

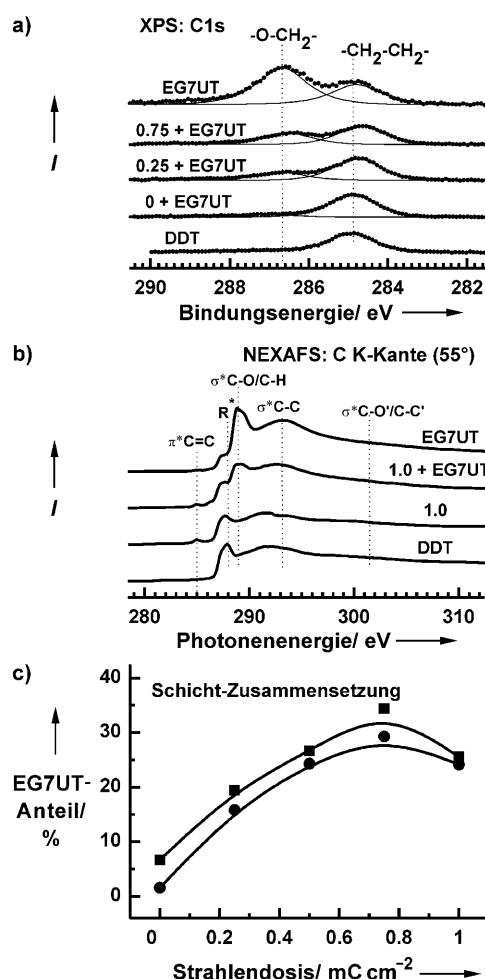
# Herstellung mikroskaliger Proteinresistenzgradienten durch Elektronenstrahl-Lithographie\*\*

Tobias Winkler, Nirmalya Ballav, Heidi Thomas, Michael Zharnikov\* und Andreas Terfort\*

Gradienten sind ein wichtiges Phänomen der Biologie. Sie sind die Ursache für eine Reihe von Orientierungsvorgängen und gerichteten Bewegungen, wie der Photo- oder Chemo-taxis, und sind ebenfalls essenziell für die Gewinnung von Energie oder Schlüsselmolekülen. An Oberflächen können Konzentrationsgradienten die Morphogenese, die Ausrichtung oder gar die aktive Bewegung von Zellen (Haptotaxis) steuern und spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Zellentwicklung. Typische Haptomere sind Adhäsionsproteine, deren Oberflächenkonzentrationsgradienten zum gewünschten Zellverhalten führen. Allgemein wird davon aus-gegangen, dass eine Zelle eine Konzentrationsdifferenz von 2–10% zwischen ihren beiden Zellseiten „spüren“ muss, um eine entsprechende biologische Reaktion zu zeigen.<sup>[1]</sup> Da typische Zellgrößen sich zwischen etwa 2 (Bakterien) und 20 µm (eukaryotische Zellen) bewegen, werden offensichtlich relativ steile Proteinkonzentrationsgradienten notwendig, deren künstliche Herstellung nach innovativen Methoden der Mikro- und Nanotechnologie verlangt.<sup>[2]</sup>

Selbstorganisierende Monoschichten (SAMs) ermöglichen die sehr genaue Einstellung von Oberflächeneigenschaften und wurden daher schon oft zur Herstellung chemischer Gradienten genutzt. Üblicherweise werden diese Gradienten durch lokalisierte Abmischung zweier Molekülarten mithilfe ein- oder zweistufiger Verfahren hergestellt, z.B. mithilfe elektrochemischer Potentialgradienten,<sup>[3,4]</sup> zeitlich kontrollierter Exposition,<sup>[5]</sup> diffusionskontrollierten Mikrostempelns<sup>[6]</sup> oder Interdiffusionsverfahren entweder in der Gasphase<sup>[7,8]</sup> oder in Gelen.<sup>[9,10]</sup> Diese Verfahren ermöglichen allerdings nur die Herstellung von Gradienten im Millimeter- oder gar Zentimetermaßstab, die dementsprechend flach sind. Mit mikrofluidischen Aufbauten kann die Gradienten-

länge bis in den Mikrometerbereich miniaturisiert werden. Dadurch werden die Gradienten deutlich steiler, allerdings ist nur eine geringe Strukturvielfalt erzielbar.<sup>[11,12]</sup> Andere Strategien, die auf elektrochemische Rastertunnelmikroskopie<sup>[13]</sup> oder UV-Lithographie entweder für den graduellen Abbau<sup>[14,15]</sup> oder die Erweiterung<sup>[16]</sup> von SAMs setzen, sind ebenfalls auf bestimmte Muster oder Größenordnungen limitiert.



