Schlussbericht

zum Einzelvorhaben: Evaneszente optische Felder zur ultrasensitiven Detektion von Pathogenen mittels integrierter Mikroring-Resonatoren und Dielektrophorese (EvaDetekt)

Zuwendungsempfänger: Technische Universität Berlin

Förderkennzeichen: 13N15712

Laufzeit des Vorhabens: 15.07.21 – 31.03.2024

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt. Ggf. vertrauliche Ergebnisse/Informationen werden im Erfolgskontrollbericht dargestellt.

Zusammenfassung

Das EvaDetekt Projekt wurde auf Basis der Bekanntmachung „Wissenschaftliche Vorprojekte (WiVoPro): Photonik und Quantentechnologien“ beantragt und gefördert. Es war ein Einzelvorhaben des Fachgebietes Bioverfahrenstechnik der TU Berlin, das im Rahmen von Kooperationen mit dem IHP, dem Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik in Frankfurt (Oder), das die elektronischen Chips herstellte und die Biosolutions Halle GmbH, bei der die Kultivierung pathogener Bakterien erfolgte, unterstützt.

Das Ziel von EvaDetekt war die Entwicklung und funktionelle Demonstration eines Systems zum Nachweis mikrobieller Pathogene, am Beispiel von Legionellen, mit siliziumbasierten photonischen Mikroringresonatoren in Kombination mit der Dielektrophorese. Die Technologie basiert auf einer monolithisch integrierten elektronisch-photonischen Plattform, die von der CMOS/BiCMOS-Technologie abgeleitet ist, und ermöglicht einen Point-of-Care-Test mit markierungsfreier Analyse und Separation in einem System. Der verfolgte Ansatz nutzt photonische Mikroringresonatoren für die selektive Erkennung von Zielorganismen, wobei Sensitivität durch elektrische Anziehung mittels Dielektrophorese und Spezifität durch immunologische Bindung über einen spezifischen Antikörper erreicht werden. Durch Nutzung der Dielektrophorese in ihrer die Zellen anziehenden Variante werden nur lebende, klinisch relevante Zellen aus der Probe separiert und detektiert.

Im EvaDetekt Projekt konnten (1) sowohl die Ringresonatoren entwickelt sowie eine spezifische Detektion von ganzen Zellen über die Bindung an die immobilisierten Antikörper gezeigt werden. Weiterhin wurden (2) ausgehend von umfangreichen Simulationen mehrere Generationen von Mikrofluidik-Systemen mit integrierter Dielektrophorese entwickelt, wobei Parameter gefunden wurden, die es entsprechend der Hypothese erlaubten, lebende von hitzeinaktivierten (d.h. toten) Legionellen zu separieren. Dies konnte lichtmikroskopisch mit einer automatischen Bildauswertungsmethode belegt werden.

Damit konnte im Projekt die prinzipielle Machbarkeit des geplanten Ansatzes demonstriert werden. Allerdings hat der Zeitraum des Projektes nicht ausgereicht, um einen Demonstrator zu entwickeln, der beide Teilaspekte miteinander verbindet. Auch konnte zwar am Ende der Förderung eine neue Chipgeneration designt und produziert werden, allerdings stehen Untersuchungen mit dieser noch aus.

Zusammenfassend wurden die wichtigsten Ziele im Projekt erreicht, und die wissenschaftliche Hypothese konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse sind wegweisend für die Entwicklung von quantitativen markierungsfreien Ganzzellsensoren für Mikroorganismen, die nicht auf das hier gezeigte Anwendungsbeispiel limitiert sind, sondern im Bereich der Lebensmittel-, Wasser- und klinischen Analytik eine grundlegende Voraussetzung und interessanten Ansatz darstellen.

Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Das langfristige Ziel, das mit dem EvaDetekt-Projekt verfolgt wird, ist die Entwicklung eines integrierten Systems zum Nachweis von mikrobiellen Ganzzellpathogenen mit siliziumbasierten photonischen Mikroringresonatoren durch Unterstützung mit der Dielektrophorese (DEP).

In dem zu entwickelnden System wird eine monolithisch integrierte elektronisch-photonische Plattform-Technologie genutzt, die sich von einer mikroelektronischen CMOS/BiCMOS Technologie ableitet. Durch die damit einhergehende Miniaturisierung wird ein Point-of-Care-Test ermöglicht, bei dem in einem Gerät eine markierungsfreie Analyse mit einem Separationsschritt und damit eine schnelle und arbeitssparende Methode vereint werden. Der analytische Ansatz basiert auf dem selektiven Nachweis der lebenden Zielorganismen über photonische Mikroringresonatoren (MRR), bei dem eine hohe Sensitivität über eine elektrische Attraktion der Erreger an den Mikroring und eine hohe Spezifität über gängige immunologische Bindung an Antikörper erreicht wird. Die im Rahmen des Projektes zu entwickelnde Technologie zeichnet sich dadurch aus, dass über die DEP nur lebende intakte und damit auch klinisch relevante Zellen aus der Probe separiert und quantitativ detektiert werden. Das ist ein großer Vorteil gegenüber Standardmethoden, die (1) auf dem sehr langsamen Wachstum der Zielorganismen basieren – wobei es bei der Separation der Zellen von der Matrix oft zur Inaktivierung der Lebendzellen kommt, so dass quantitative Aussagen nur bedingt möglich sind. Auch erfolgen die molekularbiologischen und immunologischen Standardmethoden meist in analytischen Laboren – Point-of-care Vorort-Verfahren sind nur bedingt verfügbar.

Generell ist der Nachweis ganzer Zellen in mikrofluiden Systemen eine Herausforderung, da die Zielzellen den Sensoren meist über Mikrokanalhöhen von mehreren zehn bis hundert Mikrometern zugeführt werden. In dem laminaren Strom passieren die meisten zu detektierenden bakteriellen Zellen mit typischen Größen von 1-2 x 0,3-0,5 µm den Mikrokanal ohne Adsorption auf der Sensoroberfläche. Da insbesondere lebende Zellen stark mit einem elektrischen Wechselfeld interagieren, können diese im Unterschied zu toten Zellen mittels DEP an die Elektrodenoberfläche gezogen bzw. abgelenkt werden, was die Realisierung mikrobieller Biosensoren ermöglicht.

Zusammenfassend stellen optische Mikroringresonatoren einen wichtigen Ansatz der photonischen Biosensorik dar, mit dem zukünftig biologisch und medizinisch relevante Analyte in kurzer Zeit und mit hoher Sensitivität nachzuweisen sind. Durch die Kombination mit dem DEP-Effekt kommt ein aktuatorisches Element ins Spiel, das es erlaubt, einerseits unerwünschte Kontaminationen von der Sensorfläche fernzuhalten und Zielorganismen selektiv anzuziehen, so dass sich auch eine hohe Spezifität erreichen lassen wird. Die von uns beabsichtigte Technologieentwicklung zeichnet sich dadurch

aus, dass mittels DEP nur die lebenden intakten und damit auch klinisch relevanten Zellen aus der Probe separiert und nachfolgend quantitativ detektiert werden.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

EvaDetekt wurde am Fachgebiet Bioverfahrenstechnik (FG BVT) der TU Berlin durchgeführt. Praktisch wurde das Projekt bezüglich der Sensorentwicklung von Prof. Dr. Mario Birkholz, als Leiter des Joint Lab Bioelektronik betreut, und der biologische Teil von Prof. Dr. Neubauer. Als wissenschaftlicher Mitarbeiter war Dr. Anders Henriksson auf dem Projekt angestellt.
Die Fertigung der drei Generationen von Chips erfolgte am Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik (IHP). Da das Fachgebiet Bioverfahrenstechnik nicht über die für die Kultivierung pathogener Legionellen benötigte S2-Infrastruktur verfügt, wurde eine enge Kooperation mit der Biosolutions Halle GmbH eingegangen, einem diagnostischen Labor in dem die Legionellenanalytik kommerziell durchgeführt wird, wo diese Kultivierungen und Inaktivierung erfolgte. Die Biosolutions Halle GmbH stellte auch den nichtpathogenen Legionellenstamm *Legionella parisiensis* zur Verfügung, der dann am FG BVT unter S1-Bedingungen kultiviert und untersucht werden konnte.

