

Replikation von μ -Peptidarrays

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften Karlsruher Institut für
Technologie (KIT) – Universitätsbereich

Genehmigte

DISSERTATION

von

Diplomchemiker Jakob Striffler

aus

Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: PD Dr. Frank Breitling

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2014

Kurzfassung

Hochdichte Peptidarrays haben sich in den vergangenen Jahren zu einem wichtigen Werkzeug der Erforschung von Protein-Peptid-Wechselwirkungen entwickelt. Mikropartikelbasierte Verfahren, wie sie am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) entwickelt wurden, ermöglichen eine hohe Auflösung von derzeit bis zu 40 000 Peptiden pro cm² und die schnelle Analyse einer hohen Anzahl potentieller Bindungspartner. Die Herstellung dieser Arrays nach den Prinzipien der Merrifield-Festphasenpeptidsynthese ist allerdings um ein Vielfaches komplexer als die Herstellung von DNA-Mikroarrays. Für eine breite Anwendung im biomedizinischen Bereich ist es vorteilhaft, die Herstellungskosten weiter zu reduzieren und die Qualität der erhaltenen Arrays zu erhöhen. In vorangegangenen Arbeiten konnte das Konzept der Aufreinigung von Peptidarrays, der Abtrennung von Nebenprodukten durch Übertrag auf eine Zieloberfläche unter Erhalt der Auflösung, bereits realisiert werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein neuartiges Verfahren zu entwickeln, dass die Vorzüge dieser Aufreinigung mit der Möglichkeit kombinieren sollte, Arrays in großer Anzahl zu vervielfältigen und damit die Kosten einzelner Screenings drastisch zu verringern.

Zunächst wurde eine Abspaltung der synthetisierten Peptide von der festen Phase durch Ammoniakgas ohne einen zusätzlichen spaltbaren Peptidlinker durchgeführt. Dies bietet den Vorteil, dass Seitenkettenschutzgruppen zunächst vollständig entfernt und im Anschluss die Peptide durch Gas abgespalten werden können, ohne dass sie sich vom Syntheseort fortbewegen. Der Transfer und die Immobilisierung kann unter sehr milden Bedingungen durchgeführt werden und ist dadurch mit beinahe jeder Zieloberfläche kompatibel.

Die Abspaltrate von Peptiden durch die Ammoniakinkubation wurde durch ToF-SIMS, XPS und Photometrie untersucht. Dabei konnte eine theoretische Anzahl von 20-30 Kopien prognostiziert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung bevorzugt am Peptid und nicht am Polymerrückgrat der festen Phase, einem Polyethylenglycolmethacrylat, erfolgt.

Der Vorzug der milden Übertragsbedingungen wurde im Anschluss dafür genutzt, ganze, *N*-terminal mit Biotin funktionalisierte Peptidarrays auf mit Streptavidin funktionalisierte Oberflächen zu übertragen und zu immobilisieren. Dabei konnte durch den gezielten Einsatz von Blockmedien die Selektivität der Anbindung von biotinylierten Peptiden gegenüber nicht biotinylierten Peptiden optimiert werden.

Die Entwicklung einer Transfermaschine erlaubte schließlich die Immobilisierung auf rigiden Glasoberflächen ohne dass durch die Scan-Auflösung sichtbare, laterale Diffusion auftrat. Das Verfahren erwies sich als zuverlässig und flexibel genug, um den Übertrag auf Sensoroberflächen, potentielle Zellkulturträger und Epoxidoberflächen zu ermöglichen und damit den Weg für eine Vielzahl zukünftiger Anwendungen zu ebnen.

Abstract

In the past years, high resolution peptide arrays with aspect ratios in the μm -range have become a versatile and important tool for the fast investigation of protein-peptide interactions. Microparticle-based approaches, as developed at the German Cancer Research Center (DKFZ) and the Karlsruhe Institute of Technology (KIT), allow for up to 40 000 peptides per cm^2 and therefore the fast screening of a high amount of possible binding partners. However, the preparation of these arrays is very complex. For a broad application, both cost reduction and quality improvement is mandatory. Recently, a purification of peptide arrays by transferring whole peptide arrays to recipient surfaces without losing spatial resolution while discarding possible side-products, was established. The goal of this work was to develop a new procedure combining the benefits of the purification with the possibility to replicate peptide arrays multiple times and drastically reducing the cost of individual screenings.

A direct cleavage of the peptides off the solid support with ammonia gas was employed. This approach offers the advantage that side-chain deprotection, cleavage and transfer can be performed sequentially, allowing to transfer peptide arrays under virtually any condition to a wide range of recipient surfaces.

The cleavage rate was investigated with ToF-SIMS, XPS and photometric measurements. These studies hinted at a possible amount of copies in the range of 20-30. It could also be demonstrated that the cleavage occurs almost exclusively at the ester bond of the peptide and not at the polymer backbone, releasing mostly free amides without polyethylenglycol residues.

The advantage of the mild conditions was used to transfer and immobilize whole peptide arrays with *N*-terminal biotin to recipient surfaces functionalized with streptavidin. The application of blocking agents further increased the selectivity of the immobilization of biotinylated peptides versus non-biotinylated peptides.

The development of a transfer device eventually allowed the direct transfer from glass to glass surfaces, virtually without any loss of lateral resolution. The procedure was reproducible enough to even use specialized sensor surfaces, potential cell culture media and epoxide surfaces as recipients, demonstrating the versatility of the approach and paving the way for a wide range of possible application.