**Abbildung 1.** a) C1s-XP-Spektren und b) C-K-Kanten-NEXAFS-Spektren (Einfallsinkel 55°) von DDT-SAMs, die entweder nur bestrahlt wurden (nur NEXAFS) oder nacheinander bestrahlt (verschiedene Dosen) und 2 h in EG7UT/EtOH-Lösung getauft wurden. Zum Vergleich sind die Spektren nativer DDT- und EG7UT-SAMs sowie das C1s-Spektrum einer DDT-SAM, die unbestrahlt mit der EG7UT/EtOH-Lösung behandelt wurde, abgebildet. Die jeweilige Strahlendosis (in mC cm<sup>-2</sup>) ist direkt an den Kurven angegeben. c) Die relative Zusammensetzung der gemischten SAMs, wie sie aus den C1s- (■) und O1s-XP-Spektren (●) abgeleitet wurde.

[\*] N. Ballav, Dr. M. Zharnikov  
Angewandte Physikalische Chemie, Universität Heidelberg  
69120 Heidelberg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6221-546-199  
E-Mail: Michael.Zharnikov@urz.uni-heidelberg.de

T. Winkler, H. Thomas, Prof. Dr. A. Terfort  
Fachbereich Chemie, Universität Marburg  
35032 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6421-282-5690  
E-Mail: aterfort@chemie.uni-marburg.de

[\*\*] T.W., N.B. und H.T. trugen gleichwertig zu dieser Arbeit bei. Dieses Projekt wurde durch die DFG gefördert (ZH 63/9-2 und Te 247/6-2). N.B. und M.Z. danken M. Grunze für seine Unterstützung, S. Schilp für die Hilfe bei der Elektronenstrahl-Lithographie, C. Wöll für die technische Kooperation an BESSY II sowie den BESSY-II-Mitarbeitern für ihre Hilfe.

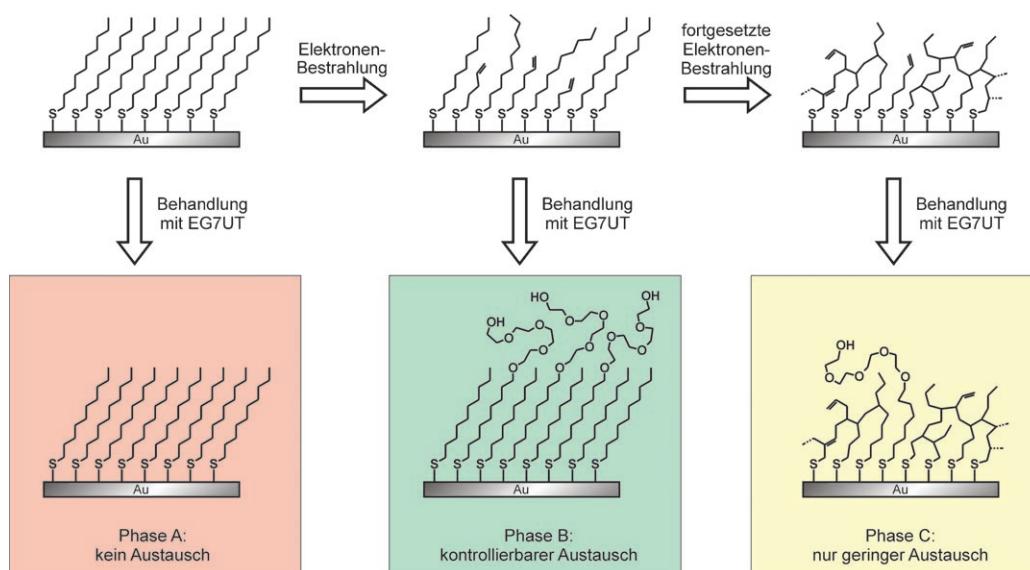
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200800810> zu finden.

