

DISS. ETH NO.: 19325

Treatise on the Formation and Sensing of Lipid Structures on Nanofabricated Arrays

A dissertation submitted to
ETH ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Karthik Kumar

Diplom-Ingenieur Univ., Maschineningenieurwesen, TU München

born on 21st May, 1979

citizen of Singapore

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner
Prof. Dr. Erik Reimhult, co-examiner
Prof. Dr. Fredrik Höök, co-examiner
Prof. Dr. Janos Vörös, co-examiner

2010

Abstract

Cell membranes are vital components of cells in or at which a large fraction of cellular processes occur. Due to their complexity there is a drive to find reductionist model systems with which to address both fundamental biological questions regarding the organization and function of membrane constituents, and to implement them in industrial processes such as sensing and drug discovery. For the latter it is especially important to create membrane scaffolds that allow incorporation of functional membrane proteins.

Supported lipid bilayers (SLBs) are surface-associated, 2-dimensional scaffold constructs that mimic native cell membranes. These scaffolds have been studied for close to five decades, as they could potentially provide a lipid membrane environment for the study of the abovementioned membrane proteins such as transporters and G-protein coupled receptors (GPCRs). The main structural component of SLBs is lipids, which are amphiphilic molecules that self-assemble into a bilayer structure upon contact with water. SLBs can be formed by a variety of methods, one of which is the spontaneous rupture of liposomes (lipid bilayer vesicles with aqueous interior) onto suitable surfaces such as silica and titania, and the further coalescence into a continuous SLB. SLBs formed via the rupture of liposomes are generally free of organic solvents that could affect the proper functioning of membrane proteins within SLBs adversely.

SLBs are typically 4-5 nm thick; however membrane proteins of interest have thicknesses of 7-8 nm, which when incorporated into the thinner SLBs may denature upon contact with an underlying substrate. In order to use SLBs as membrane protein scaffolds, it is necessary to decouple the SLB from the surface. Nanopore arrays etched into SLB promoting substrates provide an ideal platform for the spontaneous formation of nanopore spanning lipid bilayers (npsLBs), by providing both stability to the planar lipid bilayer and providing sufficient space for the incorporation of large membrane proteins. The patterning of such nanopore arrays where the nanoscale feature size and nearest-neighbour separation can be controlled independently over large areas, but their subsequent fabrication however

remains challenging.

SLBs can be characterized by a host of techniques such as fluorescence microscopy, scanning probe microscopy, impedance spectroscopy, optical evanescent sensing techniques and gravimetric sensing techniques. Most of these methods however lack spatial selectivity to sense differences between SLBs on unstructured and structured surfaces. Near-field probe techniques such as atomic force microscopy that do have high spatial selectivity are slow in acquiring data and the probes used may interact with the SLBs on the structured surfaces. Electrochemical methods are typically very sensitive to defects in SLBs (defect-free SLBs are highly insulating), and hence leakage currents may be observed if the SLB is not completely defect free, complicating the collection of data on arrays with less than total npsLB coverage. There is thus a need for a characterization method that can be used to detect npsLBs specifically over nanopores. The characterization method should ideally not only be able to sense events occurring at the npsLB; for future measurements of transport across the npsLBs, the method must also be able to detect changes within the nanopores. A possible sensing scheme is provided by nanoplasmonic sensor structures, whose geometries can be tuned to achieve these goals.

This thesis is divided into three interrelated sections. The first section describes the fabrication of nanopore arrays in silicon nitride. High-aspect ratio nanopores (20:1, height:diameter) in silicon nitride were patterned via particle lithography and nanofabricated using standard cleanroom processes. The nanopores were shown to be through-pores via electron microscopy and cyclic voltammetry, and the use of such substrates for combined waveguide spectroscopy and electrochemical sensing for potential use as an npsLB sensor demonstrated.

In the second section, the efforts towards the formation of npsLBs via liposome rupture and fusion on silicon nitride nanopore arrays are described. Anionic vesicles were allowed to rupture and form SLBs and npsLBs on the aforementioned silicon nitride nanopore arrays and observed using gravimetric methods, near-field probe methods and confocal fluorescence microscopy. Confocal fluorescence microscopy proved to be the most reliable technique for the observation of npsLBs. Image analysis was used to quantify the success rate of npsLB formation. A theoretical investigation of the thermodynamic equilibrium for lipid membranes on top of nanopores and kinetic barriers to entry of membranes into nanopores based on considerations of adhesion and bending energies for supported membranes is also presented. These models attempt to explain the existence but not complete coverage of npsLBs over all the nanopores present.