Verwendete Abkürzungen

3-GPS	3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan
AE _{G3}	Amino(ethylenglycol) ₃
β-Ala	β-Alanin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CMOS	Komplementärer Metall-Oxid-Halbleiter (engl. <u>c</u> omplementary <u>m</u> etal <u>o</u> xide <u>s</u> emiconductor)
COP	Cycloolefinpolymer
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCM	Dichlormethan
DEPBT	3-(Diethoxyphosphinyloxy)-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
DG	Derivatisierungsgrad
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N</i> -diisopropylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
EG7-SH	O-(2-Mercaptoethyl)-O'-methyl-hexa(ethylene glycol)
ESA	Essigsäureanhydrid
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(-Schutzgruppe)
HA	Hämagglutinin-Epitop
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat

HDTU	<i>O</i> -(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HODhat	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzo-1,2,3-triazin
HODhbt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. <u>h</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
MALDI	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. <u>m</u> atrix <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization)
MeOH	MeOH
Mtt	Methyltrityl(-Schutzgruppe)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
OPfp	Pentafluorophenolester
Pbf	2,2,4,6,7,-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylgruppe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PDFA	Piperidin-Dibenzofullven- Addukt
PheF ₅	Pentafluorophenylalanin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PEG	Polyethylenglycol
PEGMA	Poly(ethylenglycol)methylmethacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat

PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
RAL	Rink-Amid-Linker
RfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SAM	Selbstorganisierende Monolage (engl. <u>s</u> elf <u>a</u> ssembled monolayer)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (engl. <u>s</u> olid <u>p</u> hase <u>p</u> eptide <u>s</u> ynthesis)
tBu	<i>tert</i> -Butyl(-Schutzgruppe)
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
ToF-SIMS	Flugzeit Sekundärionen-Massenspektroskopie (engl. time of flight secondary ion mass spectrometry)
Trt	Trityl(-Schutzgruppe)
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. <u>X</u> -Ray <u>p</u> hotoelectron <u>s</u> pectroscopy)

Ein- bzw. Dreibuchstabencodes für proteinogene Aminosäuren:

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Festphasenpeptidsynthese.....	4
1.1.1	Orthogonale Schutzgruppenstrategie.....	6
1.1.2	Aktivierungsreagenzien.....	7
1.2	Peptidsynthese im Arrayformat.....	11
1.3	Aufreinigung von Peptidarrays.....	14
2	Motivation und Zielsetzung.....	17
3	Resultate und Diskussion.....	18
3.1	Erste Versuche zur Spaltung und Mehrfachübertrag.....	18
3.2	Bestimmung der Abspaltrate von Peptiden durch Inkubation mit Ammoniakgas...	22
3.2.1	Photometrische Bestimmung der Abspaltrate über sequenzielle Schutzgruppen-Abspaltung.....	24
3.2.2	Bestimmung der Abspaltrate über abnehmende F1s-Signale im XP- Spektrum.....	27
3.2.3	Bestimmung der Abspaltrate über abnehmende, normierte C ₁₉ H ₁₅ ⁺ -Signale im ToF-SIMS.....	31
3.2.4	MALDI-ToF Messung zur Bestimmung der Spaltposition.....	43
3.2.5	Fazit der Bestimmung der Abspaltrate.....	45
3.3	Immobilisierung von Peptidarrays auf PVDF-adsorbiertem Streptavidin.....	47
3.4	Transfer auf Glassubstrate mit immobilisiertem Streptavidin.....	59
3.5	Anfärbung freier Biotinbindungsstellen nach Übertrag eines Peptidarrays.....	68
3.6	Transfer auf Sensoroberflächen zur markierungsfreien Detektion.....	71
3.7	Übertrag auf potentielle Zellkulturoberflächen.....	75
3.8	Alternative Immobilisierung auf Epoxid-Oberflächen.....	76
4	Fazit und Ausblick.....	80
5	Material und Methoden.....	84
5.1	Immobilisierung von Streptavidin auf PVDF-Membranen.....	88
5.2	Funktionalisierung von Siliziumdioxid-Substraten.....	89
5.2.1	Reinigung und Aktivierung.....	89
5.2.2	Silanisierung mit APTES.....	89
5.2.3	Silanisierung mit 3-GPS.....	89
5.2.4	Veresterung mit α -Bromoisobutyrylbromid (BIBS).....	89

5.2.5	Polymerisation mit 100% PEGMA.....	90
5.3	Peptidchemie.....	90
5.3.1	Kondensation von Aminosäuren und Peptiden mit freien Amino- und Hydroxylgruppen mit DIC/NMI.....	90
5.3.2	Kondensation von Aminosäuren und Peptiden mit freien Aminogruppen mit HOBT/PyBOP.....	90
5.3.3	Kondensation von Aminosäure-Aktivestern mit freien Aminogruppen.....	90
5.3.4	Acetylierung von freien Amino- und Hydroxylgruppen.....	91
5.3.5	Fmoc-Entschützung.....	91
5.3.6	Seitenkettenentschützung.....	91
5.4	Immunfärbungen.....	91
5.4.1	Passivierung von Oberflächen gegenüber unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen.....	91
5.4.2	Passivierung von Gold-beschichteten Oberflächen mit PEG-SH.....	91
5.4.3	Antikörperfärbung.....	92
5.4.4	Streptavidinfärbung.....	92
5.5	Abspaltung von Peptiden mit NH ₃	92
5.6	Übertrag und Immobilisierung von Peptidarrays.....	92
5.6.1	Übertrag auf PVDF-Membranen.....	92
5.6.2	Übertrag auf Streptavidin-Glasobjektträger.....	93
5.6.3	Übertrag auf 3-GPS funktionalisierte Träger.....	93
6	Literaturverzeichnis.....	94

1 Einleitung

1.1 Festphasenpeptidsynthese

Seit der Dipeptidsynthese von Fischer 1903^[1] war die Darstellung von Peptiden in Lösung lange Zeit eine Herausforderung; insbesondere die Aufreinigung und Abtrennung von Nebenprodukten gestaltete sich als schwierig. 1963 führte Merrifield das Konzept der Festphasenpeptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis; SPPS) in der Peptidchemie ein.^[2] In seinem Ansatz wurden Peptide durch Kupplung von Aminosäuren an eine feste Phase durch orthogonale Schutzgruppenstrategie sequenziell aufgebaut. Nach beendeter Synthese wurden die Peptide von der festen Phase abgespalten. Eine Aufreinigung mit entsprechenden Produktverlusten war nur einmal nötig.