Wir stellen hier eine Methode vor, mit der mikrometergroße Bioresistenzgradienten hergestellt werden können. Diese Methode beruht auf der strahlungsinduzierten Austauschreaktion (irradiation-promoted exchange reaction, IPER) an selbstorganisierenden Monoschichten.<sup>[17-19]</sup> Wie wir und andere zuvor demonstriert haben, werden Thiolat-basierte SAMs auf Gold durch Röntgenstrahlung,<sup>[20,21]</sup> UV-Licht<sup>[22,23]</sup> oder Elektronenbeschuss<sup>[18,24-26]</sup> geschädigt, wobei Konformations- und Orientierungsdefekte sowie Bindungsbrüche auftreten. Die betroffenen Moleküle lassen sich relativ leicht aus der Monoschicht entfernen oder durch andere, ebenfalls zur Bindung befähigte Moleküle ersetzen, wobei so genannte gemischte SAMs entstehen. Das Ausmaß dieses Austauschs (d.h. die Zusammensetzung der gemischten SAM) kann durch die Strahlendosis graduell variiert werden. Wir wollten untersuchen, ob durch die Verwendung von Elektronenstrahl-Lithographie der IPER-Prozess miniaturisiert werden kann und sich auf diese Weise Bioresistenzgradienten herstellen lassen. Von besonderem Interesse ist es, die Ausmaße der Gradienten bis auf die Größe von Zellen, also einige Mikrometer, zu reduzieren, da die Gradienten andernfalls zu flach ausfallen würden, um von Einzelzellen als solche erkannt zu werden.

Um die generelle Eignung des IPER-Prozesses zur Erzeugung gradueller Bioresistenz zu untersuchen, wurden orientierende Experimente an gleichförmig bestrahlten Monoschichten durchgeführt. Dazu wurden Dodecanthiolat-SAMs (DDT-SAMs) auf Gold mit unterschiedlichen Dosen niederenergetischer Elektronen (10 eV) unter Hochvakuumbedingungen bestrahlt. Die anschließende Austauschreaktion erfolgte durch zweistündiges Eintauchen in eine Ethanol-Lösung von Heptaethylenglycol-terminiertem Undecanethiol ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$ , EG7UT), einem Molekül, das bioresistente Monoschichten zu bilden vermag. Die so entstandenen, gemischten Monoschichten wurden

durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und NEXAFS-Spektroskopie (Nahkanten-Röntgenabsorptionsfeinstruktur) untersucht. Insbesondere XPS ermöglicht die Verfolgung der Austauschreaktion, da das C-1s-Signal der Kohlenstoffatome in der Alkankette ( $\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$ ) eindeutig von dem der Kohlenstoffatome im Ethylenglycol(EG)-Teil ( $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}$ ) der bioresistenten Moleküle unterschieden werden kann. In Abbildung 1 sind die C-1s-XP-Spektren einer nativen DDT- und einer nativen EG7UT-SAM sowie die Spektren der IPER-prozessierten DDT-Monoschichten mit EG7UT als Substituent dargestellt. Das Ausmaß der Austauschreaktion lässt sich durch die Bestrahlung steuern: Während bei unbestrahlten DDT-Schichten fast kein Austausch stattfindet, steigt die Menge an eingebautem EG7UT mit zunehmender Elektronendosis bis zu einem bestimmten Niveau (etwa 30 %, siehe Abbildung 1 c); bei höheren Dosen ist die Substitution gehindert. Zum gleichen Resultat führen die O-1s-XP-Spektren (siehe Hintergrundinformationen) sowie die in Abbildung 1 b gezeigten C-K-Kanten-NEXAFS-Spektren.