Finally, an embedded, asymmetric, nanoplasmonic structure that can be used in conjunction with npsLB investigations is described. Nanocone-like structures were deposited within the nanopores of the arrays mentioned above. Experiments confirmed by simulations showed that two plasmonic modes could be excited when the structures are obliquely illuminated with polarized light. The two modes, which are localized to different parts of the nanocone react independently to changes in their respective local refractive indices, allowing the simultaneous sensing of interactions at two geometrically distinct parts of the sensor. The bulk refractive index sensitivity of both modes were obtained from experiments with glycerol-water mixtures. A model biosensing experiment was also conducted, which exploited the dual sensing capability, the size-selectivity offered by the sensor geometry and the possibility to chemically modify the nanocone and nanopores differently for specific binding of lipid membrane structures to the nanocones.

Through the development of fabrication, molecular assembly and sensing concepts, the work performed in this thesis offers unique strategies to form and sense solvent-free npsLBs. The plasmonic sensor platform may then in a further future development be used to characterize the incorporation and function of membrane proteins such as transporters within npsLBs.

Zusammenfassung

Zellmembranen sind ein wesentlicher Bestandteil von Zellen wo ein großer Teil der zellulären Prozessen auftreten. Aufgrund ihrer Komplexität herrscht der Bedarf zu reduktionistischen Modellsysteme, mit denen sowohl Antworten auf grundlegende biologische Fragen der Organisation und Funktion der Membranbestandteile zu finden sind als auch ihre Implementierung in industriellen Prozessen wie Sensor- und Wirkstoffforschung zu untersuchen ist. Für die letzteren ist es besonders wichtig, dass die hergestellte Membranträger das Einfügen funktionellen Membranproteinen erlauben.

Unterstützte Lipiddoppelschichten (uLD) sind oberflächenassoziierte 2-dimensionale Gerüste, die natürlichen Zellmembranen ähneln. Diese Gerüste werden seit fast fünf Jahrzehnten untersucht, da sie sich möglicherweise als ein potentielles Lipidmembran-Umfeld für die Untersuchung von den obengenannten Membranproteinen wie Transporterproteinen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPGR) anbieten. Die wichtigste strukturelle Komponente der uLD sind amphiphile Lipide, die sich bei Kontakt mit Wasser spontan in eine Doppelschichtstruktur organisieren. uLD können durch eine Vielzahl von Methoden hergestellt werden, wie zum Beispiel durch spontanes Aufspalten von Liposomen (Vesikel aus Lipiddoppelschichten mit wässrigem Innenraum) auf geeigneten Oberflächen wie Siliziumdioxid und Titandioxid und ihre Verschmelzung zu einem kontinuierlichen uLD zusammenwächst. uLD, die durch Aufspaltung von Vesikel gebildet werden, sind in der Regel frei von organischen Lösungsmitteln, welche die Funktion von Membranproteinen negativ beeinflussen könnten.

uLD haben eine typische Dicke von 4-5 nm, die interessante Membranproteine haben jedoch eine Dicke von 7-8 nm. Diese Membranproteine laufen deshalb Gefahr zu denaturieren wenn sie in die dünneren uLD eingefügt werden und mit dem Substrat wechselwirken. Um uLD als Träger für Membranproteine zu verwenden ist es notwendig die uLD von der Oberfläche zu entkoppeln. Nanoporenarrays werden durch Ätzen in Materialien hergestellt, welche SLB Formation ermöglichen und bieten eine ideale Plattform für die spontane Bildung von Lipiddoppel-

schichten, welche Nanoporen überspannen (npuLD), indem sie sowohl verbesserte Stabilität der planaren Lipiddoppelschicht als auch ausreichend Platz für die Aufnahme von grossen Membranproteinen bieten. Die Entwicklung und anschliessende Herstellung solcher Nanoporearrays, welche die Strukturgrösse und den Abstand zur nächsten Nachbarstruktur unabhängig über grösseren Bereichen kontrollierbar macht, bleibt jedoch eine Herausforderung.