In Abbildung 1 ist die SPPS schematisch gezeigt. Im ersten Schritt wird eine Aminosäure an der festen Phase angebunden. Merrifield verwendete ein chlormethyliertes Polystyrolerivat, an das die erste Aminosäure C-terminal gebunden wurde. Ein Aktivator ermöglicht die Kondensation der Aminogruppen der Oberfläche und Carboxygruppen der Aminosäure. Um eine Reaktion mit der Aminogruppe der Aminosäure zu verhindern, wird diese mit einer Schutzgruppe deaktiviert. Merrifield verwendete dafür die Carboxybenzylschutzgruppe (Cbz). Auch die Seitenketten der Aminosäure sind während der Reaktion mit Schutzgruppen funktionalisiert, welche orthogonal zur Aminoschutzgruppe entfernt werden können. Nach der Kondensation können freie Aminogruppen auf der Oberfläche geblockt werden, um den Anteil an Nebenprodukten zu verringern. Nun wird die Schutzgruppe der Aminofunktion entfernt und das Verfahren wiederholt, bis das gewünschte Peptid aufgebaut ist. Der Aufbau von Peptiden vom C- zum N-Terminus ist dabei die bessere Strategie, da sich die entsprechenden Derivate durch eine bessere Löslichkeit auszeichnen und es während der Reaktion zu weniger Racemisierungen kommt. Dann werden die Seitenkettenschutzgruppen entfernt und das Peptid von der festen Phase abgespalten. Das Verfahren lässt sich gut automatisieren, da Waschprozesse und Syntheseschritte durch die Verwendung eines Zweiphasensystems im Vergleich zur Flüssigphasensynthese einfacher durchführbar sind.^[3-4]

Die charakteristischen Eigenschaften der SPPS sind demnach die Verwendung orthogonaler Schutzgruppen, spezieller Aktivierungsreagenzien sowie einer Verknüpfung mit der festen Phase, die nach beendeter Reaktion mit hoher Ausbeute gespalten werden kann. Diese Punkte sollen im Folgenden erläutert werden, wobei auf spezialisierte Linkersysteme an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

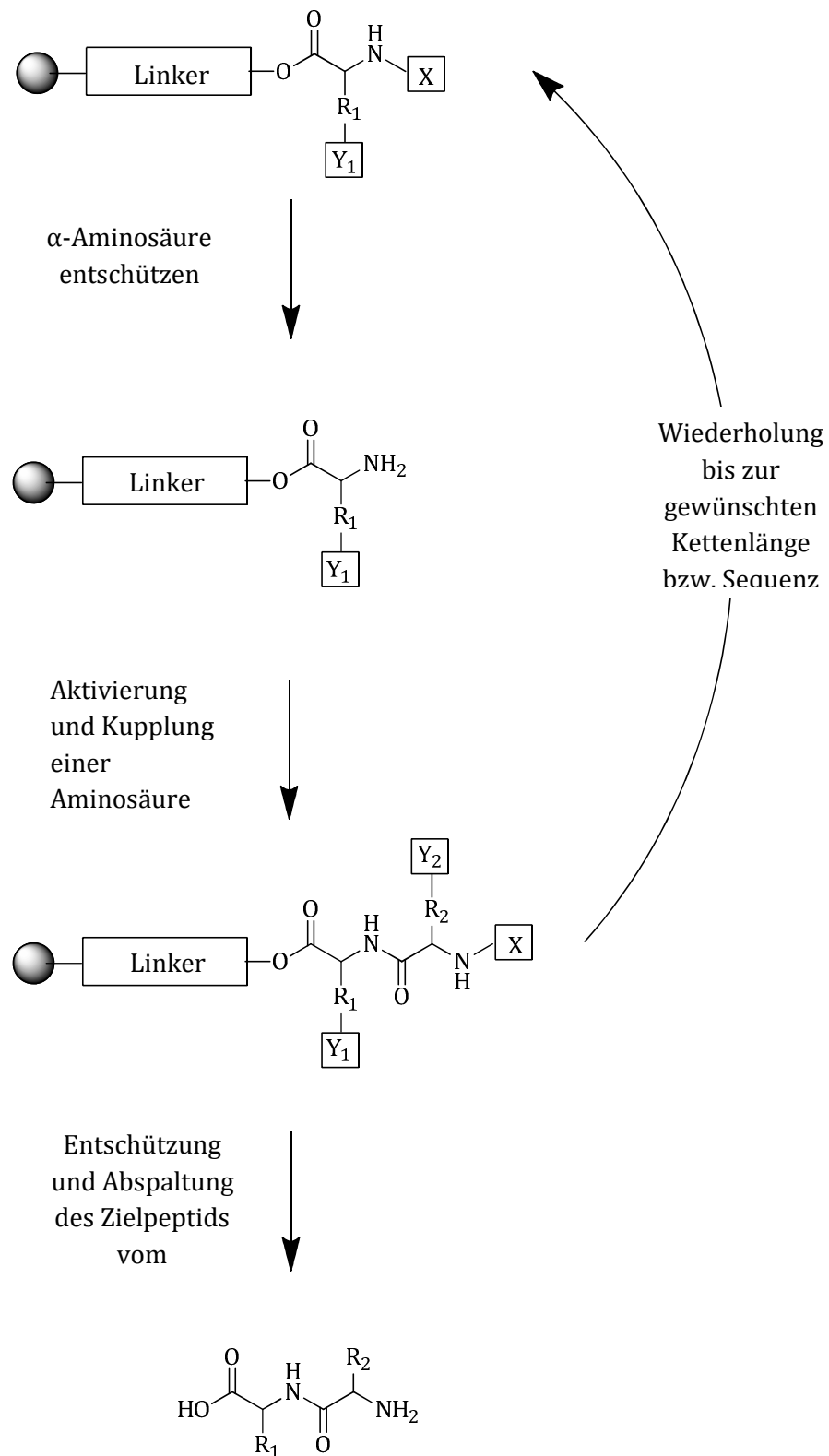


Abbildung 1 Schematische Darstellung der SPPS^[5]; X = Schutzgruppe der Aminofunktion;
Y₁, Y₂ = Seitenkettenschutzgruppen

1.1.1 Orthogonale Schutzgruppenstrategie

In der Peptidsynthese werden die funktionellen Gruppen des C- bzw. N-Terminus mit Schutzgruppen versehen, welche z.B. durch verschiedene pH-Stabilität unabhängig voneinander abgespalten werden können. Dieses Vorgehen wird als orthogonale Schutzgruppenstrategie bezeichnet. Nebenreaktionen mit den Seitenketten während der Synthese können auf diese Weise beinahe vollständig unterdrückt werden.

