

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Lipokonjugate als neues Werkzeug zur mikrostrukturierten Funktionalisierung von Oberflächen in biochemischen und zellulären Assays

Antje Hoff*, Tilman Schäffer[#], Karl-Heinz Wiesmüller[§], Günther Jung*, Roland Brock*

*Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen
Tel. 07071-2977629

[#]Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Biologie, Am Fassberg 11, 37073 Göttingen, [§]EMC microcollections GmbH, Sindelfinger Str. 3, 72070 Tübingen

roland.brock@uni-tuebingen.de www.uni-tuebingen.de/jung/Brock/index.html

Registriernummer der Online-Anmeldung: 223

Poster

Lipokonjugate wurden als neue Strategie für eine mikrostrukturierte Funktionalisierung von Oberflächen etabliert. Niedermolekulare Bausteine, wie Haptene und Peptide werden kovalent an eine Pam3Cys (N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cystein) Ankergruppe gekoppelt. Wässrige Lösungen dieser mit drei Acylresten modifizierten Lipoaminosäure werden auf hydrophob silanierte Glasträger aufpipettiert. Durch den Einsatz dieses mit drei Acylresten substituierten Lipides wird der Abstand zwischen den funktionellen Endgruppen erhöht. Auf diese Weise wird eine optimale Zugänglichkeit für die Erkennung durch Biomoleküle wie z. B. Antikörper gewährleistet, ohne dass weitere nicht-funktionalisierte Lipopeptide zugesetzt werden müssen. Die Immobilisierung der Lipokonjugate auf dem Substrat erfolgt nicht-kovalent. Im Gegensatz zu Strategien, bei denen die Anbindung kovalent erfolgt, besteht kein Risiko, dass durch Verlust reaktiver Gruppen die biologische Aktivität der Testsubstanz beeinflusst werden könnte. Trotz des Fehlens einer kovalenten Anknüpfung ist die Funktionalisierung mit Lipokonjugaten stabil gegenüber den Bedingungen biochemischer Bindungsassays und sogar gegenüber Zellwachstum.

Die Anwendbarkeit im Screening von Molekülkolektionen auf Proteinbindung wurde anhand der Bindung von fluoreszent markiertem Streptavidin und indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Peptid-Lipokonjugate gezeigt (Abb. 1). In Hinblick auf die Anwendung in zellbiologischen Microarrays wurde die Biokompatibilität der Oberflächen für das Wachstum von adhärenen Zellkulturzellen demonstriert (Abb. 2). Ferner konnte durch Funktionalisierung mit Antikörpern, die Oberflächenmoleküle von Zellen in Suspension erkennen, eine spezifische Anheftung der Zellen an die Oberflächen erreicht werden.

Die Lipokonjugat-basierte Strategie ist vollständig kompatibel mit Nanopipettierung der Substanzlösungen im Picoliter bis Nanoliter Maßstab. Die Hydrophobizität der Oberfläche garantiert beim Auspipettieren wässriger Lösungen kleinste Durchmesser der funktionalisierten Bereiche bis zu minimal 50 Mikrometer.

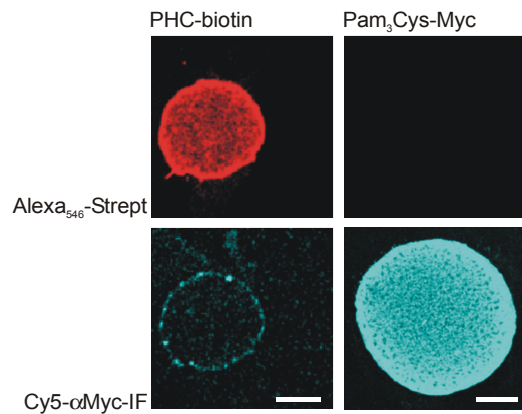


Abb. 1: Einsatz von Lipokonjugaten in biochemischen Bindungsnachweisen. Ein Lipobiotin-Konjugat (PHC-biotin) und ein Peptid mit der Sequenz des Myc-tag, das am N-terminus mit Pam3Cys derivatisiert wurde, wurden manuell auf ein hydrophobisiertes Deckglas aufpipettiert. Die Biotin-Endgruppe wurde spezifisch durch Alexa546-markiertes Streptavidin erkannt. Das Myc-tag wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem anti-Myc monoklonalen Antikörper und einem Cy5-markiertem anti-Maus Zweitantikörper nachgewiesen. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Maßstabsbalken: links, 50 μm ; rechts, 100 μm .

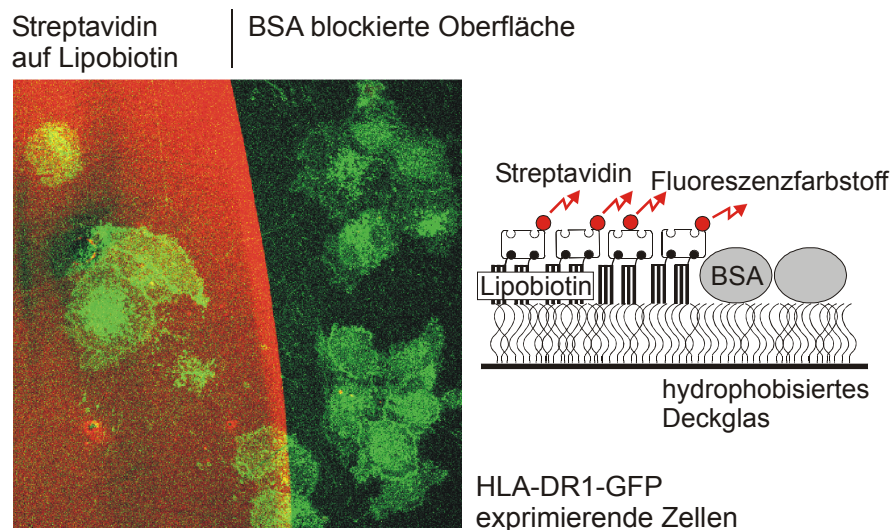


Abb. 2: Mikrostrukturierte Funktionalisierung von Oberflächen mit Lipokonjugaten in zellbiologischen Analysen. Adhärenente Zellkulturzellen, die ein Fusionsprotein des MHC-Klasse II Moleküls HLA-DR1 mit dem Grünen Fluoreszenten Protein (GFP) exprimieren, wurden auf mikroskopische Deckgläser ausgesät, die örtlich über Lipobiotin mit fluoreszent markiertem Streptavidin funktionalisiert waren. Das

Bild wurde einen Tag nach Aussaat der Zellen aufgenommen (Rot: Alexa546-Streptavidin, Grün: GFP Fusionsprotein. Maßstabsbalken: 20 μ m. Die Struktur des Lipobiotin in der schematischen Darstellung beabsichtigt nicht, die tatsächliche Struktur auf der Oberfläche widerzugeben.