

Rasterkraftmikroskopische In-situ-Detektion von molekularen Erkennungsreaktionen an mikrostrukturierten Lipidmembransegmenten**

Stephanie Künneke und Andreas Janshoff*

Zellmembranen bilden die wichtigste Grenzfläche in biologischen Systemen. Eine Vielzahl von Reaktionen, zu denen auch molekulare Erkennungsreaktionen von löslichen Proteinen an Rezeptorlipiden zählen, laufen an dieser einzigartigen Oberfläche ab. Künstliche, festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten sind nicht nur geeignete Modellsysteme, mit denen bestimmte Reaktionen unter definierten quasistatischen Bedingungen untersucht werden können, sondern ermöglichen auch den Aufbau von biosensorisch aktiven Oberflächen mit hochgeordneten Rezeptormolekülen in einer dicht gepackten Matrix, welche die unspezifische Adsorption von Biomolekülen effizient unterdrückt.^[1]

Im Hinblick auf analytische Anwendungen, kombinatorische Bibliotheken oder pharmakologisches Screening, bei denen eine schnelle und parallele Analyse gefragt, das zu untersuchende Biomaterial nur in begrenzter Menge vorliegt oder sehr teuer ist, ist ein Array aus mikrostrukturierten hochgeordneten sowie individuell adressierbaren Lipidmembransegmenten erforderlich, um ähnliche Resultate und einen hohen Durchsatz zu gewährleisten.^[2] Insbesondere die Verwendung der Rasterkraftmikroskopie zur Visualisierung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen und Materialunterschieden profitiert von einer strukturierten Oberfläche, da die direkte Vergleichbarkeit von Biomaterialien und die parallele Analyse von Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen an verschiedenen Membranen bzw. Rezeptoren unter identischen Untersuchungsbedingungen auf engstem Raum möglich wird. Da Lipidmembranen meist keine besonderen topographischen Eigenschaften aufweisen, ist eine Strukturierung mit klaren Grenzen erforderlich, um Kontraste qualitativ beurteilen und Kontrollexperimente parallel durchzuführen zu können. Während die Strukturierung von Proteinen und Nucleinsäuren relativ unproblematisch ist, lassen sich Lipiddoppelschichten nur unter wässrigen Lösungen präparieren und strukturieren.

Strukturierungsverfahren für Lipiddoppelschichten auf der Basis von Kontaktstempelverfahren beschränken sich lediglich auf die Erzeugung einer sehr kleinen Zahl verschiedener Lipidzusammensetzungen, zumal die einzelne Adressierung der Segmente mit diesem Verfahren nicht möglich ist.^[3]

Es ist uns gelungen, ein elegantes Verfahren zu entwickeln, das die selektive Funktionalisierung zahlreicher Lipidmembrankompartimente im Mikrostrukturierungsprozess zulässt, wobei die Zahl der möglichen, unterschiedlichen Lipidseg-

mente in der streifenförmigen Anordnung zurzeit nur durch die Handhabbarkeit der manuellen Injektion von Vesikellösungen beschränkt ist.^[4]

Die Realisierung eines Membranarrays aus festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten im Mikrometerbereich beruht darauf, die Vesikelspreitetechnik^[5] mit dem Micro-fluidic-Network(μ FN)-Verfahren^[6] der Softlithographie zu kombinieren.

Die Technik des Abformen von Materialien entlang von Kapillarstrukturen in Elastomeren wurde von Whitesides und Mitarbeitern etabliert.^[6] Dabei wird als Gussform ein strukturiertes Elastomer verwendet, das in Kontakt mit einer Oberfläche ein Netz leerer Kanäle bildet. Die Gussformen werden durch Aushärtung des Polydimethylsiloxans (PDMS) auf einem beschichteten Silicium-Wafer, der die entsprechende inverse Masterstruktur trägt, und anschließendes Entfernen des PDMS-Replikats strukturiert. Durch Hydrophilisierung der PDMS-Gussform im O_2 -Plasma wird eine vorübergehende Haftung bei der Kontaktierung mit dem Glassubstrat erreicht^[7] und eine zügige Befüllung der eingeschlossenen Kapillaren mit Vesikelsuspensionen gewährleistet. Die Geschwindigkeit der Befüllung hängt von der Oberflächenspannung der Kapillarwände ab. Delamarche et al. konnten dieses Verfahren erfolgreich zur Mikrostrukturierung von Proteinen anwenden.^[8]