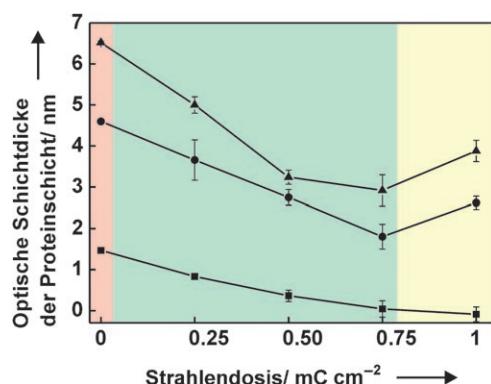
Die C-K-Kanten-NEXAFS-Spektren geben zudem Hinweise auf die Primärprozesse des IPER-Verfahrens. Das beobachtete Sättigungsverhalten lässt sich durch zwei konkurrierende elektroneninduzierte Prozesse erklären: 1) Der schnellere Prozess umfasst die Spaltung von C-H-, C-C- und S-Au-Bindungen sowie die Erzeugung von Konformations- und Orientierungsdefekten.<sup>[26]</sup> Dies bewirkt eine Verringerung der Bindung der betroffenen Moleküle zum Substrat und zu ihren unmittelbaren Nachbarn. Diese Moleküle lassen sich deswegen relativ leicht durch externe Moleküle im nachfolgenden, nasschemischen Schritt ersetzen.<sup>[18]</sup> 2) Der langsamere Prozess, der erst bei höheren Strahlendosen relevant wird, ist die Vernetzung der SAM durch intermolekulare C-C-Verknüpfung,<sup>[26]</sup> wodurch der Austausch mit externen Molekülen gehindert wird.<sup>[18]</sup> Dies zeigt Abbildung 2,



**Abbildung 2.** Der molekulare Mechanismus des IPER-Prozesses. Während mit nativer DDT-SAM kaum eine Substitution durch EG7UT-Moleküle stattfindet (Phase A, rot), ermöglichen die durch die Bestrahlung induzierten Defekte die Austauschreaktion mit EG7UT (Phase B, grün). Nach längerer Bestrahlung wird die Vernetzungsreaktion zwischen den Molekülen signifikant und verhindert so zumindest teilweise die Austauschreaktion (Phase C, gelb). Derselbe Farbcodeword wird in den nachfolgenden Abbildungen zur Kennzeichnung der verschiedenen Phasen verwendet.

in der auch die Fälle der unbestrahlten sowie der mit niedrigen Dosen bestrahlten SAMs dargestellt sind. In der Folge werden wir uns immer auf den Zustand nach der Bestrahlung beziehen und nennen den unbestrahlten Zustand Phase A (rot hinterlegt), den Zustand mit einer positiven Korrelation zwischen der Strahlendosis und dem Ausmaß der Austauschreaktion Phase B (grün) und den Zustand des vernetzten Films Phase C (gelb).

Zur Untersuchung der Bioresistenz der Schichten nach Bestrahlung und Eintauchen wurden verschiedene Proteine als Modellsysteme verwendet (Untersuchungen mit Zellen werden folgen). In der Tat wurde eine starke Abhängigkeit der Proteinschichtdicke von der Strahlendosis gefunden (Abbildung 3): Bei kleinen Dosen wird die Oberfläche mit



**Abbildung 3.** Die optische Schichtdicke des adsorbierten Proteinfilms auf den IPER-prozessierten SAMs in Abhängigkeit von der Strahlendosis (10-eV-Elektronen); ■ BSA, ●  $\gamma$ -Globulin, ▲ Fibrinogen. Das Minimum bei etwa  $0.75 \text{ mC cm}^{-2}$  für die Fibrinogen- und Globulin-Kurven zeigt den Übergang von der Phase B zur Phase C an. Siehe auch Abbildung 1c zur Schichtzusammensetzung an den betreffenden Punkten.