Sowohl im mikropartikelbasierten Verfahren (Abschnitt 1.2) als auch in der vorliegenden Arbeit wurde die von Carpino eingeführte Fmoc-Schutzgruppenstrategie angewendet.^[6-8] Während der Synthese werden die Aminogruppen mit der Fmoc-Schutzgruppe geschützt. Diese wird nach jedem Syntheseschritt mit Piperidin abgespalten. Die Seitenschutzgruppen hingegen werden erst nach vollendeter Synthese mit Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid; TFA) abgespalten, wie in Abbildung 2 exemplarisch anhand eines Fmoc- und Trityl-geschützten Histidins gezeigt.

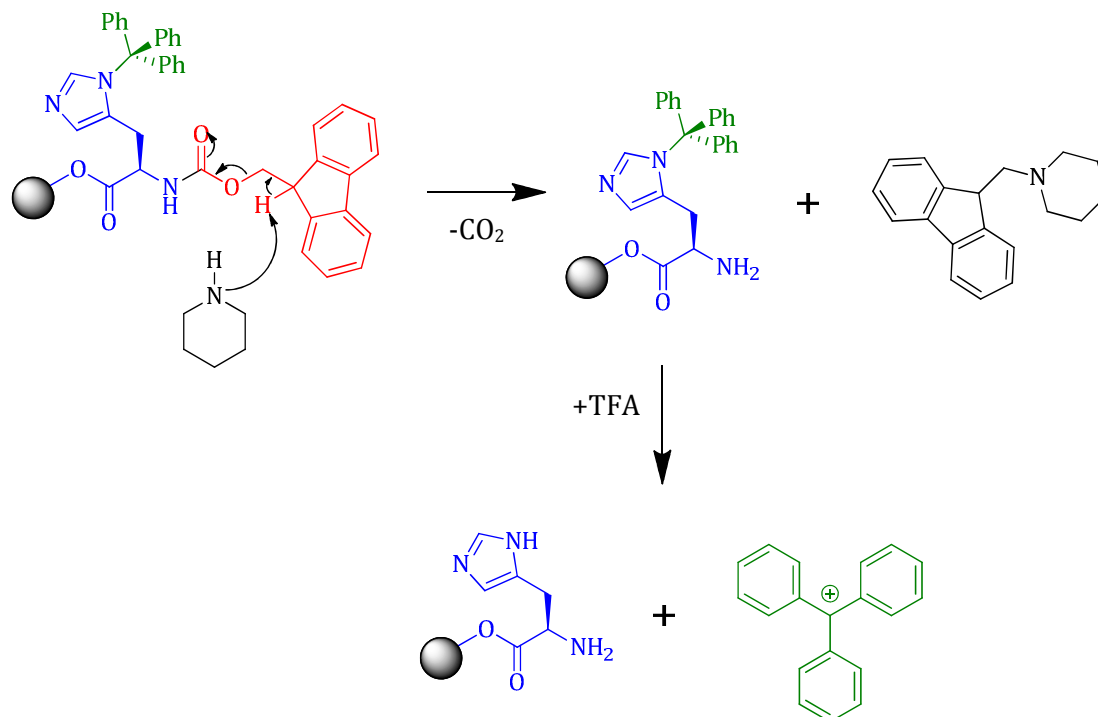


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Fmoc-Synthesestrategie am Beispiel eines Tritylgeschützten Histidins

Bei der Fmoc-Entschützung entsteht ein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (PDFA), dessen Konzentration in der Abspaltlösung photometrisch beim spezifischen Extinktionsmaximum von 301 nm bestimmt werden kann. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt am Maximum 5129 L·mol⁻¹·cm⁻¹.^[9] Dies stellt eine Möglichkeit dar, quantitative Aussagen über Kupplungs- bzw. Abspalteffizienz an der festen Phase und damit über den Derivatisierungsgrad zu treffen (vgl. 3.2.1). Dieser ist wiederum ein Maß für die Dichte an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche.

Einige gängige Seitenkettenschutzgruppen der Fmoc-Synthesestrategie sind in Abbildung 3 dargestellt.

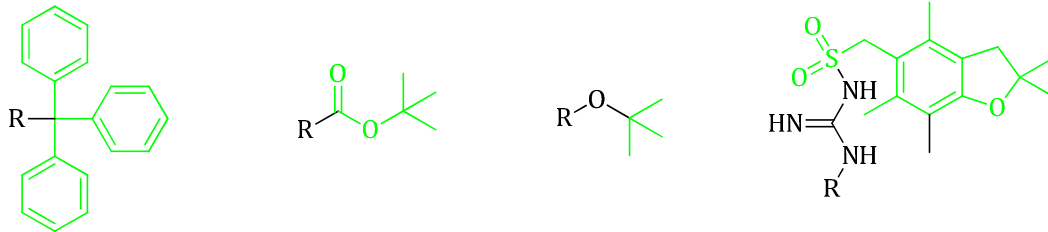


Abbildung 3 Einige Seitenketten-Schutzgruppen der Fmoc-Synthesestrategie (grün); dargestellt (von links nach rechts) sind die Tritylgruppe (Trt), die *tert*-Butoxycarbonylgruppe (Boc), die *tert*-Butylgruppe (*t*Bu) und die 2,2,4,6,7,-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylgruppe (Pbf)

Dabei wird Trt bei der Seitenkettenschützung von Asn, Cys, Gln und His verwendet, Boc für Lys und Trp, *t*Bu für Asp, Glu, Ser, Thr und Tyr. Arg benötigt eine spezielle Schutzgruppe, die Pbf-Schutzgruppe, die typische Nebenreaktionen wie z.B. Ornithinbildung wirkungsvoll unterdrückt und gleichzeitig Schützung und Entschützung in hohen Ausbeuten ermöglicht.^[10]