Herausforderungen, die im Evadetekt Projekt zu bewältigen waren:

- Der Projektstart wurde durch die Auswirkungen der COVID-Pandemie eingeschränkt, indem die teilweise und vorher langfristige Schließung der Labore am FG BVT noch bis zum November 2021 bestanden.
- Durch den am 30.4.2021 erfolgten Angriff auf die Internetinfrastruktur der TU Berlin und der damit einhergehenden Notwendigkeit, das gesamte SAP-System neu aufzusetzen, was über 2 Jahre dauerte, verzögertes sich die Anstellung des Wissenschaftliche Mitarbeiters sowie der studentischen Hilfswissenschaftler. Das Projekt konnte erst beim Kick-off-Meeting am 11. November gestartet werden. Insgesamt kam es initial zu einer Verzögerung des Projektstarts von vier Monaten.
- Ein weiteres Hindernis ergab sich daraus, dass der Reinraum sowie das optische Labor für den Mikroringresonator am Fachgebiet für Hochfrequenztechnik der TUB nicht wie bei Projekteinreichung vorgesehen zur Verfügung standen. Wir hatten geplant, diesen Reinraum zu nutzen, um ein Packaging-Verfahren der Chips mit einem mikrofluidischen System zu etablieren. Dementsprechend musste ein neuer Ort für diese Aktivitäten gefunden werden, was das Projekt weiter verzögerte. Als Alternative wurde der gut ausgestattete Reinraum an der TU Ilmenau genutzt. Weiterhin konnten die Mikroringresonatoren erst vermessen werden, nachdem der experimentelle Aufbau am FG BVT eingerichtet war.

1.3 Stand der Technik

Die Ringresonator-Technologie basiert auf der schleifenförmigen Ausbreitung von Licht im sog. *whispering gallery mode*, für die bei spezifischen Frequenzen eine Resonanz eintritt. Die Ausbreitung durch Totalreflexion erzeugt in der Nähe der Wellenleiteroberfläche ein evaneszentes elektrisches Feld, dessen Wechselwirkung mit der Umgebung die Erfassung von Analyten ermöglicht. In der einfachsten Ausführung wird eine Wellenleiterschlaufe (Ringresonator) mit einem Durchmesser im Bereich von einigen 10 bis einigen 100 µm neben einem linearen Wellenleiter (Bus) platziert. Während sich das Licht durch den Bus von der ein- zur auskoppelnden Faser ausbreitet, werden die Wellenlängen im Ring gefangen, die als stehende Welle ein harmonisches Verhältnis zum Umfang aufweisen: $2\pi Rn = m\lambda$ (R Ringradius, λ Resonanzwellenlänge, m Modenzahl). Auf dem Ring immobilisiertes organisches Material wie Zellen oder Proteine bewirken eine Änderung des effektiven Brechungsindexes n, wodurch sich die Resonanz verschiebt, und die Verschiebung $\Delta\lambda$ wird von Photodetektoren erfasst.

Ringresonatoren mit unterschiedlichen Konfigurationen und Geometrien wurden entwickelt, um die Nachweisgrenze zu erhöhen und die Auswirkungen von Fertigungstoleranzen zu reduzieren. Derartige Lösungen sind z.B. die Kopplung von zwei linearen Wellenleitern an einen einzigen Mikroring, ein Zwei-Kaskaden-Ringresonator (Vernier-Kaskaden-Silizium photonischer markierungsfreier Biosensor und ein Coupled-Resonator-Lichtwellenleiter CROW, d. h. eine Anordnung von optischen Kavitäten, bei der benachbarte miteinander gekoppelt sind und dadurch die Antwort verstärken. Darüber hinaus ist die Wellenleitergeometrie der wichtigste Parameter hinsichtlich der Empfindlichkeit des Ringresonators. Prinzipiell werden drei verschiedene Arten genutzt: Rippen-, Streifen- und Schlitzwellenleiter, die unterschiedliche Charakteristika bzgl. Empfindlichkeit und optische Verluste zeigen, z.B. sind Schlitzwellenleiter empfindlicher bei hohen Verlusten und Rippenwellenleiter unempfindlicher bei niedrigen.

Typischerweise ermöglicht ein Mikroring-Resonator den Nachweis von Proteinen im picomolaren (pM) Bereich innerhalb von 30 Minuten. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von bioanalytischen Anwendungen publiziert, darunter proteindiagnostische Assays, Proteininteraktionsstudien, sowie der Nachweis von Viren und Bakteriophagen.

Ringresonatoren, die in eine Halbleitertechnologie (photonische integrierte Schaltungen, PIC) integriert sind, können speziell bei Point-of-Care-Anwendungen im Vergleich zu anderen kommerziell verfügbaren Techniken (z.B. ELISA, elektrochemische Sensoren, Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie SPR) durch ihre geringe Größe, eine skalierbare Massenproduktion, schnelle Auslesung (Echtzeit) und ihre CMOS-Kompatibilität wesentliche Vorteile haben.

Darüber hinaus ermöglichen offene Zugangsplattformen, z.B. von IMEC oder IHP, der Industrie und Forschern den Zugang zu einer Vielzahl fortschrittlicher photonischer Technologien über kosteneffiziente Multiprojekt-Wafer (MPW) Services, die mit der generischen Basistechnologie der Fabrik betrieben werden. Die Hochleistungs-BiCMOS-Technologie SG25H5-ePIC des IHP verfügt beispielsweise über mehrere Schlüsselbausteine, wie eine Vielzahl von Wellenleitern mit variabler Ätztiefe und einem

Verlust zwischen 1-3,5 dB/cm. Ionenimplantationen zur Herstellung von dotierten Wellenleitern (n+, p+), die über die Metall-1-Schicht verbunden werden können, wie z.B. pn-Phasenschieber und wellenleitergekoppelte Germanium-PIN-Dioden. Langfristig strebt das IHP die Bereitstellung einer integrierten Laserquelle auf seiner EPIC-Plattform an. Eine solche integrierte Laserquelle und Photodioden auf demselben Chip wie der photonische Sensor würden eine weitere Miniaturisierung des Sensorsystems erlauben.

Während Ringresonatoren relativ häufig für die biomolekulare Analyse eingesetzt wurden, gibt es nur wenige Beispiele für die Analyse ganzer Zellen, was u.a. auf eine bisher beobachtete geringe Empfindlichkeit zurückgeht und durch unspezifische Bindungen und eine geringe Anzahl von gebundenen Zellen erklärt werden kann. **Im vorliegenden Antrag wird als Lösung vorgeschlagen, die Diffusion zur Sensoroberfläche durch eine integrierte Dielektrophorese (DEP) aktiv zu unterstützen.** Zusammen mit effizienten Rezeptormolekülen für eine gute Bindung auf der Oberfläche sollte so die Sensitivität bezüglich der Zielmoleküle wesentlich erhöht werden.