Abbildung 1 veranschaulicht schematisch den Mikrostrukturierungsprozess der festkörperunterstützten Membransegmente.^[4, 9] Die Flowpads werden mit den verschiedenen Vesikelsuspensionen durch Zuflusseinrichtungen auf der Oberseite der PDMS-Gussform einzeln adressiert. Durch den

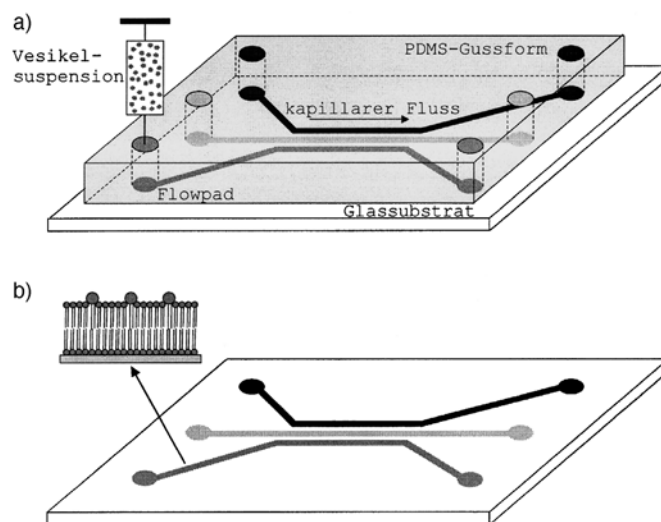


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Mikrostrukturierung von festkörperunterstützten Membransegmenten unterschiedlicher Zusammensetzung.

kapillaren Fluss (laminar) werden die leeren Kanäle befüllt, in denen die Liposomen an den Grenzflächen anhaften, spreiten und zu planaren Lipiddoppelschichten fusionieren (Abbildung 1a). Nach dem Entfernen der PDMS-Gussform und dem Spülen der Probe mit einer Pufferlösung bleiben die separierten Lipidmembrankompartimente auf dem Substrat

[*] Prof. Dr. A. Janshoff, S. Künneke
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Physikalische Chemie
Jakob-Welder-Weg 11, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-39-22970
E-mail: janshoff@mail.uni-mainz.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (JA 963/1-2) unterstützt.

zurück (Abbildung 1b) und sind optischen Untersuchungsmethoden sowie hochauflösenden Techniken zur Oberflächenanalyse zugänglich.

Zur Demonstration des Potentials dieser Methode haben wir die spezifischen Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen zwischen dem Tumormarkerprotein Peanut-Agglutinin (PNA) aus *Arachis hypogaea* und Lipidmembransegmenten aus 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) ohne und mit inkorporiertem Rezeptor asialo- G_{M1} ^[10] mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und die spezifische Bindung des B-Oligomers des Cholera-Toxins^[11] (CTB) an ein DMPC-Membransegment mit integriertem G_{M1} rasterkraftmikroskopisch untersucht.

Die spezifische Erkennung von Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen, wie hier an zwei prominenten Beispielen gezeigt wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung von normalen und malignen Zelltypen, bei der Bindung toxischer Proteine, wie des Cholera-, Pertussis-, Botulinum-, Tetanus- und Diphteratoxins, sowie bei Entzündungsprozessen.

Abbildung 2 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zweier Lipidmembransegmente aus DMPC mit 4 Mol-% des Rezeptors asialo- G_{M1} und 1 Mol-% des Fluorophors β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC (oberes Segment; β -Bodipy-500/510-

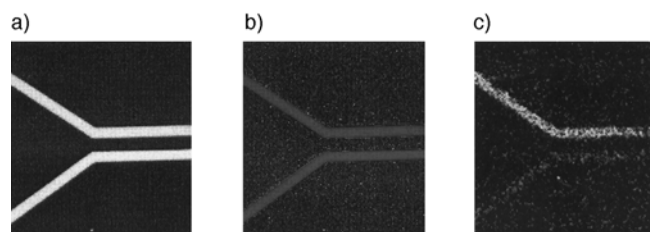


Abbildung 2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier DMPC/ β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC-Segmente (oberes Segment mit dem Rezeptor asialo- G_{M1}) vor (a,b) und nach Zugabe von 278 nM TRITC-x-PNA (c). a) Fluorescein-Fluoreszenz; b, c) Rhodamin-Fluoreszenz.