1.1.2 Aktivierungsreagenzien

Für eine erfolgreiche Peptidsynthese müssen die Aminosäuren in Aktivester überführt werden. Andernfalls würde keine kovalente Bindung, sondern ein Ammoniumcarboxylat ausgebildet werden. Dennoch sollte trotz der Aktivierung eine Racemisierung möglichst unterdrückt werden. In der Fmoc-Syntheseroute kann diese z.B. auftreten, wenn stark aktivierte Carboxygruppen durch die Ausbildung von Oxazolonen und deren Ringöffnung racemisieren:

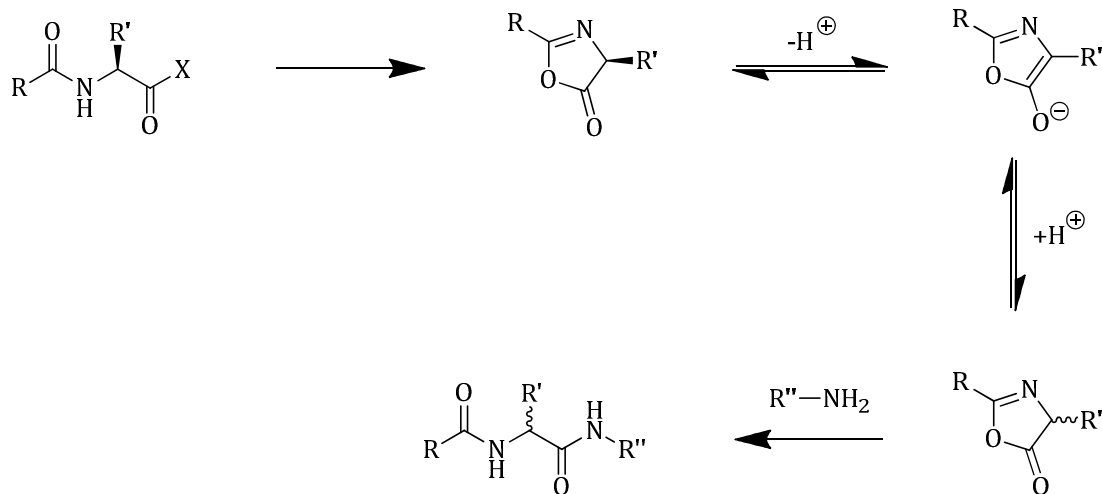


Abbildung 4 Racemisierung von Fmoc-geschützten Aminosäuren durch Oxazolonebildung^[5]

Des Weiteren kann es zu seitenkettenspezifischen Racemisierungen kommen, die an dieser Stelle nicht besprochen werden sollen.^[5,11]

Abbildung 5 gibt einen Überblick über einige gängige Aktivierungsreagenzien in der SPPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Bedeutungen der in diesem Kapitel verwendeten Abkürzungen dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

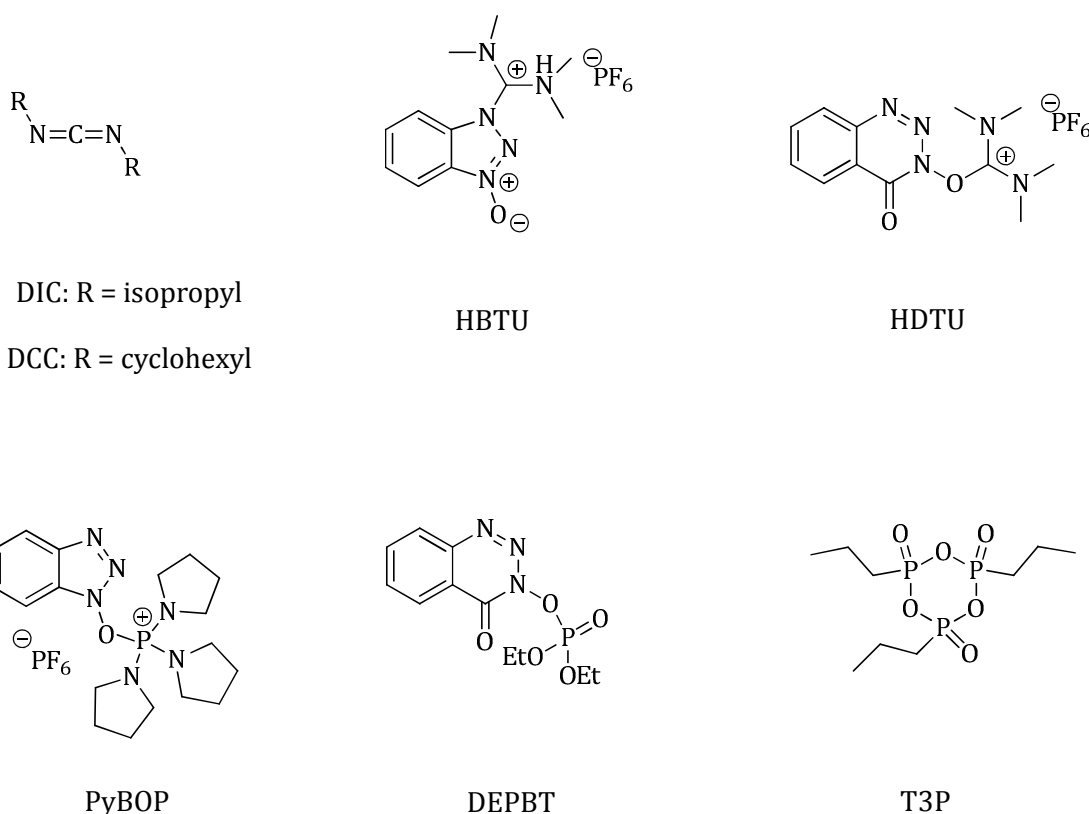


Abbildung 5 Verschiedene Aktivierungsreagenzien für die Aminosäure-Carboxy-Funktion

Carbodiimide wie DCC und DIC sind toxisch und sensibilisierend. Insbesondere DCC wird daher wenn möglich vermieden. Allerdings werden sie aufgrund des geringen Preises nach wie vor zur Erstellung von lagerfähigen Aktivestern eingesetzt.