Der Effekt der Dielektrophorese nutzt dabei die Polarisierbarkeit von Zellen und Molekülen in inhomogenen elektrischen Feldern $\boldsymbol{E}$, mit denen das induzierte Dipolmoment $\boldsymbol{p}$ in Wechselwirkung tritt. Das Dipolmoment geht auf die Umverteilung der die Zelle umgebenden elektrischen Ladungswolke zurück und kann nur induziert werden, solange die Zellmembran intakt und die Zelle noch am Leben ist. Abgestorbene Zellen mit einer nichtpolarisierten, d.h. durchlöcherten Membran zeigen somit keinen DEP-Effekt. Interessant ist vor allem die mit Wechselfeldern erregbare AC-DEP, mit der je nach Frequenz Kräfte zur Anziehung oder Abstoßung erzeugbar sind – je nach relativer Stärke der dielektrischen Konstanten und Leitfähigkeiten für Medium, Zytoplasma und Zellmembran. Bei der Platzierung von Elektroden neben dem Kernwellenleiter, z.B. über hochdotierte Wellenleiter mit der IHP-BiCMOS-Technologie, hat das Verfahren das Potenzial, die Zielzelle selektiv auf der Sensoroberfläche einzufangen, während z.B. unerwünschte tote Zellen nicht mit dem elektrischen Feld interagieren.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

<u>IHP – Leibniz Institut für innovative Mikroelektronik, Frankfurt (Oder):</u> Das IHP verfügt über hochmoderne Reinräume, die denen fortschrittliche photonische integrierte Schaltkreise hergestellt werden können. Im Rahmen des Projekts nutzten wir deren Dienstleistungen und Fachwissen für die Herstellung und Entwicklung von integrierten DEP-Elektroden in einem Silizium-basierten photonischen integrierten Schaltkreis. Die im Projekt erstellten Designs der MRR-DEP-Chips wurden in zwei MPW-Läufe eingespeist und eine begrenzte Zahl gefertigter Chips vom IHP an die TUB ausgeliefert.

<u>Biosolutions Halle GmbH:</u> Die BSH verfügt über umfassende Erfahrung in der Arbeit mit Legionella-Bakterien und betreibt ein für die Arbeit mit pathogenen Bakterien zertifiziertes Labor. Im Rahmen dieses Projekts hat die Biosolutions Halle GmbH ihr Know-how zur

Kultivierung von Legionellen übertragen. Außerdem wurden Experimente im Labor der Biosolutions Halle mit dem pathogenen Stamm *Legionella pneumophila* durchgeführt.

ZMN Zentrum für Mikro- und Nanotechnologien an der TU Ilmenau: Das ZMN verfügt über einen großen Reinraum mit sämtlicher notwendiger Infrastruktur für die Entwicklung von Verpackungsverfahren. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit dem Institut für Thermo- und Fluiddynamik der TU Ilmenau wurde diese Infrastruktur genutzt, um einen Packaging-Prozess für die Sensorchips zu entwickeln.

2 Hauptteil

2.1 Ergebnisse und Arbeiten zu den einzelnen Arbeitspaketen

2.1.1 AP 1. Mikrofluidikplattform und Systemintegration. Konstruktion, Fertigung, Integration

Die geringen Abmessungen und die Heterogenität der im EvaDetekt-Projekt verwendeten Sensorchips machten das Packaging des Chips zu einer Herausforderung. Die Chips sind 5 mm^2 groß und haben Bereiche, die den Probelösungen ausgesetzt werden, wie auch Bereiche mit elektrischen Bond-Drähten, die von Flüssigkeiten getrennt und vor mechanischen Kräften geschützt werden müssen, sowie Bereiche, die von der Flüssigkeit getrennt, aber offen sein sollten, um Licht über Wellenleitern einzukoppeln.

Eine vorläufige Lösung wurde in einem früheren Projekt entwickelt, basierend auf einem lichtempfindlichen Epoxid, das durch UV-Belichtung unter einer Fotomaske auf dem Chip strukturiert wird. Auf diese Weise wurde auf dem Chip eine 200-µm-Kavität realisiert, die die Zufuhr der Probelösung durch einen Kanal auf Polymerbasis (PDMS) ermöglicht.

Die technische Lösung erlaubte Vorversuche, jedoch verhindert die tiefe Kavität eine effiziente mikrofluidische Zufuhr der Probenlösung und eine laminare Strömung, wie sie im EvaDetekt-Projekt erforderlich sind. Das Design einer neuen Kavität, die eine laminare Strömung und eine effiziente Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld ermöglicht, wurde durch FEM-Simulationen mit der Software Comsol Multiphysics ermittelt. Die Tiefe des Hohlraums wurde dabei auf 50 µm reduziert und zusätzliche Strukturen wurden hinzugefügt, um die Ausrichtung des PDMS Mikrofluidikkanals zu erleichtern. Hiermit wurde letztendlich die Aufgabe von AP1 plangemäß erfüllt.

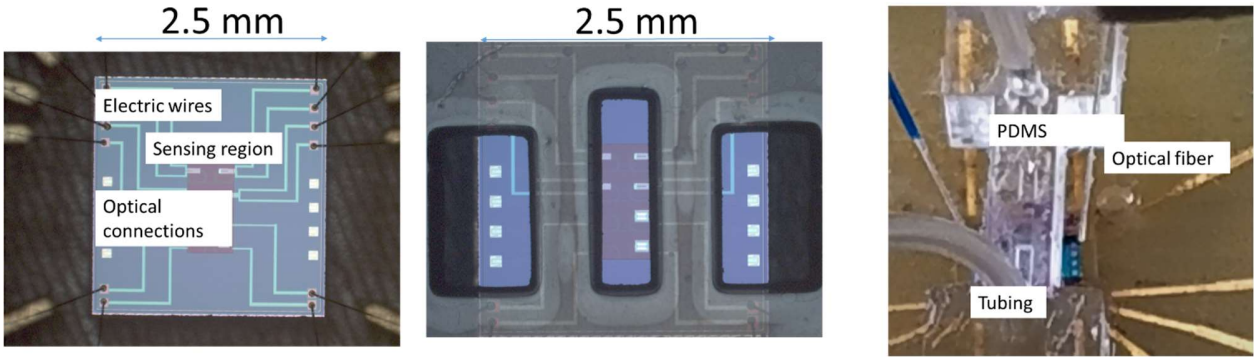

Abb. 1. Ein photogehärtetes bioverträgliches Epoxid (EPO-TEK) schützt die elektrischen Drähte und trennt die Flüssigkeit im Sensormaterial von den optischen Verbindungen. Die Flüssigkeit wird über ein mikrofluidisches System auf Basis von PDMS in die Sensorregion übertragen, was gleichzeitig optische Messungen und Dielektrophorese ermöglicht.

2.1.2 AP 2. MRR-Funktionalisierung

In diesem Arbeitspaket sollten verschiedene Strategien zur Immobilisierung von Antikörpern des Zielerregers untersucht werden. Hierfür wurde die Sensoroberfläche mit Trimethoxysilanen funktionalisiert und unterschiedliche Kopplungsmethoden wie Glutaraldehyd, Click-Chemie und NHS-Chemie sowie PEG-Linker getestet. Die Effizienz der Kopplung und Fouling-Effekte wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie, Wasserkontaktwinkelmessungen und Resonanzverschiebungen überwacht.

