der Kanäle, eine Struktureigenschaft, die die Führung der Mikrotubuli-Bewegung optimiert, auf einfache Weise einstellbar gemacht werden. Die Charakterisierung des Transports von 40 nm Goldpartikel durch die molekularen Shuttles in diesen Kanälen konnte schlussendlich einen Zusammenhang zwischen der Zunahme des Ladungsverlusts und der Krümmung der Kanäle hervorbringen.

Das Beladen von funktionalisierten Mikrotubuli mit Ladung dispergiert in Lösung ist einfach und effektiv. Dabei fehlt allerdings die räumliche Trennung des Ursprungs des Beladens und des Zielorts. Wir haben deshalb versucht, Ladestationen räumlich getrennt auf Oberflächen zu erstellen, die unter unbelasteten Bedingungen langzeitstabil sind, aber Ladung spontan an molekulare Shuttles abgeben, wenn diese damit in Kontakt kommen. Goldpartikel mit einem Durchmesser von 40 nm, über DNA–DNA Wechselwirkung an die Oberfläche gebunden, konnten erfolgreich aufgelesen werden. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Präsenz von Motoren innerhalb der Ladestationen unerlässlich ist, wenn Ladung effizient aufgelesen werden soll. Dies ist auch der Fall, wenn die Durchschnittslänge der Mikrotubuli die Breite der Ladestationen um das Vierfache übersteigt. Zum Schluss haben wir versucht, die Ladestationen in ein mikrofabriziertes Kanalsystem zu integrieren, um die kontrollierte Bewegung der Mikrotubuli, das Auflesen sowie den Transport von Ladung in einem System zu kombinieren. Sowohl das spezifischen Auflesen von Ladung innerhalb der Kanäle als auch das Lenken der molekularen Shuttles

in dieser Umgebung gelangen. Allerdings war die durchschnittliche Transportlänge der Ladung nach dem Auflösen mit ungefähr  $16 \mu\text{m}$  noch unterhalb der Anforderungen eines angestrebten *in vitro* Transportsystems. Ein funktionierendes und effizientes Komplett-design eines solchen Transportsystems benötigt in Zukunft deshalb weitere Optimierung und Entwicklung.

Zusammenfassend konnten wir verschiedene Designkonzepte und -prinzipien erarbeiten, die für die Weiterentwicklung eines auf molekularen Shuttles basierenden Transportsystems wertvoll sind. Die Kombination der Schlüsselemente Auflösen und Transport von Ladung sowie Kontrolle der Bewegung der Shuttles, wie sie hier präsentiert wurde, ist ein wichtiger Schritt in Richtung eines Gesamtdesigns.