C_{12} HPC = 2-(4,4-Difluor-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) bzw. aus DMPC mit 1 Mol-% β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC (unteres Segment) in der Fluorescein- und in der Rhodaminfluoreszenz (Abbildung 2a bzw. b) vor Zugabe des Proteins. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit von 278 nM Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat (TRITC)-x-Peanut-Agglutinin (TRITC-x-PNA) ist die spezifische Bindung des Lectins an die rezeptortragende Membran durch die starke Intensitätszunahme der Rhodaminfluoreszenz des oberen Lipidsegmentes (Abbildung 2c) deutlich zu erkennen.

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Lipid-Protein-Wechselwirkung hat gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie und anderen optischen Methoden den Vorteil, dass sich mit ihr die Proteine nicht nur mit molekularer Auflösung anhand der Höhenänderung detektieren, sondern durch Einzelmolekülnachweis auch zweifelsfrei identifizieren lassen.

Abbildung 3a–c zeigt rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen von DMPC/ G_{M1} - und DMPC-Lipidsegmenten auf einem Glassubstrat vor (Abbildung 3a) und nach der

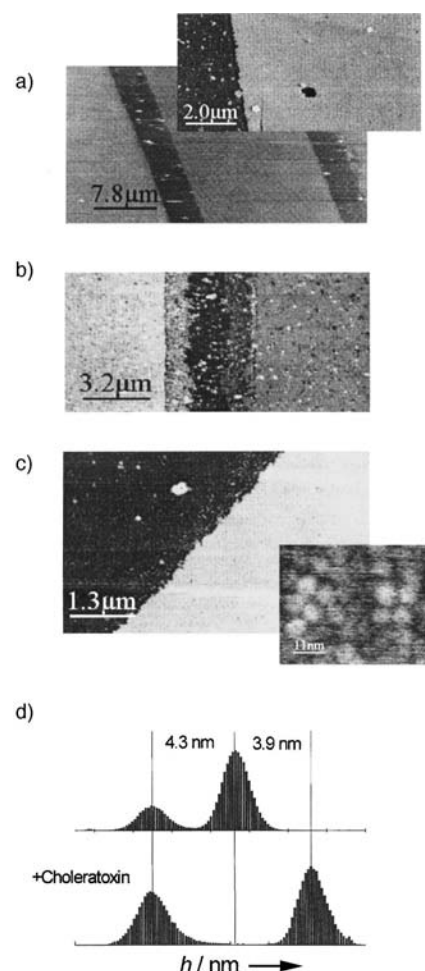


Abbildung 3. Rasterkraftmikroskopische Topographieaufnahmen (Tapping-Modus, Höhenskala 14 nm) von Ausschnitten verschiedener Lipidmembransegmente auf einem Glassubstrat vor (a) und nach der Zugabe von 2.7 nM CTB (b,c). Der linke Lipidstreifen in b) besteht aus DMPC/ G_{M1} und ist homogen mit Cholera-Toxin belegt, der rechte enthält kein Rezeptorlipid und weist auch nach der Zugabe von CTB kein adsorbiertes Protein auf. Die mittlere Höhenzunahme von 3.9 nm (d) nach CTB-Zugabe und die Abbildung einzelner B-Oligomere (Deflektionssignal, Kontaktmodus, Einschub unter c)) belegen die spezifische Bindung des Toxins.

Zugabe von 2.7 nM, CTB (Abbildung 3b,c). Zur Höhenanalyse (Abbildung 3d) wurden die mittleren Höhen von Substrat und Membran vor (hochgestelltes Bild in Abbildung 3a) und nach der Proteinzugabe (Abbildung 3c) durch Anpassen von Gauß-Funktionen an die Daten ermittelt. Die Differenz ergab für die DMPC/ G_{M1} -Membran ohne Protein eine mittlere Höhe von 4.3 nm und nach Inkubation mit CTB einen Wert von 8.2 nm. Die spezifische Bindung des Proteins wird durch die Zunahme der mittleren Membranhöhe ausgedrückt und durch die Abbildung der Einzelproteine (kleines Bild in Abbildung 3c) bestätigt.^[12] Beim rechten Membransegment in Abbildung 3b aus DMPC ohne inkorporierten Rezeptor lassen sich weder eine Höhenzunahme noch eine Proteinstruktur nachweisen, was die Anwendbarkeit des vorgestellten Arrays für Untersuchungen der Bindungsspezifität von Biomaterialien belegt.