Unser erster Schritt zur Fertigstellung dieses Arbeitspakets bestand darin, einen geeigneten Rezeptor zu identifizieren, der in der Lage ist, die in diesem Projekt verwendeten Legionella-Bakterien zu binden. Wir fanden kommerziell erhältliche Antikörper, die zur Erkennung von *Legionella pneumophila* eingesetzt werden können. In diesem Projekt arbeiten wir jedoch mit der nicht-pathogenen *Legionella parisensis*. Daher entwickelten wir einen ELISA-Assay, um zu testen, ob die kommerziell erhältlichen Antikörper für *Legionella pneumophila* auch an *L. parisensis* binden, was tatsächlich gezeigt werden konnte. Anschließend wurden zwei verschiedene Biofunktionalisierungsstrategien durchgeführt: eine basierend auf Silan-Chemie und Glutaraldehyd, die andere auf einem PDA-Protokoll. Beide Protokolle wurden erfolgreich auf Siliziumwafern und anschließend auf den MRR-Chips umgesetzt. Aufgrund seiner einfacheren Handhabung erwies sich das PDA-Protokoll als am geeignetsten, und das Arbeitspaket konnte planmäßig abgeschlossen werden.

2.1.3 AP 3. Legionellen Nachweis

Hier sollten Untersuchungen zum Nachweis von Legionellen mit einem nicht-pathogenen Stamm durchgeführt werden, der von BSH bereitgestellt wurde. Diese Versuche mussten in zertifizierten S1-Laboren wie denen am FG BVT erfolgen, da sie in den Photonik-Fachgebieten der TUB und am IHP nicht möglich waren. Als Versuchsplattform dienen die MRR-DEP-Chips aus dem DFG-Vorgängerprojekt, um die Wirksamkeit des DEP-Effekts bei ein- und ausgeschalteten Elektroden zu testen. Dabei wird die Nachweisgrenze für verschiedene Funktionalisierungsprotokolle untersucht, um gesetzlich relevante Konzentrationen von 1, 10 und 100 KBE/mL (d.h. Koloniebildende Einheiten/ml) zu testen

Für dieses Experiment wurden Ringresonatoren aus früheren Projekten verwendet, die mit DEP-Konzentrationselektroden ausgestattet sind. Erste Versuche zur Detektion von *Legionella parisiensis* in einer Lösung mit hoher Zellkonzentration zeigten keine Resonanzverschiebung, vermutlich weil die Elektroden zu weit vom Wellenleiter entfernt waren. Weitere Tests mit Hefezellen und Mikroalgen bestätigten zwar deren Fokussierung auf den Wellenleiter, aber es wurde keine Resonanzverschiebung festgestellt, möglicherweise aufgrund der geringen optischen Empfindlichkeit des Wellenleiters. Der im Projekt entwickelte neue Sensorchip, sollte jedoch mit einer geschätzten Empfindlichkeit von 30 nm/RIU (RIU = Refractive Index Units), 10 mal empfindlicher und damit besser für den Nachweis geeignet sein. Das Arbeitspaket wurde entsprechend den Ergebnissen angepasst. Das neue Ziel besteht darin, mit einer kommerziell erhältlichen DEP-Flusszelle der Firma GeSiM die genauen DEP-Parameter für Legionellen zu bestimmen und zu zeigen, dass Legionella-Bakterien (1-3 µm), Hefezellen (3-10 µm) sowie auch die noch größere Alge *Crypthecodinium cohnii* (10-30 µm) eine Resonanzverschiebung von mehr als 20 pm verursachen. Diesen Resonanz-Shift konnten wir mit hohen für alle Systeme mit hohen Konzentrationen detektieren.

Mit den GeSiM-Flusszellen wurden Untersuchungen zur Unterscheidung lebender und abgestorbener Legionellen durchgeführt. Dies beinhaltete eine detaillierte Charakterisierung des dielektrophoretischen Effekts der Zellen über weite Frequenz- (0,5-30 MHz) und Spannungsbereiche (5-20 V Spitze-Spitze). Es wurde festgestellt, dass die dielektrophoretische Antwort von lebenden und toten Zellen unerwartet ähnlich ist, was die visuelle Unterscheidung zwischen den beiden Zellzuständen zu einer Herausforderung macht. Das Ziel war es, Parameter zu identifizieren, die eine effektive Trennung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen ermöglichen.

Um dieses Problem anzugehen, wurde eine neuartige Auswertemethode entwickelt. Die Zellen wurden gefärbt und unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet. Gleichzeitig wurden Bildanalyse-Software wie ImageJ und Python-Algorithmen eingesetzt, um die dielektrophoretische Wirkung unter verschiedenen Bedingungen quantitativ zu bewerten. [5] Mit dieser Methode wurden Bereiche evaluiert in denen

lebende Zellen selektiv angezogen werden können (Manuskript eingereicht). Hierfür war die Aufnahme der Zellen in Leitungswasser vorteilhaft (s. Abb. 2).

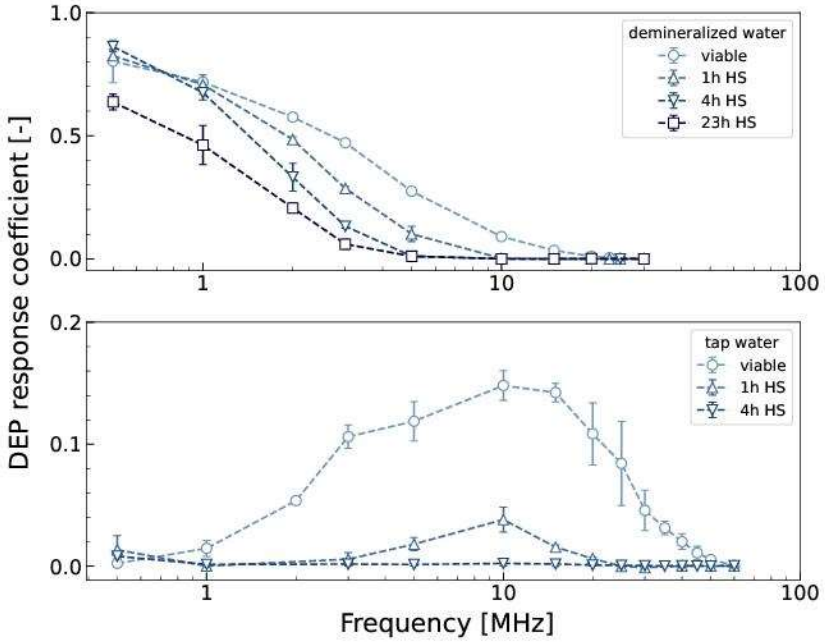

Abb. 2. DEP Response von Legionella parisiensis in deionisiertem Wasser (oben) und Trinkwasser (unten). DEP Response Koeffizienten bei verschiedenen Frequenzen bei 10 Vpp. Hitzeschockbehandlung (HS) über 1h, 4h bzw. 23h. Leitfähigkeit des Mediums 0.1mS m^{-1} bzw. 0.8 S m^{-1}. n≥3. Nach Behandlung wurden die Zellen DAPI gefärbt, um den Lebensstatus zu validieren. Alle Hitzeinaktivierten Zellen waren laut DAPI Färbung nicht lebensfähig.

2.1.4 AP 4. Photonischer Biosensorchip

Es war notwendig, den bereits vorhandenen Sensorchip anzupassen, um seine Interaktion mit Legionella-Bakterien zu optimieren, sowohl in Bezug auf seine Interaktion mit dem angelegten Wechselfeld als auch in Bezug auf die Gestaltung einer optimalen Wellenleitergeometrie, die eine empfindliche optische Detektion ermöglichen soll. So wurden im Rahmen von Arbeitspaket 4 die ersten Schritte zur Realisierung des neuen Chipdesigns durchgeführt.