zunehmender Dosis immer proteinresistenter, bis bei etwa  $0.75 \text{ mC cm}^{-2}$  ein Optimum erreicht wird, was allerdings nur für das Rinderserumalbumin (BSA) eine vollständige Bioresistenz bedeutet. Die beiden anderen untersuchten Proteine, Fibrinogen und  $\gamma$ -Globulin, sind offensichtlich deutlich adhäsiver, weshalb die Schichtdicke ihrer jeweiligen Schichten nur auf etwa 45 % des Wertes für eine unbehandelte DDT-SAM reduziert werden konnte. Dieser Wert stimmt sehr gut mit Befunden überein, die Prime und Whitesides für gemischte, aus Lösung abgeschiedene Monoschichten (ohne Gradienten) erhielten: Auf einer Schicht, die aus 70 % Undecanthon und 30 % des etwas kürzeren EG6UT bestand (und damit dem EG-Thiol-Gehalt entsprach, der bei einer Dosis von  $0.75 \text{ mC cm}^{-2}$  erzielbar ist), wurde etwa halb soviel Fibrinogen abgeschieden wie auf einer reinen Undecanthon-SAM.<sup>[27]</sup>

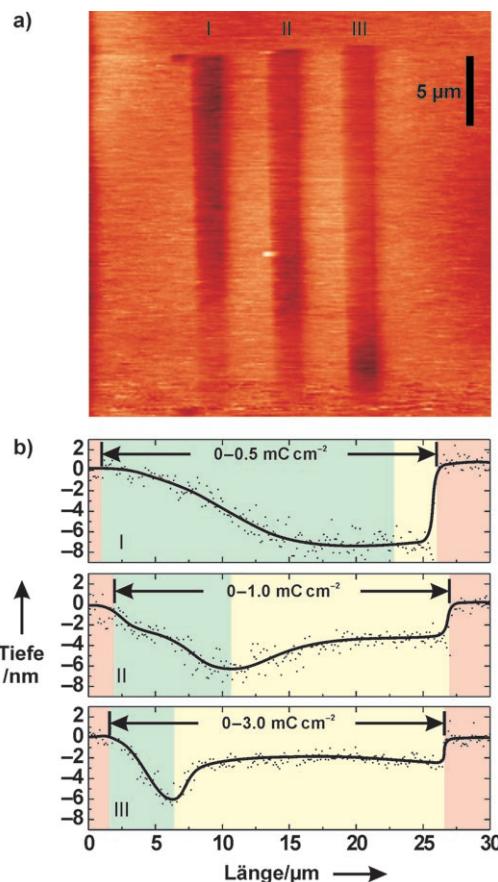
Allerdings haben gemischte Monoschichten, die durch Eintauchen in eine gemischte Thiol-Lösung<sup>[27]</sup> oder durch Interdiffusion der Komponenten hergestellt wurden, (mindestens) zwei Nachteile: Es ist keine exakte Steuerung der lokalen Zusammensetzung möglich, und die Moleküle können innerhalb der Schichten zu Domänen segregieren. Im Unterschied dazu zeichnen sich die durch IPER hergestellten, gemischten DDT-/EG7UT-Schichten wahrscheinlich durch

eine molekulare Durchmischung aus, da die strahlungsinduzierten Defekte, an denen der Austausch stattfindet, statistisch über den Film verteilt sind. Die Fokussierbarkeit der Elektronenstrahlen ermöglicht zudem eine lokale Einstellung der Austauscheffizienz – und damit in unserem Fall auch der Proteinresistenz – auf verschiedenen Längenskalen bis hinunter in die Größenordnung von Zellen, also typischerweise einige Mikrometer.