Die Kombination dieses präparativ einfachen Verfahrens mit der Rasterkraftmikroskopie eignet sich besonders, da hier

nicht nur die molekulare Erkennung biosensorisch genutzt wird, sondern auch Materialeigenschaften wie Adhäsion, Viskoelastizität verschiedener Lipide sowie das Organisationsverhalten von Rezeptoren in der Membran auf einer Oberfläche untersucht werden können.

Experimentelles

Unilamellare Vesikel aus 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) mit 2 Mol-% G_{M1} oder 4 Mol-% asialo- G_{M1} (Sigma, Dreieich, Deutschland) und 1 Mol-% β -Bodipy-500/510- C_{12} HPC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurden nach der Extrusionsmethode unter Verwendung von zwei Polycarbonatmembranen (mittlerer Porendurchmesser 50 nm) und anschließender Ultraschallbehandlung hergestellt.

Das B-Oligomer des Cholera-toxins (*Vibrio cholerae*) wurde von CalBioChem (La Jolla, CA, USA) bezogen, das fluoreszenzmarkierte Protein Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat (TRITC)-x-Peanut-Agglutinin (*Arachis hypogaea*) von Sigma (Dreieich, Deutschland).

Für die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Bioscope (Nanoscope IIIa Controller, Veeco Digital Instruments) mit Flüssigkeitsmesszelle und Tastspitzen (Cantilevern) mit nominellen Federkonstanten von 0.12 N m^{-1} (Tapping-Modus) und 0.06 N m^{-1} (Kontaktmodus) verwendet. Die Scangeschwindigkeit betrug 0.5 Hz im Tapping-Modus und 4 Hz bei der Aufnahme des Deflektionssignals im Kontaktmodus.

Für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde ein Bio-Rad-MRC-600-Gerät (München, Deutschland) eingesetzt.

Alle Experimente wurden in einem pH7.4-Puffer aus 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)/HCl und 100 mM NaCl durchgeführt.

Die beiden Komponenten des Polydimethylsiloxans (Sylgard 184, Dow Corning Silicon Elastomer, West Midlands) werden im Verhältnis 10:1 (Basis:Härter) verwendet. Die PDMS-Gussform wird unter Verwendung eines mit einer dünnen Schicht 1H,1H,2H,2H-Perfluordecyldimethylchlor-silan überzogenen, (invers) strukturierten Si-Wafers (IMSAS, Bremen, Deutschland) hergestellt.

Die in den vorgestellten Experimenten verwendeten Kapillarstrukturen sind $15 \mu\text{m}$ breit, $3 \mu\text{m}$ hoch und 2 mm lang; die fünf parallelen Kapillaren

sind $5 \mu\text{m}$ voneinander entfernt und enden an beiden Seiten jeweils in einem Flowpad der Größe $2.13 \times 2.13 \text{ mm}$. Die PDMS-Gussformen sind wieder verwendbar. Es wurden $0.1 \mu\text{L}$ der verschiedenen Vesikellösungen je Einzelkanal eingefüllt.

Eingegangen am 9. August 2001 [Z17696]

- [1] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43–48.
- [2] S. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [3] a) L. A. Kung, L. Kam, J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir* **2000**, *16*, 6773–6776; b) J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir* **2000**, *16*, 894–897; c) K. Morigaki, T. Baumgart, A. Offenhäuser, W. Knoll, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 184–186; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 172–174.
- [4] A. Janshoff, S. Künneke, *Eur. Biophys. J.* **2000**, *29*, 549–554.
- [5] A. A. Brian, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6159–6165.
- [6] a) „Soft lithography“: Y. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153–184; b) E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5722–5731.
- [7] a) E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, *Science* **1997**, *276*, 779–781; b) A. Papra, A. Bernard, D. Juncker, N. Larsen, B. Michel, E. Delamarche, *Langmuir* **2001**, *17*, 4090–4095.
- [8] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel, H. Biebuyck, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 500–508.
- [9] Einer übersichtlichen Gestaltung wegen wurden lediglich drei parallele Kanäle, durch Graustufen unterschieden, dargestellt.
- [10] A. Janshoff, C. Steinem, M. Sieber, H.-J. Galla, *Eur. Biophys. J.* **1996**, *25*, 105–113.
- [11] a) J. X. Mou, J. Yang, Z. F. Shao, *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 507–512; b) A. K. Singh, S. H. Harrison, J. S. Schoeniger, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 6019–6024.
- [12] Die röntgendiffraktometrisch ermittelte Höhe des CTBs beträgt 3.5 nm : E. A. Merritt, P. Kuhn, S. Sarfaty, J. L. Erbe, R. K. Holmes, W. G. Hol, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 1043.