Folgende Nachteile mit den bereits vorhandenen Chips wurden zunächst identifiziert:

1) Korrosionsempfindlichkeit: Die Elektroden bestehen aus Aluminium mit einer 10 µm dünnen Schicht aus TiN oben, um die Elektroden vor Korrosion zu schützen. Die TiN-Schicht hat jedoch Löcher, die es dem Elektrolyten ermöglichen, mit der Aluminiumoberfläche in Kontakt zu kommen, wodurch Korrosion verursacht wird.
2) Elektroden zu weit von der Sensoroberfläche entfernt: Die bereits vorhandenen Chips können größere Mikroben wie Mikroalgen und Hefezellen effizient

immobilisieren. Während eine Anreicherung der Legionella-Bakterien im Erfassungsbereich wahrscheinlich erreicht werden kann, schließt ihre geringe Größe eine Immobilisierung der Bakterien auf der Oberfläche aus. Obwohl eine erhöhte Erfassungsfähigkeit durch die Konzentrationserhöhung erwartet wird, wird sie viel kleiner als erforderlich sein.

Um ein optimales Elektrodenlayout zu finden, wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt, die die gesamte neuere Literatur zu Biosensoren in Kombination mit Dielektrophorese sowie frühere Arbeiten zu Legionellen umfasste.

Darüber hinaus wurde gemeinsam mit Forschern des IHP, die am IHP verfügbare Technologie zur Herstellung von photonischen integrierten Schaltkreisen überprüft, um ein Layout zu finden, das mit ihrer Technologie kompatibel ist. Schließlich wurden FEM-Simulationen für optimale Designparameter durchgeführt, die den größten DEP-Effekt erzeugten.

Im endgültigen Design wurde der Ringdurchmesser um 50 % von 55 µm auf 27 µm reduziert, um den von Resonanzpeaks freien Spektralbereich (FSR) zu verringern, der ein wichtiger Parameter für eine gute Sensorleistung ist. Die Wellenleitergeometrie wurde für eine höhere Empfindlichkeit von einem Rippenwellenleiter zu einem Nanodraht-Wellenleiter geändert.

Die Elektroden sollen auf dem Device-Layer eines SOI-Wafers hergestellt werden, 1 µm vom Nanodraht-Wellenleiter entfernt. Der kurze Abstand zwischen den Elektroden ermöglicht eine effiziente DEP und da die Elektroden aus dotiertem Silizium bestehen, besteht eine geringere Korrosionsgefahr. Schließlich erzeugt der isolierende Wellenleiter zwischen den Elektroden ein Maximum des elektrischen Felds auf dem Wellenleiter am Ort an dem die Legionellenerfassung stattfindet. Der Effekt, der auf der Beschränkung des elektrischen Feldes durch isolierendes Material basiert, wird als Isolator-DEP (iDEP) bezeichnet.

Darüber hinaus ermöglicht die IHP-Technologie die Herstellung photonisch integrierter Photodetektoren, wie sie kürzlich entwickelt und verfügbar gemacht wurden. Dies wird in den EvaDetekt-Sensorchip eingeführt und soll einfachere optische Messungen ermöglichen.

Im Ergebnis konnte ein optimiertes Chipdesign realisiert werden, dass die Kombination von DEP und Detektion von Legionellen auf der Oberfläche erlaubt.

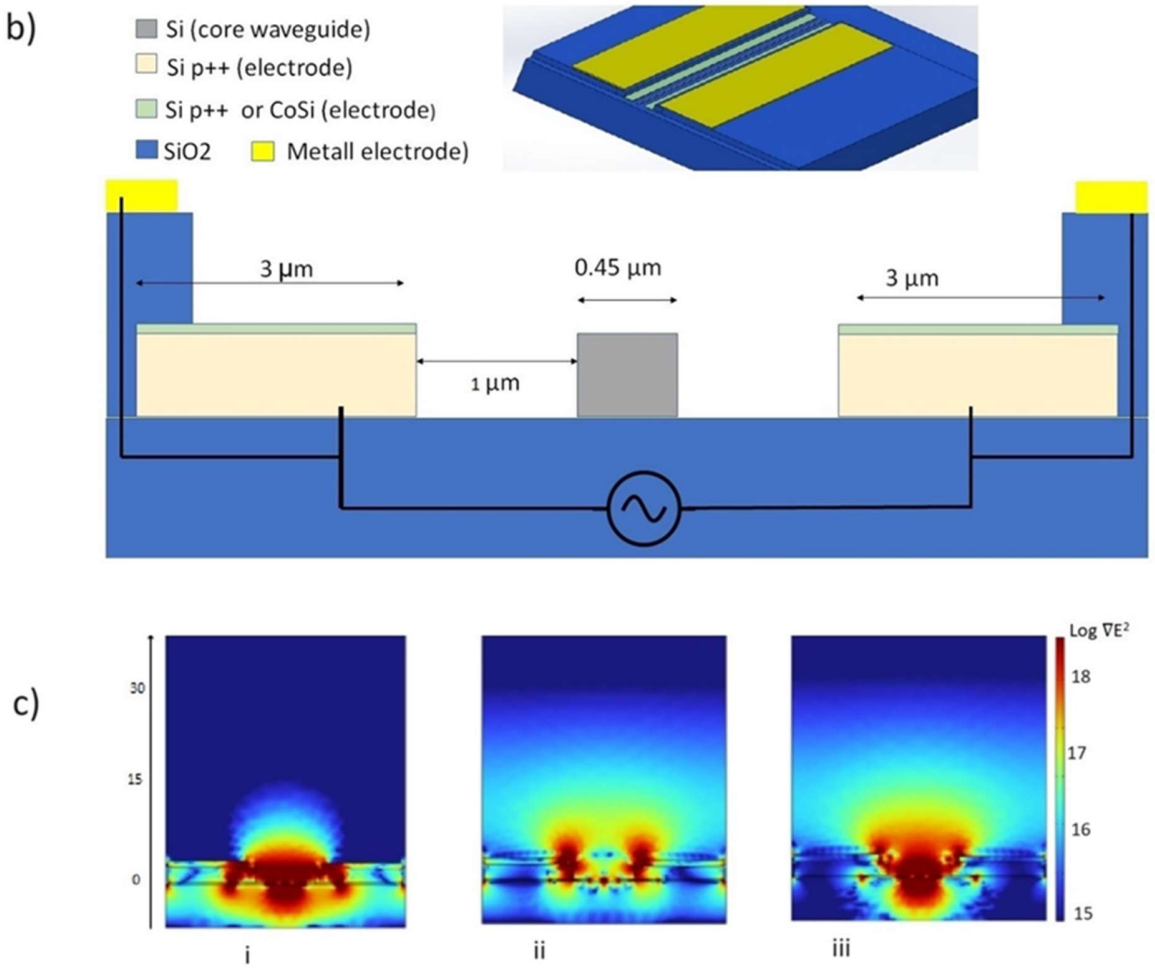

Abb. 3. Elektrodengeometrie mit einem koplanaren Elektrodenpaar auf der Bauteilschicht neben dem Sensorwellenleiter. a) simuliertes ∇E^2 in (log(∇E^2 /V^2m^{-3}) mit den Elektroden in einem Abstand von i) 0,5 µm und ii) 1 µm vom Wellenleiter. b) Querschnitt und Draufsicht einer Elektrodenpaar-Lösung, eine auf der Bauteilschicht und eine auf der Metall-1-Schicht. c) Simuliertes ∇E^2 mit i) nur den Elektroden auf der Bauteilschicht eingeschaltet. ii) nur den Elektroden auf der Metall-1-Schicht. iii) Elektroden auf der Bauteilschicht und der Metall-1-Schicht gleichzeitig eingeschaltet.