Für die Fokussierung nutzten wir den Elektronenstrahl (1 keV) eines Rasterelektronenmikroskops, ausgerüstet mit einer Schreibeinheit (pattern generator), mit dem sich Gradientenlinien in die DDT-Schichten schreiben ließen. Diesem Schreibprozess folgte die Entwicklung des Musters durch Eintauchen in die EG7UT-Lösung in der bereits beschriebenen Weise, bevor das Adsorptionsverhalten der so erzeugten Gradienten gegenüber Proteinen ermittelt wurde. Rasterelektronenmikroskopische (AFM)-Aufnahmen (Abbildung 4a) zeigen die erzeugten Streifen von  $3 \mu\text{m}$  Breite und  $25 \mu\text{m}$  Länge deutlich als Furchen in einer Umgebung, die komplett von einer dicken Proteinschicht bedeckt ist, da es sich hier ja um eine unbestrahlte DDT-SAM (Phase A) handelt. Zusätzlich zur Furchenbildung, die für Proteinresistenz spricht, fällt auch ein ausgeprägtes Minimum auf, das sich in Furchen mit unterschiedlichen Gradienten an unterschiedlichen Stellen befindet. Dieses Minimum der Proteinaffinität (d.h. Maximum der Proteinresistenz) findet sich jeweils an Stellen, die einer Strahlendosis von etwa  $0.3 \text{ mC cm}^{-2}$  ausgesetzt waren (Abbildung 4b). Dieser Wert ist etwa um den Faktor 2.5 kleiner als die optimale Dosis, die in den Experimenten mit den gleichförmig bestrahlten Schichten ermittelt wurde, was durch die unterschiedliche Primärenergie der jeweils verwendeten Elektronen erklärbar ist (1 keV gegenüber 10 eV).<sup>[28]</sup>

Während die Abnahme der Proteinschichtdicke im Bereich niedriger Strahlendosen stetig mit der Dosis korreliert (Phase B), ist die Situation auf der anderen Seite der Minima komplexer: Die Proteinresistenz nimmt nach dem Durchlaufen zunächst ab, bis ein Niveau erreicht ist, auf dem während der Bestrahlung die austauschfördernde Defektbildung und die austauschhindernde Vernetzung (Phase C) offensichtlich ein dynamisches Gleichgewicht erreichen. Bei sehr hohen Strahlendosen ( $> 2 \text{ mC cm}^{-2}$ ) scheint die Defektbildung erneut so signifikant zu werden (kompletter Abbau der Schicht), dass wieder neue Adsorptionsplätze für die EG7UT-Moleküle frei werden, sodass die Proteinresistenz wieder leicht zunimmt. Für zukünftige Anwendungen empfehlen wir jedoch, die Strahlendosen im Bereich der Phase B zu halten, in der die Flächendosis und die Proteinresistenz positiv korrelieren.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Kombination aus IPER und Elektronenstrahl-Lithographie eine geeignete Methode zur Erzeugung von Proteingradienten im Mikrometermaßstab ist. XPS- und NEXAFS-Untersuchungen haben bestätigt, dass es während des IPER-Prozesses zu einer strahlungsinduzierten Schädigung der SAM kommt und die Moleküle im bestrahlten Bereich leicht durch andere ersetzt werden können. Dies konnte anhand der Austauschreaktion mit einem proteinresistenten, Ethylenglycol-terminierten Thiol an bestrahlten DDT-SAMs gezeigt werden.



**Abbildung 4.** a) AFM-Aufnahme einer Proteinschicht, die durch Adsorption von Fibrinogen an ein durch Elektronenstrahl-Lithographie strukturiertes DDT/EG7UT-Templat hergestellt wurde. Die Strahlendosis wurde entlang der Streifen von 0–0.5 (I), 0–1 (II) und 0–3 mC cm<sup>-2</sup> (III) variiert. b) Höhenprofile entlang der Proteingradienten-Streifen (die Linien zeigen die entsprechenden Trends an). Die Adsorption des Proteins ist eindeutig eine Funktion des EG7UT-Anteils in der gemischten DDT/EG7UT-Schicht. Die Gradienten erscheinen als Furchen, da die nicht bestrahlte Matrix (unveränderte DDT-SAM) mit einer dicken Proteinschicht bedeckt ist.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass das Ausmaß der Austauschreaktion, und damit die Zusammensetzung der resultierenden SAM, präzise über die verwendete Strahlendosis gesteuert werden kann, wobei dieses Ausmaß durch die Konkurrenz zwischen der Defektstellenbildung und der Vernetzung in der Schicht bestimmt wird. Mit Elektronenstrahl-Lithographie können hoch reproduzierbar Gradienten beliebiger Steilheit geschrieben werden. Wir erwarten, dass dieses Verfahren für die Herstellung von Proteinchips verwendet werden kann und darüber hinaus die Untersuchung des Einflusses exakt definierter Gradienten auf die Morphogenese, Ausrichtung oder Chemotaxis lebender Zellen ermöglichen wird.