Aminiumsalze wie HBTU^[12] sowie Uroniumsalze wie HDTU^[13] finden häufig Verwendung in der SPPS. Phosphoniumsalze wie PyBOP^[14] werden unter anderem zur Zyklisierung festphasengebundener Peptide verwendet, wo sie bessere Ausbeuten und höhere Reinheit der Produkte erzielen als z.B. Aminiumsalze. Ebenso können Organo-Phosphoester wie DEPBT^[15] zur Aktivierung verwendet werden, die nicht hygroskopisch und daher besser lagerungsfähig sind. Dieses gilt ebenso für Alkylphosphorsäureanhydride wie das in Abbildung 5 gezeigte T3P.^[16]

Hydroxylamine wie HOBt oder HODhbt werden zusätzlich verwendet, um Racemisierung zu vermeiden.^[17] Die resultierenden Aktivester weisen allerdings auch eine verminderte Reaktivität auf.

HOAt oder HODhat ergeben im Vergleich reaktivere Aktivester. Aufgrund ihrer komplizierten Herstellung und des daraus resultierenden Preises werden sie allerdings

fast ausschließlich für komplizierte Kupplungen von z.B. nicht natürlichen Aminosäuren verwendet.^[18] Des Weiteren werden oft Basen wie NMI, DIPEA oder DMAP verwendet, um die Kondensationsreaktion zu beschleunigen.^[5]

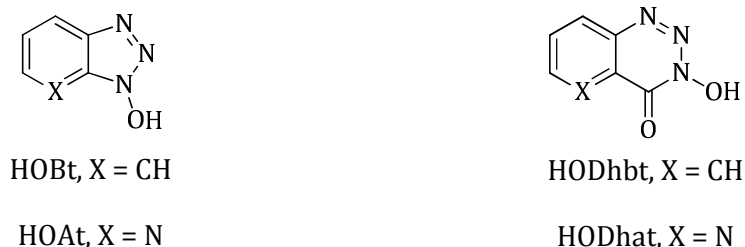


Abbildung 6 Additive zur Verminderung von Racemisierungen während Kondensationsreaktionen von Aktivestern

Zur Kupplung können Aminosäuren auch in Säurechloride^[19-21] oder -fluoride^[22] überführt werden. Die ersten Glycylpeptide wurden z.B. mit Säurechloriden dargestellt.^[1] Das Verfahren hat allerdings den Nachteil, dass eine Base anwesend sein muss, um die frei werdenden Halogenwasserstoffe zu neutralisieren. Dadurch können die Säurehalogenide in Oxazolone überführt werden, deren Reaktivität deutlich geringer ist. Das Verfahren kommt deshalb bei sterisch anspruchsvollen, nicht natürlichen Aminosäuren zum Einsatz, bei denen andere Reagenzien nicht in Frage kommen.^[13,22]

Einige Aktivester sind trotz ihrer Reaktivität stabil genug, um isoliert werden zu können und somit lagerfähig. Häufig angewendete Reagenzien sind dabei Succinimidester, Nitrophenolester und Pentafluorphenolester. Letztere kommen in der mikropartikelbasierten Peptidsynthese zum Einsatz, da sie gute Ausbeuten auch ohne Anwesenheit einer zusätzlichen Base erzielen. Die Herstellung erfolgt über Kondensation der Fmoc-geschützten, DIC-aktivierten Aminosäure mit Pentafluorphenol.

1.2 Peptidsynthese im Arrayformat

Die Vision, viele mögliche Interaktionen mit geringem Proben- und Zeitaufwand zu untersuchen, wurde von Ekins^[23] erdacht und erstmalig durch DNA-Arrays realisiert. Diese können durch lithographische^[24], elektrolytische^[25] oder elektrophoretische^[26] Verfahren hergestellt werden. Dabei reicht die Auflösung der hergestellten DNA-Arrays von etwa 250 000 Oligonucleotiden pro cm^2 für photolithographisch hergestellte Arrays^[27] bis hin zu über einer Million pro cm^2 .^[28-30]

Die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist zur Untersuchung von *in vivo* ablaufenden Prozessen ebenfalls relevant, allerdings ist die Herstellung von Protein- und Peptidarrays deutlich komplexer, da im Vergleich zu den vier DNA-Basen 20 proteinogene Aminosäuren existieren. Für Proteinarrays erweist sich außerdem der Erhalt der Tertiärstruktur der Proteine auf der Oberfläche als Problem.^[31-32]

Peptid-Protein-Wechselwirkungen können nicht als Modell für alle möglichen Protein-Protein-Wechselwirkungen betrachtet werden, insbesondere wenn definierte Faltungen für eine Interaktion erforderlich sind. Allerdings gibt es eine Vielzahl von Bindungsdomänen, z.B. SH2-, SH3-, PH-, oder EVH1 Domänen, deren Bindungstaschen mit Peptiden interagieren.^[33]

Der lithographische Herstellungsansatz ist auf Peptidarrays^[34-35] nur schwer übertragbar. Neben den aufwendigen Prozeduren und den teuren Apparaturen sind dafür in erster Linie die geringe Syntheseausbeute und die hohe Anzahl an Kupplungsschritten verantwortlich.^[36]

Die von Ronald Frank entwickelte SPOT-Synthese stellte bereits 1992 einen Meilenstein in der Synthese von Peptiden im Arrayformat dar.^[37] Dabei wurden die Prinzipien der Merrifield-SPPS mit orts aufgelöster Deposition aktivierter Aminosäurederivate kombiniert. Als Synthesematrix diente Cellulose, auf die jeweils alle 20 Aminosäuren in Lösung aufgebracht wurden und analog der SPPS verschiedene Peptide aufgebaut wurden. Allerdings erreichen die erhaltenen Arrays lediglich Auflösungen von 25 Peptiden pro cm^2 , da die Auflösung durch das Lösungsmittel, welches verläuft und verdampft, limitiert ist. Die Kosten betragen dabei 7-14 € pro Peptid. Im Vergleich zu an fester Phase synthetisierten Peptiden, die bereits mehrere hundert Euro pro mg kosten können, ist dies eine deutliche Preisreduktion.^[38] Für Proteomanalysen, bei denen oftmals mehrere 100 000 Peptide untersucht werden müssen, ist dieser Preis dennoch zu hoch.