2.1.5 AP 5. Optimierung der Systemintegration

In diesem Arbeitspaket sollten die mikrofluidischen Komponenten und die Systemintegration der neuen Sensorchips weiterentwickelt werden. Die Elektrodengeometrie wurde optimiert, um einen effektiven DEP-Effekt für Pathogene auf den MRRs zu erzielen. Die Sensorchips werden elektrisch und optisch charakterisiert, z.B. hinsichtlich FSR, Q-Faktor und Extinktionsverhältnis. Zudem werden Konzepte für ein effizientes Faserkopplungs-Packaging erstellt, um den Aufbau zu vereinfachen. [6]

Das in AP 1 beschriebene Packagingverfahren bietet eine zuverlässige Methode zur Einführung einer Probenlösung in den Sensor. Da das Epoxid jedoch eine doppelte

Funktion erfüllt – es bildet sowohl einen Flüssigkeitskanal als auch schützt es die Drähte – ist die Höhe des Flüssigkeitskanals auf mindestens die Höhe der Drähte begrenzt. Schätzungen zufolge liegt die Höhe der Drähte zwischen 100 und 150 µm, wodurch Flüssigkeitskanäle auf den Chips mit einer Tiefe von etwa 200 µm entstehen. Diese relativ tiefen Hohlräume könnten jedoch die Flussdynamik beeinträchtigen und eine effektive Durchmischung behindern. Zudem, nimmt das elektrische Feld mit zunehmendem Abstand zu den Elektroden ab, wobei signifikante ∇E2-Werte nur bis etwa 50 µm über den Sensoren reichen. Dadurch interagieren Partikel, die sich oberhalb von 50 µm befinden, nicht mit dem DEP-Feld. In Simulationen, die die Partikelbewegungen von *C. cohnii* in Kanälen mit Höhen von 200 µm und 50 µm darstellen, zeigten eindeutig, dass ein Kanal mit einer Höhe von 200 µm für einen DEP-unterstützten Sensor ungeeignet ist, da die meisten Zellen das Feld passieren, ohne damit zu interagieren. Eine Verringerung der Kanalhöhe auf 50 µm hingegen gewährleistet, dass nahezu alle Zellen aufgrund des DEP-Effekts auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden. In Zusammenarbeit mit der TU Ilmenau wurde daher eine neue Packaging-Strategie entwickelt. Diese Strategie beinhaltet die Schaffung eines Fluidkanals unter Verwendung von Trockenresistfilm und Photolithographie. Nachfolgende Schritte umfassen Drahtbonding und einen zusätzlichen photolithographischen Prozess mit einem photobehandelbaren Epoxidharz zur Umkapselung der Drähte und zur Schaffung von Strukturen für eine vereinfachte Befestigung und Ausrichtung eines PDMS-Chips. [6] Das Packaging-Verfahren ermöglichte eine umfassende Charakterisierung des im Arbeitspaket 4 entwickelten Chips.

Um die Systemintegration weiter zu verbessern und Miniaturisierung zu ermöglichen, wurden in AP 4 Photodetektoren in den photonisch integrierten Schaltkreis integriert. Dies reduzierte die benötigten optischen Fasern zur Lichtein- und auskopplung von zwei auf eine und eliminierte die Notwendigkeit externer Photodetektoren; und das Mess-set-up wurde entsprechend angepasst. Der Chip und die Gitterkoppler wurden ebenfalls gemäß den Designrichtlinien des Tyndall-Instituts für den optischen Verpackungsprozess entworfen, um eine vollständige Integration sowohl der elektrischen Leitungen als auch der optischen Fasern zu ermöglichen. Darüber hinaus wurde das Layout der Leiterplatte (PCB) optimiert, um eine einfachere Handhabung der Sensorchips zu gewährleisten. Zusammenfassend wurde das Arbeitspaket gemäß der Projektbewilligung erfolgreich abgeschlossen.

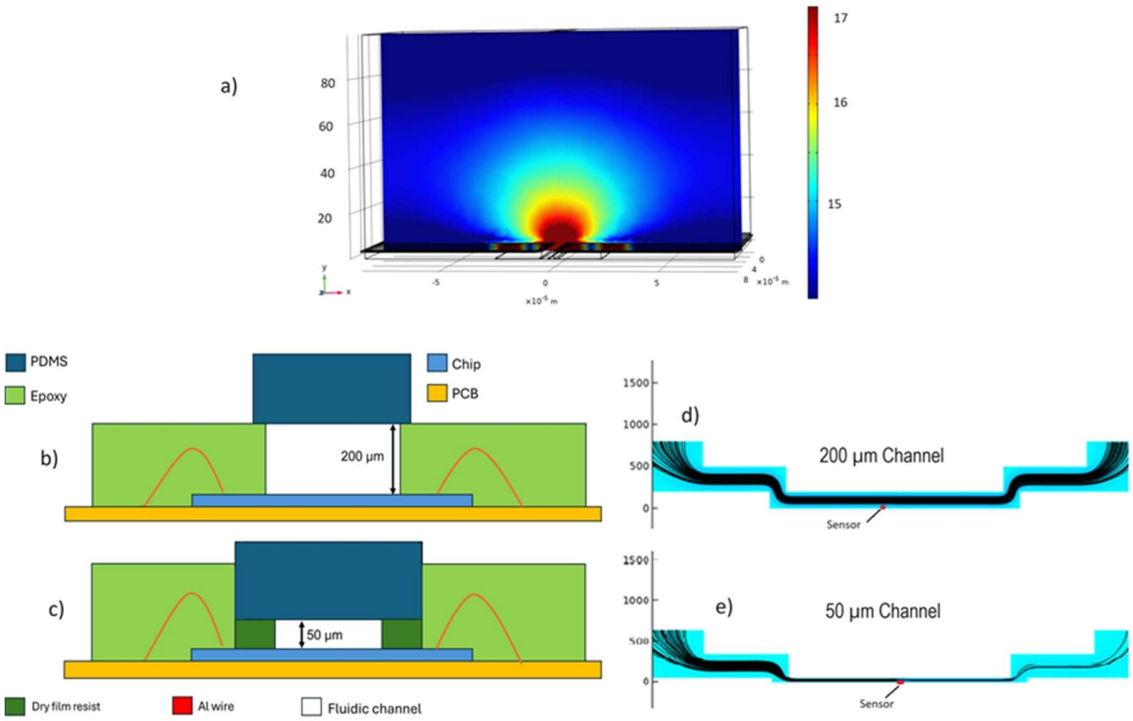

Abb. 4. Simulation, die den erzeugten Gradienten (∇E^2) bei einer angelegten Spannung von 10 Vpp in H_2O darstellt. b) Schematische Darstellung des Querschnitts eines integrierten Sensors, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben. Ein Kanal wird auf dem Chip durch ein 200 µm dickes, lichtaushärtendes Epoxidharz gebildet, das gleichzeitig die gebondeten Drähte bedeckt. c) Ein 50 µm breiter Kanal wird mit einem trockenen Resistfilm erzeugt, gefolgt von der Abdeckung der Drähte mit ausgehärtetem Epoxidharz in einem nachfolgenden Schritt. d) Simulation von Zellen, die dem in Abbildung 4a dargestellten elektrischen Feld ausgesetzt sind. Die Strömungsbahn der Zellen (schwarze Linien) zeigt keine erkennbare Wirkung des elektrischen Feldes. e) Durch Verringerung der Höhe des Kanals auf 50 µm werden fast alle Zellen erfasst.