Eingegangen am 19. Februar 2008,  
veränderte Fassung am 17. Juni 2008  
Online veröffentlicht am 14. August 2008

**Stichwörter:** Bioresistenz · Oberflächenanalyse · Oberflächenchemie · Photoelektronenspektroskopie · Proteinadhäsion

- [1] B. Brandley, J. H. Sharper, R. L. Schnaar, *Dev. Biol.* **1990**, *140*, 161.
- [2] N. Sniadecki, R. A. Desai, S. A. Ruiz, C. S. Chen, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 59.
- [3] R. H. Terrill, K. M. Balss, Y. Zhang, W. P. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 988.
- [4] K. M. Balss, B. D. Coleman, C. H. Lansford, R. T. Haasch, P. W. Bohn, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8970.
- [5] N. V. Venkataraman, S. Zürcher, N. D. Spencer, *Langmuir* **2006**, *22*, 4184.
- [6] T. Kraus, R. Stutz, T. E. Balmer, H. Schmid, L. Malaquin, N. D. Spencer, H. Wolf, *Langmuir* **2005**, *21*, 7796.
- [7] M. K. Chaudhury, G. M. Whitesides, *Science* **1992**, *256*, 1539.
- [8] B. Zhao, *Langmuir* **2004**, *20*, 11748.
- [9] B. Liedberg, P. Tengvall, *Langmuir* **1995**, *11*, 3821.
- [10] M. Riepl, M. Östblom, I. Lundström, S. C. T. Svensson, A. W. Denier van der Gon, M. Schäferling, B. Liedberg, *Langmuir* **2005**, *21*, 1042.
- [11] S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, N. L. Jeon, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1240.
- [12] X. Jiang, Q. Xu, S. K. W. Dertinger, A. D. Stroock, T. Fu, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2338.
- [13] R. R. Fuierer, R. L. Carroll, D. L. Feldheim, C. B. Gorman, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 154.
- [14] K. Loos, S. B. Kennedy, N. Eidelman, Y. Tai, M. Zharnikov, E. J. Amis, A. Ulman, R. A. Gross, *Langmuir* **2005**, *21*, 5237.
- [15] P. Burgos, M. Geoghegan, G. J. Leggett, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3747.
- [16] C. B. Herbert, T. L. McLernon, C. L. Hypolite, D. N. Adams, L. Pikus, C.-C. Huang, G. B. Fields, P. C. Letourneau, M. D. Di Stefano, W.-S. Hu, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 731.
- [17] N. Ballav, A. Shaporenko, A. Terfort, M. Zharnikov, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 998.
- [18] N. Ballav, A. Shaporenko, S. Krakert, A. Terfort, M. Zharnikov, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 7772.
- [19] N. Ballav, T. Weidner, K. Rößler, H. Lang, M. Zharnikov, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 819.
- [20] R. Klauser, M.-L. Huang, S.-C. Wang, C.-H. Chen, T. J. Chuang, A. Terfort, M. Zharnikov, *Langmuir* **2004**, *20*, 2050.
- [21] R. Klauser, I.-H. Hong, S.-C. Wang, M. Zharnikov, A. Paul, A. Götzhäuser, A. Terfort, T. J. Chuang, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13133.
- [22] N. J. Brewer, S. Janusz, K. Critchley, S. D. Evans, G. J. Leggett, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 11247.
- [23] Y. Ito, M. Heydari, A. Hashimoto, T. Konno, A. Hirasawa, S. Hori, K. Kurita, A. Nakajima, *Langmuir* **2007**, *23*, 1845.
- [24] I. S. Maeng, J. W. Park, *Langmuir* **2003**, *19*, 4519.
- [25] E. Garand, P. A. Rowntree, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 12927.
- [26] M. Zharnikov, M. Grunze, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2002**, *20*, 1793.
- [27] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714.
- [28] M. Steenackers, A. Küller, N. Ballav, M. Zharnikov, M. Grunze, R. Jordan, *Small* **2007**, *3*, 1764.