uLD können durch eine Vielzahl von Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie, Rastersondenmikroskopie, Impedanzspektroskopie, optisch-evaneszente und gravimetrische Messtechniken charakterisiert werden. Die meisten dieser Methoden haben jedoch in der Regel keine geeignete räumliche Selektivität um Unterschiede zwischen uLD auf unstrukturierten und strukturierten Oberflächen wahrzunehmen. Nahfeldsondenmethoden wie Atomkraftmikroskopie, die eine hohe räumliche Selektivität aufweisen, sind langsam in der Datenerfassung und die verwendeten Sonden könnten mit den uLD auf den strukturierten Oberflächen wechselwirken. Elektrochemische Verfahren sind in der Regel sehr empfindlich auf Defekte in uLD (uLD ohne Defekte weisen einen hohen elektrischen Widerstand auf) und könnten somit zu Leckströme führen wenn die uLD nicht defektfrei sind und erschweren dadurch die Datenaufnahme mit inkompletten npuLD über Nanoporen. Es besteht somit der Bedarf für eine Charakterisierungsmethode zur npuLD Erkennung, besonders für Nanoporen. Die Charakterisierungsmethode sollte im Idealfall nicht nur in der Lage sein Ereignisse direkt an npuLD sondern auch den Transport durch npuLD und Veränderungen innerhalb der Nanoporen zu messen. Ein mögliches Charakterisierungssystem um solche Ziele zu erreichen sind nanoplasmonische Sensorstrukturen mit abstimmbarer Geometrie.

Diese Dissertation ist in drei zusammenhängende Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt beschreibt die Herstellung von Nanoporearrays in Siliziumnitrid. Nanoporen mit hohem Aspektverhältnis (20:1, Höhe: Durchmesser) wurden durch Partikel-Lithografie auf Siliziumnitrid hergestellt und mit Standardreinraumprozessen verarbeitet. Dass die Nanoporen durchgehend bis zum unteren Substrat durchgeätzt waren wurde durch Rasterelektronenmikroskopie und zyklische Voltammetrie gezeigt. Auch die Nützlichkeit von solchen Substraten wurden durch kombinierte Wellenleiterspektroskopie und elektrochemischen Untersuchungen auch gezeigt.

Im zweiten Abschnitt wird die Bildung von npuLD durch Aufspalten von Liposomen auf Siliziumnitrid-Nanoporearrays beschrieben. Anionische Vesikel wurden verwendet um uLD und npuLD auf den obengenannten Siliziumnitrid-Nanoporearrays zu bilden und mittels gravimetrischer Methoden, Nahfeldsondenmethoden

und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie erwies sich als die zuverlässigste Methode zur Beobachtung der npuLD. Bildanalysemethoden wurden verwendet um die Häufigkeit der npuLD Bildung zu quantifizieren. Eine theoretische Untersuchung des thermodynamischen Gleichgewichtes für Lipidmembranen auf Nanoporen und die kinetische Barrierenhöhe für den Zutritt von Membranen in Nanoporen basierend auf Überlegungen der Adhäsionsenergien und Biegeenergien von unterstützte Membranen wird vorgestellt. Diese Untersuchung versucht die partielle Existenz von npuLD über Nanoporen zu erklären.

Schließlich wird eine eingebettete, asymmetrische, nanoplasmonische Struktur, die in Verbindung mit npuLD Untersuchungen verwendet werden könnte beschrieben. Kegelhähnliche Strukturen wurden im Inneren der Nanoporen den in den oben erwähnten Nanoporenarrays abgeschieden. Experimenten und Simulationen zeigten auch, dass zwei plasmonische Modi angeregt werden könnten, wenn die Strukturen schräg mit polarisiertem Licht beleuchtet werden. Die zwei Modi, die an verschiedenen Teilen des Nanokegels lokalisiert sind, reagieren unabhängig auf Veränderungen in ihrem jeweiligen lokalen Brechungsindex, sodass die gleichzeitige Erfassung von Interaktionen an zwei geometrisch verschiedenen Orten des Sensors möglich ist. Die Empfindlichkeit von Brechungsindexänderungen der beiden Modi wurden anhand von Versuchen mit Glycerin-Wassermischungen bestimmt. Ein Musterbiosensorikexperiment wurde ebenfalls durchgeführt, welches die Fähigkeit der Nanokegel aufzeigt, Veränderungen an zwei unabhängigen Orten zu messen. Ausserdem wurde gezeigt, wie die Größenselektivität durch die Nanoporenöffnungen und die Präsenz eines Kegels in den Nanoporen zur unterschiedlichen chemischen Modifizierung der Kegel und Nanoporen für bestimmte Zwecke ausgenutzt werden kann.

Die Resultate solcher Nanosensorarrays, welche in dieser Arbeit präsentiert werden, bieten eine einzigartige Strategie lösemittelfreie npuLD zu messen und zu charakterisieren. Das plasmonische Sensorplattform dürfte in Zukunft in der Lage sein das Einfügen und die korrekte Funktion der Membranproteinen in npuLD zu charakterisieren.