

Doctoral Thesis ETH No. 18628

Smart Sensing with Beads and Vesicles: a Bioassay Toolbox for High-Performance Fluorescent Microarrays

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Marta Bally-Lenz

Dipl. Werkstoff-Ing. ETH

born on January 11, 1981

citizen of Lausanne (VD) and Rüti (ZH)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Janos Vörös, examiner

Dr. Markus Ehrat, co-examiner

Prof. Dr. Fredrik Höök, co-examiner

Prof. Dr. Marcus Textor, co-examiner

September, 2009

Abstract

A variety of fields including healthcare, defense, food and environmental monitoring calls for the development of highly efficient technologies for the detection of biomolecules. Microarrays are emerging as powerful bioanalytical tools capable of providing a high amount of biological information in short processing times. In spite of this widely acknowledged potential, several major challenges have so far delayed the spreading of this technology, especially in the area of protein detection. Difficulties arise from the chemical and structural diversity of these biomolecules and their susceptibility to denaturation. Moreover, biological samples are often available in limited amounts and contain a great variety of proteins present at concentrations over several orders of magnitude. It is often the case, that only a few copies of the most important marker proteins for diagnostics are present in a sample.

Thus, at present, highly sensitive and accurate assays are urgently needed to turn this promising technology into real commercial breakthrough. Additionally, there is a demand for simple, user-oriented solutions that allow for flexibility in bioassay choice. These requirements can only be satisfied by applying bioanalytical assays with signal amplification capability to highly optimized proteomic chips and extremely sensitive transducer systems.

The aim of this thesis is to provide an assay toolbox towards highly sensitive, flexible and multiplexed sensing platforms. Micro- and nano-scale objects such as polymeric particles or phospholipid vesicles are the main components of our novel assays. We focus on protein microarray technology and on compatibility with state-of-the-art optical fluorescence-based devices, which are currently widely used in the field.

Beads and vesicles can contribute to the development of new bioanalytical tools, in a number of ways: these micro- and nano-objects can be used as vehicles for biorecognition

reactions in solution, they can provide three-dimensional networks for an increased loading capacity, and if fluorescent, can act as labels to increase signal intensity. Additionally, the potential of phospholipid vesicles in the development of membrane protein sensing platforms is undisputable, due to the cell membrane-like nature of these self-assembled nanocontainers. Keeping these general properties in mind, we have developed in this thesis three assay types which demonstrate the contribution of beads and vesicles towards high-performance fluorescent biosensors.

Initial focus was on the role of phospholipid vesicles in membrane protein sensing. We have developed an oligonucleotide microarray that can be transformed into a vesicle array by DNA-directed surface immobilization of the liposomes. Our platform led to the creation of heterogeneous arrays of both synthetic and native liposomes carrying membrane proteins. In a different approach, we investigated the interactions between the multivalent Zr^{4+} cation and phospholipids. We demonstrate that a stable but reversible linkage is formed and took advantage of this bond to create multilayers of phospholipid vesicles. These constructs can contribute to increase the sensor's loading capacity and ultimately its sensitivity as is demonstrated here.

In a second assay setup, we used biofunctional micro- and nano-scale fluorescent labels for the generation of a strong optical signal. We first investigated the potential of microparticles in assays based on fluidic forces to discriminate specific particle binding from non-specific binding effects. With this approach, we reduced the particle background noise to less than one particle/spot thus making, from an instrumental point of view, the detection of single binding events possible. We also introduced non-fouling phospholipid vesicles as alternative labels. We succeeded in maintaining the background noise low and reported up to a 100-fold increase in assay sensitivity compared to conventional methods using fluorescently labeled reported molecules. In both cases, we focused on reverse phase model assays which are likely to greatly benefit from amplification strategies aimed at low protein concentrations.

In the last part of this thesis we present novel flexible microarray platforms. Here, microbeads were the vehicles for biorecognition. Firstly, we engineered an array manufacturing process leading to the production of a large number of arrays without any specialized instrumentation: multiple chip copies were obtained by slicing three dimensional stacks of particle layers embedded in a permeable gel matrix. We also created a multichannel microfluidic device for the immobilization of biofunctional beads which

conducted to the creation of a protein microarray with an integrated reagent delivery system.

Each assay presented here, has the potential of contributing to the development of high-performance fluorescent biosensors by providing optimized means for protein immobilization, versatile assays for signal amplification, and user-oriented solutions towards flexible microarray platforms.

Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Bereichen wie das Gesundheits- oder das Verteidigungswesen, die Lebensmittel- oder die Umweltüberwachung erfordert die Entwicklung von hoch effizienten Technologien für den Nachweis von Biomolekülen. Microarrays stellen eine leistungsstarke bioanalytischen Methode dar, und sind in der Lage, ein hohes Maß an biologischer Information bei kurzen Durchlaufzeiten zu liefern. Trotz dieses weithin anerkannten Potenzials, haben verschiedene Unzulänglichkeiten, vor allem im Bereich der Proteinerkennung, die Verbreitung dieser Technologie bisher verzögert. Schwierigkeiten ergeben sich aus der chemischen und der strukturellen Vielfalt der Biomoleküle und deren Anfälligkeit für Denaturierung. Darüber hinaus sind biologische Proben häufig nur in begrenzten Mengen verfügbar und enthalten eine Vielzahl von Proteinen, deren Konzentration sich über mehrere Größenordnungen erstrecken kann. Es kann außerdem vorkommen, dass nur einige wenige Kopien eines diagnostisch relevanten Markerproteins in einer Probe präsent sind.