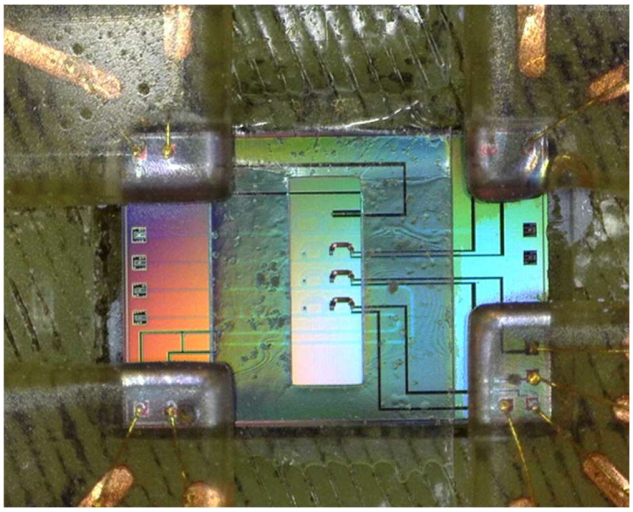

Abb. 5. Foto des Chip-Packagings vor dem Aufsetzen der PDMS-Abdeckung.

2.1.6 AP 6. Test des Systems am Beispiel eines Diagnostiktest für Legionellen

Der im AP 4 entworfene und am IHP gefertigte Chip, der gemäß AP 5 integriert wurde, wurde detailliert charakterisiert. Die Empfindlichkeit des Sensors wurde ermittelt, indem der Chip wässrigen NaCl-Lösungen mit Konzentrationen von 1–10 % ausgesetzt wurde. Wie erwartet stieg die Resonanzwellenlänge linear mit zunehmender NaCl-Konzentration an, mit einer Empfindlichkeit von 14 nm/RIU. Mit der Nanodraht-Wellenleitergeometrie und einem Ringresonator, der mit einer Konzentration von 50 % freigelegt wurde, war eine Empfindlichkeit von 30 nm/RIU zu erwarten. Ein wahrscheinlicher Grund für diese Abweichung könnten Fertigungsfehler sein. Im letzten Herstellungsschritt sollte das schützende Cladding-Oxid entfernt werden, um den Wellenleiter freizulegen. Vermutlich wurde das Oxid auf den Wellenleitern nicht vollständig entfernt. Dennoch ist die neue Generation deutlich empfindlicher als die vorherigen Chips, die eine Empfindlichkeit von 2,5 nm/RIU aufwiesen.

Wir konnten auch die Wirksamkeit der DEP zur Verbesserung des Legionellen-Nachweises demonstrieren. Bei der Exposition des Sensorchips gegenüber einer Legionellenprobe mit einer OD von 0.3 wurde zunächst keine Resonanzverschiebung festgestellt. Durch Anlegen einer Wechselspannung konnte jedoch eine zunehmende Resonanzverschiebung beobachtet werden, die nach 15 min gesättigt war und einen Spitzenwert von 50 pm erreichte (s. Abb. 6). Nach Abschalten der Wechselspannung kehrte die Resonanzspitze in ihre ursprüngliche Position zurück. Wir konnten außerdem bestätigen, dass diese Verschiebung nicht durch eine Temperaturänderung, sondern durch das Andocken der Legionellen an die Sensoroberfläche verursacht wurde. In der aktuellen Form ist der Sensor noch nicht in der Lage, Legionellen in relevanten Konzentrationen und innerhalb der erforderlichen Zeiträume nachzuweisen. Wir konnten jedoch erfolgreich zeigen, dass es möglich ist, Legionellen mit photonischen Mikroringresonatoren unter Anwendung des DEP-Effekts zu detektieren – auf eine Weise, die bisher nicht gezeigt wurde. Der Sensor muss weiterentwickelt werden, um sein kommerzielles Potenzial für diagnostische Tests zu evaluieren.

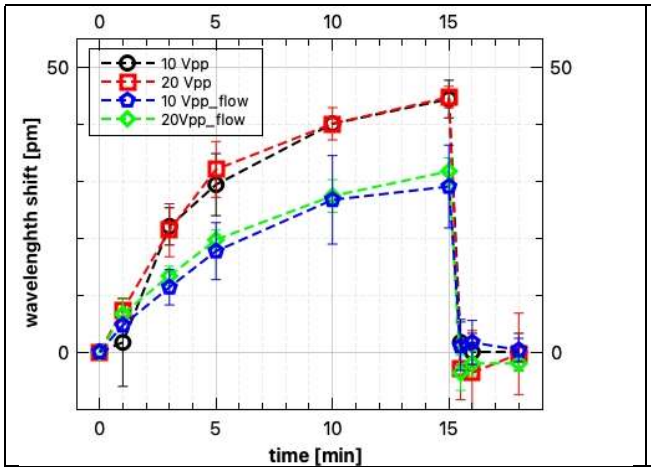

Abb. 6. DEP-assistierter Legionellen-Nachweis: eine deutliche Resonanzverschiebung ist nach Einschalten des DEP-Feldes zu beobachten, wenn Legionellenzellen an den Wellenleiter andocken. Nach 15 min wird das Wechselstromfeld ausgeschaltet und die Resonanzspitze kehrt entsprechend zum Anfangswert zurück.

2.2 Verwertung

Die Forschung in diesem Projekt hat die Grundlage für eine neue Strategie in der Biosensorik etabliert, die auf der Kombination von photonischen Mikroringresonatoren und Dielektrophorese basiert. Wir haben gezeigt, wie DEP-Elektroden erfolgreich in hochmoderne, in Silizium-Photonik gefertigte Systeme integriert werden können, um verschiedene elektrokinetische Effekte auszunutzen. Die Technologie hat inzwischen ein Niveau erreicht, das für Industriepartner interessant ist, um im Rahmen eines größeren Konsortiums weitergeführt zu werden. Neben dem Nachweis lebender Zellen durch Dielektrophorese könnten andere elektrokinetische Effekte und der Nachweis von Molekülen bei der weiteren Nutzung der Ergebnisse ebenfalls von Interesse sein. Im Projekt haben wir ausführlich untersucht, wie Elektroden in Silizium-Photonik integriert werden können, um elektrokinetische Effekte zu erzeugen. Ein weiteres vielversprechendes Potenzial liegt in der Nutzung von Elektroden zur Erzeugung von Mischbewegungen in Flüssigkeiten. Solche integrierten Mikromischer könnten photonische Sensoren weiter verbessern und für Forschung und Industrie ebenfalls interessant sein.

2.3 Fortschritte und Ergebnisse Dritter

Es sind uns keine Studien bekannt, in dem die Dielektrophorese zur Attraktion von Zellen in Bakteriengröße in Verbindung mit photonischen Ringresonatoren als Sensorchipoberflächen untersucht oder gelöst wurden. Dementsprechend halten wir das Forschungsgebiet immer noch für sehr attraktiv. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hypothese, lebende und tote Zellen mittels DEP zu separieren prinzipiell machbar ist.

3 Anhang

3.1 Veröffentlichungen

1) Henriksson A, Neubauer P, Birkholz M, Functionalization of Oxide-Free Silicon Surfaces for Biosensing Applications, *Advanced Materials Interfaces***2021**, *8*(23), 2100927. https://doi.org/10.1002/admi.202100927
2) Henriksson, A., Neubauer, P., Birkholz, M.: Dielectrophoresis: An Approach to Increase Sensitivity, Reduce Response Time and to Suppress Nonspecific Binding in Biosensors? *Biosensors* **2022**, *12*, 784. https://doi.org/10.3390/bios12100784
3) Henriksson, A., Neubauer, P., Birkholz, M.: Strategies to Realize AC Electrokinetic Enhanced Mass-Transfer in Silicon Based Photonic Biosensors.Advanced Materials Technologies 2024, 2302191. https://doi.org/10.1002/admt.202302191
4) Henriksson, A.; Neubauer, P.; Birkholz, M. *Design and Simulation of Si-Photonic Nanowire-Waveguides with DEP Concentration Electrodes for Biosensing Applications*; arXiv:2406.19534, 2024. https://doi.org/10.48550/arXiv.2406.19534
5) Altmann M., Henriksson A., Neubauer P., Birkholz M. 2024. Electronic selection of viable Legionella cells by a video-based, quantifiable dielectrophoresis approach. Submitted to Biomedical Microdevices (20.9.2024).