Der mikropartikelbasierte Ansatz, welcher am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) entwickelt wurde, ist in der Lage, die Kosten pro Peptid deutlich zu reduzieren. Das Verfahren beruht auf der ortsgenauen Ablagerung von in einer Tonermatrix eingebetteten, aktivierten Aminosäurebausteinen. Zur Ablagerung wird entweder ein Laserdrucker^[39] oder ein CMOS-Chip^[40-42] verwendet. Dabei werden derzeit Auflösungen von 800 Peptiden pro cm^2 mit dem Laserdrucker und 40 000 Peptide pro cm^2 mit dem Chipverfahren erzielt. Neue, am KIT entwickelte Verfahren ermöglichen sogar bis zu 1 000

000 Peptide pro cm^2 .^[43] Die Entwicklung und Charakterisierung der Tonerpartikel sowie des Laserdruckers ist in der Literatur ausführlich beschrieben.^[9,39,44]

Die Vorteile dieser Verfahren gegenüber der SPOT-Synthese sind dabei zum einen die Tatsache, dass die Auflösung nicht durch das Lösungsmittel beschränkt wird. Wird in der SPOT-Synthese die Spotgröße und damit das Volumen des Lösungsmittels zu weit reduziert, verdampft oder verläuft es, bevor die Reaktion vollständig abgelaufen ist, da die Flüssigkeitsvolumina sehr klein werden. Zum anderen werden bei den mikropartikelbasierten Verfahren alle 20 Aminosäuren in einem Schritt abgelagert und anschließend nur ein Kupplungsschritt ausgeführt, was eine große Zeitersparnis bewirkt. Auch lässt sich das Prinzip gut skalieren. Derzeit werden Verfahren entwickelt, die eine theoretische Auflösung von über einer Million Peptide pro cm^2 ermöglichen. Das mikropartikelbasierte Verfahren ist schematisch in Abbildung 7 gezeigt.

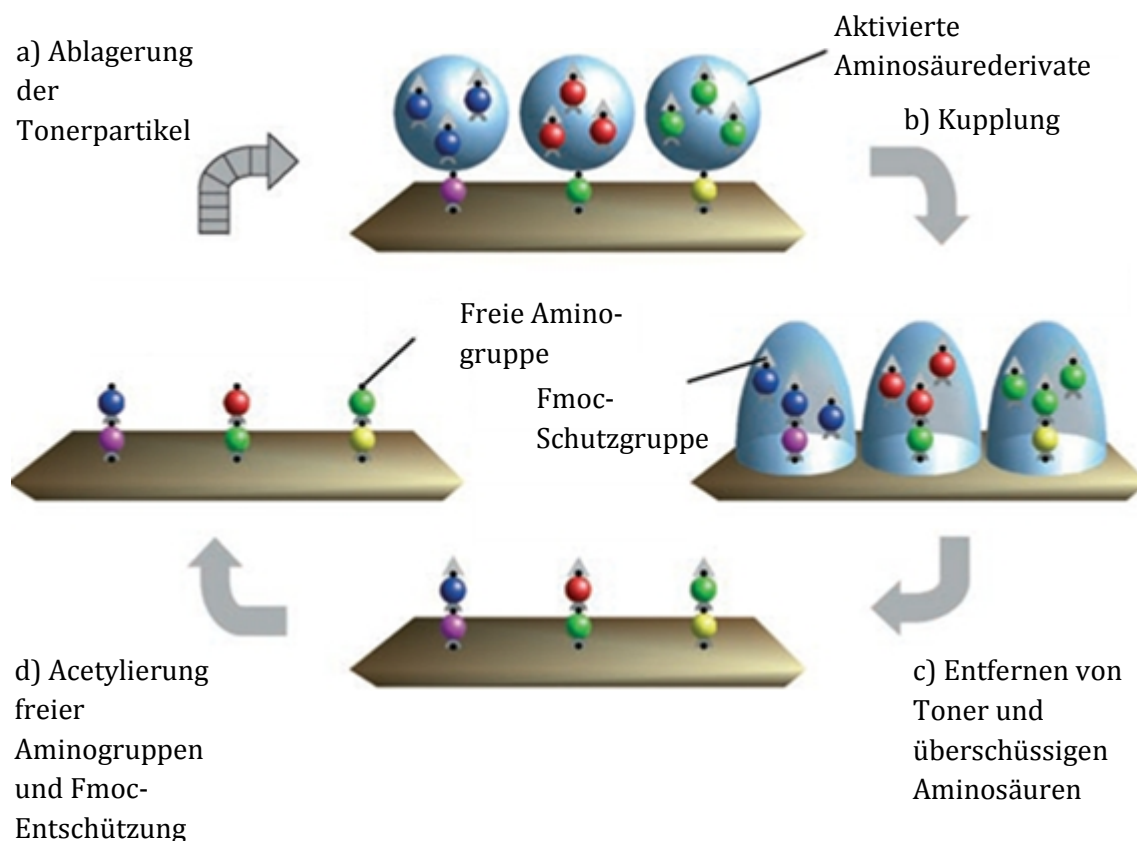


Abbildung 7 Schematische Darstellung der mikropartikelbasierten SPPS^[39]

Der erste Schritt der tonerbasierten Peptidsynthese ist die Ablagerung der Mikropartikel mit einem Laserdrucker oder einem CMOS-Chip auf der Syntheseoberfläche, einem Polyethylenglycolmethacrylat-Polymer (PEGMA). Die Hydroxylgruppen der Oberfläche

sind mit β -Alanin verestert, um Aminogruppen für eine effektivere Kupplung einzuführen. Das Tonermaterial wird nach der Ablagerung auf der Syntheseoberfläche auf 90 °C erhitzt, wodurch die Diffusion der Aminosäurebausteine zur Syntheseoberfläche und Reaktion mit den Aminogruppen ermöglicht wird. Im Anschluss werden überschüssige Aminosäurederivate sowie die Tonermatrix entfernt. Nachdem nicht abreagierte Aminogruppen zur Reduzierung von Nebenreaktionen acetyliert wurden, kann die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten werden und der Kupplungszyklus wiederholt werden.