Um dieser vielversprechenden Technologie zu einem kommerziellen Durchbruch zu verhelfen, ist es notwendig hoch sensible und äussert präzise Assays zu entwickeln. Darüber hinaus besteht Bedarf an einfachen, benutzerfreundlichen Lösungen, welche Flexibilität in der Wahl des biologischen Systems ermöglichen. Diese Anforderungen können nur dadurch erfüllt werden, dass hochoptimierte Proteomchips mit Hilfe von signalverstärkten, bioanalytischen Assays ausgelesen werden und hierbei hochempfindliche Signalübertragungstechnik verwendet wird.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es verschiedene Assays für hochempfindliche, flexible Multiplex-Sensing-Plattformen bereitzustellen. Micro- und Nanoobjekte wie beispielsweise polymere Partikel oder Phospholipidvesikel sind die Hauptkomponenten dieser neuartigen Assays. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Entwicklung Protein-

Microarray-Technologien wobei die Möglichkeit der Detektion durch gängige fluoreszenzbasierte optische Instrumente gewährleistet werden soll.

Partikel oder Vesikel können in verschiedenster Weise zur Entwicklung neuer bioanalytischen Werkzeuge beitragen: diese Mikro- oder Nano-Objekte können als Transporter für biologische Erkennungsreaktionen verwendet werden, sie können die Ladekapazität in dreidimensionalen Netzwerken erhöhen, und sie können, falls sie fluoreszierend sind, als Label zur Signalamplifikation verwendet werden. Darüber hinaus ist das Potenzial von Phospholipidvesikel bei der Entwicklung von Plattformen zum Nachweis von Membranproteinen unbestreitbar, da diese selbstorganisierenden Nanobehälter die natürliche Zellmembran nachahmen können. Diese allgemeinen Eigenschaften vor Augen, präsentiert diese Arbeit drei verschiedene Typen von Assays, welche das Potenzial von Partikeln oder Vesikeln im Hinblick auf fluoreszenz-basierte Hochleistungsbiosensoren nachweisen sollen.

Zunächst wird auf die Rolle von Phospholipidvesikeln in der Detektion von Membranproteinen eingegangen. Es wurde ein aus Oligonukleotiden bestehendes Microarray entwickelt, welches durch gezielte Oberflächenimmobilisierung von Liposomen mittels Verwendung von spezifischen DNA-Strängen in ein Vesikelarray umgewandelt werden kann. Mit Hilfe dieses Systems konnte ein heterogenes Array aus synthetischen und natürlichen Liposomen entwickelt werden, in welchem die natürlichen Liposomen G-Protein gekoppelte Rezeptoren enthalten. In einem weiteren Assay werden die Wechselwirkungen zwischen multivalenten Zr^{4+} Kationen und Phospholipiden untersucht. Es wird gezeigt, dass eine stabile, jedoch trotzdem reversible Bindung zwischen Lipiden und Ionen besteht und dass diese Bindung verwendet werden kann um Mehrfachschichten von Phospholipidvesikeln zu bilden. Diese Konstrukte tragen dazu bei die Ladekapazität von Sensoren zu erhöhen und dadurch letztlich deren Empfindlichkeit.

In einem zweiten Typ von Assay werden biofunktionale Mikro- und Nanofluoreszenzmarker zur Erzeugung eines starken, optischen Signals verwendet. Zuerst wird das Potenzial von Mikropartikeln in Assays untersucht, welche auf fluidischen Kräften basieren und gezielte Partikelbindung begünstigen sowie unspezifische Bindungseffekte unterdrücken. Durch diese Vorgehensweise konnte der Störhintergrund der Partikel auf weniger als ein Teilchen/Spot reduziert werden, wodurch die Detektion einzelner Bindungsereignisse möglich ist. Als alternative Labels wurden proteinabweisende Phospholipidvesikel verwendet. Es ist gelungen den Störhintergrund niedrig zu halten, und im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Molekülen, wurde eine bis zu 100-

fach höhere Sensitivität erreicht. In beiden Fällen kamen reverse phaseModellassays zum Einsatz, welche wohl am meisten von den Methoden zur Signalverstärkung bei niedrigen Proteinkonzentrationen profitieren dürften.

Im letzten Teil dieser Arbeit werden neuartige, flexible Plattformen für Microarrays präsentiert. Dabei wurden Mikropartikel als Transporter für die biologischen Erkennungsreaktionen verwendet. Zuerst wurde ein Herstellungsprozess entwickelt, welcher die Produktion einer großen Anzahl von Arrays ohne spezielle Instrumentierung ermöglicht: Mikropartikel wurden schichtweise in eine durchlässige Gel-Matrix eingebettet. Durch das Aufschneiden dieses dreidimensionalen Stapels von Partikeln war es möglich eine grosse Anzahl von Arrays in einem einzigen Produktionsablauf herzustellen. Darüber hinaus haben wir ein mikrofluidisches Mehrkanalgerät konstruiert, welches zur Immobilisierung von biofunktionalisierten Partikeln verwendet wurde. Dadurch war es möglich ein Proteinnmikroarray mit integriertem Zuführungssystem für Reagenzien herzustellen.

Jeder der hier vorgestellten Assays, hat das Potenzial, einen Beitrag zur Entwicklung von fluoreszierenden Hochleistungsbiosensoren zu liefern. Dies wird erreicht durch eine optimierte Immobilisierung von Proteinen, durch vielseitige Assays zur Signalverstärkung und durch anwenderorientierte Lösungen hin zu flexiblen Microarrays.