In Planung:

6) Henriksson A., Schrenk P., Marland J., Tsiamis A., Ngo N., König J., Han A., Smith S., Neubauer P., Birkholz M. Packaging Solution for a Dielectrophoretic-Assisted Microring Resonator Biosensor Platform. To be submitted
7) Henriksson A., Schrenk P, Neubauer P, Birkholz M. Detection of Legionella Bacteria Using a Silicon-Based Photonic Microring Resonator Biosensor Enhanced by Dielectrophoresis. To be Submitted.

3.2 Schutzrechte

Die Lösung für den geplanten DEP-Biochip mit der Kombination eines optischen Ringresonators wurde als Erfindungsmeldung an die Forschungsabteilung der TU Berlin eingereicht und von dieser evaluiert. Die Evaluierung ergab, dass es eine Patentanmeldung gibt, in der ein durch Dielektrophorese unterstützter Biosensor beschrieben wird. Daraufhin wurde eine Patentanmeldung nicht weiter verfolgt.

Projektinformation

zum Einzelvorhaben: Evaneszente optische Felder zur ultrasensitiven Detektion von Pathogenen mittels integrierter Mikroring-Resonatoren und Dielektrophorese (EvaDetekt)

Zuwendungsempfänger: Technische Universität Berlin

Förderkennzeichen: 13N15712

Laufzeit des Vorhabens: 15.07.21 – 31.03.2024

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt.

1 Projektziele

Das Ziel von EvaDetekt war die Entwicklung und funktionelle Demonstration eines Systems zum Nachweis mikrobieller Pathogene, am Beispiel von Legionellen, mit siliziumbasierten photonischen Mikroringresonatoren in Kombination mit der Dielektrophorese. Die Technologie basiert auf einer monolithisch integrierten elektronisch-photonischen Plattform, die von der CMOS/BiCMOS-Technologie abgeleitet ist, und ermöglicht einen Point-of-Care-Test mit markierungsfreier Analyse und Separation in einem System. Der verfolgte Ansatz nutzt photonische Mikroringresonatoren für die selektive Erkennung von Zielorganismen, wobei Sensitivität durch elektrische Anziehung mittels Dielektrophorese und Spezifität durch immunologische Bindung über einen spezifischen Antikörper erreicht werden. Durch Nutzung der Dielektrophorese in ihrer die Zellen anziehenden Variante werden nur lebende, klinisch relevante Zellen aus der Probe separiert und detektiert.

2 Projektinhalte

Im Rahmen des Projektes musste sowohl (1) die Mikrofluidikplattform entwickelt werden, das Dielektrophoresesystem für die Separation Mikrometer großer Legionellen, sowie die Detektionseinheit mit dem Ringresonator und den darauf immobilisierten Antikörpern. Initial wurde ein spezielles Packaging für die Sensorchips entworfen, das den Herausforderungen der kleinen Chipgröße und der komplexen Sensorstruktur gerecht wird. Dies wurde über eine Epoxidharzstruktur gelöst, die die elektrischen Verbindungen schützt und gleichzeitig eine präzise Zufuhr von Probelösungen über mikrofluidische Kanäle ermöglicht. Eine optimierte Chipkavität und eine reduzierte Tiefe des Flüssigkeitskanals halfen die Effizienz der Sensorwechselwirkung mit den Proben zu gewährleisten. Zur Funktionalisierung der Sensoren wurde deren Oberfläche mit Legionella-spezifischen Antikörpern beschichtet. Verschiedene chemische Verfahren wurden getestet, um eine stabile Bindung der Antikörper zu gewährleisten. Letztlich erwies sich ein Protokoll auf Basis von Polydopamin (PDA) als besonders geeignet, da es einfach zu handhaben war und verlässliche Ergebnisse lieferte. In Bezug auf die Dielelektrophorese wurden sowohl das Trägermaterial (Leitungswasser) also auch die Frequenz so optimiert, dass eine Trennung inaktiver toter von lebenden Legionellen möglich ist. Für diesen Nachweis musste eine neue fluoreszenzmikroskopisch basierte Bildauswertemethode entwickelt werden. Im Verlauf des Projektes wurde der Biosensorchip kontinuierlich verbessert, um letztendlich die Erkennung von Legionellen zu gewährleisten. Das Chipdesign wurde über drei Generationen verbessert und damit eine höhere Sensitivität erreicht. Insgesamt führte die Optimierung des Systems zu einer deutlich verbesserten Detektionsleistung, die das Potenzial für zukünftige diagnostische Anwendungen aufzeigt.

3 Ergebnisse

Im EvaDetekt Projekt konnten (1) sowohl die Ringresonatoren entwickelt sowie eine spezifische Detektion von ganzen Zellen über die Bindung an die immobilisierten Antikörper gezeigt werden. Weiterhin wurden (2) ausgehend von umfangreichen Simulationen mehrere Generationen von Mikrofluidik-Systemen mit integrierter Dielektrophorese entwickelt, wobei Parameter gefunden wurden, die es entsprechend der Hypothese erlaubten, lebende von hitzeinaktivierten (d.h. toten) Legionellen zu separieren. Dies konnte lichtmikroskopisch mit einer automatischen Bildauswertungsmethode belegt und damit für das Projekt die prinzipielle Machbarkeit des geplanten Ansatzes demonstriert werden

Zusammenfassend wurden die wichtigsten Ziele im Projekt erreicht, und die wissenschaftliche Hypothese konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse sind wegweisend für die Entwicklung von quantitativen markierungsfreien Ganzzellsensoren für Mikroorganismen, die nicht auf das hier gezeigte Anwendungsbeispiel limitiert sind, sondern im Bereich der Lebensmittel-, Wasser- und klinischen Analytik eine grundlegende Voraussetzung und interessanten Ansatz darstellen.

4 Nutzen bzw. Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte im EvaDetekt Projekt am Beispiel der Analyse von Legionellen demonstriert werden, das mittels positiver Dielektrophorese (DEP) selbst Zellen mit einer sehr geringen Größe selektiert werden können. Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse eine unerwartete Elastizität in der DEP-Reaktion von inaktivierten Legionellen. Durch den Einsatz eines videobasierten Quantifizierungsansatzes wurde ein schmales Fenster für die Unterscheidung zwischen lebensfähigen und unterschiedlich inaktivierten Zellen gefunden, mit einem hohen Informationsgehalt im Vergleich zu traditionellen bildbasierten Methoden. Obwohl die spezifischen Tests mit dem nichtpathogenen Stamm *Legionella parisiensis* durchgeführt wurden, ist eine mögliche Übertragbarkeit dieser Methodik auf andere Legionella-Stämme sehr wahrscheinlich. Die Ergebnisse unterstreichen das Potenzial der Dielektrophorese als vielseitiges Verfahren, das in verschiedene Bereiche der Mikrobiellen Analytik integriert werden kann. Die im Projekt durchgeführten anspruchsvollen Untersuchungen zeigen, dass die DEP für die Verbesserung bestehender analytischer Methoden, z.B. für die spezifische Anreicherung von Zielorganismen während der Probenvorbereitung, vielversprechend ist.