1.3 Aufreinigung von Peptidarrays

Trotz hoher Ausbeuten in den einzelnen Kupplungsschritten steigt die Zahl der Abbruchprodukte mit jeder Synthesestufe. Insbesondere im mikropartikelbasierten Verfahren kann es zudem zu Kontaminationen von benachbarten Spots durch falsch abgelagerte Partikeln kommen. In der SPOT-Synthese sind die Ausbeuten für Peptide mit einer Kettenlänge von 15 Aminosäuren vergleichbar mit Ausbeuten für SPPS an Polymeren.^[45-46] Die Ausbeute hängt dabei aber stark von Sequenz, Kettenlänge und Synthesestrategie ab. So sind auch Ausbeuten von 40 bis über 92% publiziert worden.^[47-50] Diese Ausbeuten wurden durch Abspaltung und Analyse mittels HPLC bestimmt. In komplexeren Molekülbibliotheken ist diese Analyse nur schwer durchführbar, da zum einen die Mengen an Peptiden pro Spot geringer sind, zum anderen ist ortsgenaues Abspalten, Aufnehmen, Aufreinigen und erneutes Immobilisieren nicht praktikabel. Soll eine Aufreinigung erfolgen, so muss diese unter Erhalt der Ortsinformation und Spotauflösung des Arrays erfolgen. Im Idealfall sollte die Peptidkonzentration während dem Übertrag normalisiert werden und danach in allen Peptidspots gleich sein.

Die Entstehung von Nebenprodukten sowie das Prinzip einer solchen Aufreinigung sind in Abbildung 8 dargestellt.^[51]

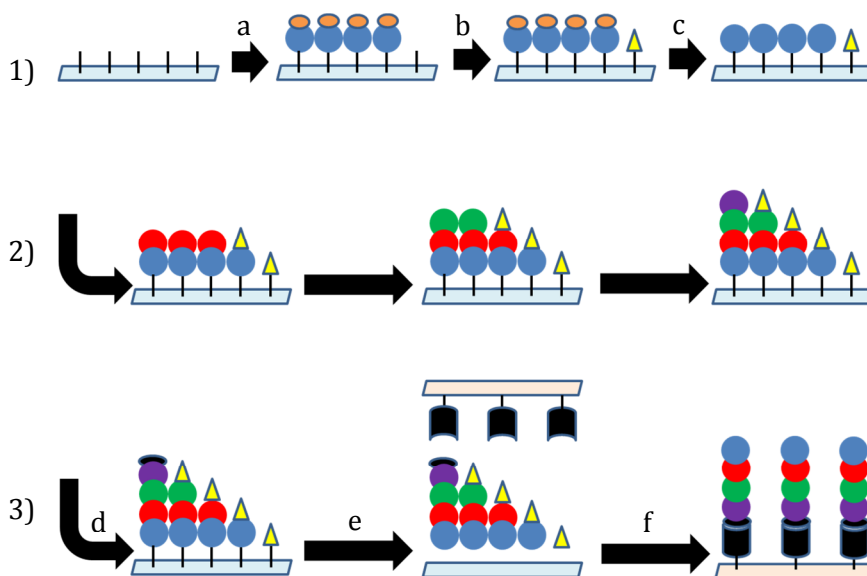


Abbildung 8 Synthese und Aufreinigung eines Peptidarrays: 1) Zunächst wird auf eine Oberfläche mit einer spaltbaren Anbindungsstelle eine Fmoc(orange-farbene Ellipse)-geschützte Aminosäure gebunden (a). Nicht abreagierte Aminogruppen werden acetyliert (gelbes Dreieck)(b). Die Fmoc-Schutzgruppe wird entfernt (c). 2) a, b und c werden für weitere Fmoc-geschützte Aminosäuren wiederholt. 3) Die korrekt synthetisierten Peptide werden mit einer Ankergruppe funktionalisiert (d) und von der Syntheseoberfläche abgespalten (e). Schließlich werden nur die korrekt synthetisierten Peptide auf einer Zieloberfläche immobilisiert (f).

Eine Aufreinigung eines hochdichten Peptidarrays unter Erhalt der Ortsinformation wurde erstmals durch Anbindung von Cystein an den N-Terminus der Peptide eines Arrays und Übertrag auf eine goldbeschichtete PVDF-Membran realisiert.^[51-52] Die Peptide wurden auf einem Rink-Amid-Linker (RAL) synthetisiert, welcher unter den Transferbedingungen, 50 % TFA in Toluol (v/v), gespalten wurde. Die Immobilisierung erfolgte über die Reaktion der Thiolgruppe des Cysteins mit Gold. Mit dem Verfahren konnten bereits Strukturen mit wenigen μm Größe übertragen werden.^[51-52]

Peptide, welche Cystein in der Sequenz enthalten, können dabei nicht vollständig aufgereinigt werden. Außerdem kann die Goldschicht auf starren Oberflächen zu Fluoreszenzauslöschungen führen und somit die Signalintensität verringern, im Extremfall werden Signale sogar komplett unterdrückt.^[53] Alternative Systeme zur Immobilisierung müssten mit den Spaltbedingungen des RAL kompatibel sein, was einer starken Einschränkung entspricht. Zuletzt ist die Abspaltrate des verwendeten RAL hoch, so dass unter den Transferbedingungen bereits nach wenigen Überträgen die Qualität der übertragenen Arrays deutlich reduziert ist.^[51]

Ein denkbares, alternatives System zur Immobilisierung wäre die Wechselwirkung zwischen dem Protein Streptavidin und dem Vitamin Biotin. Für die Immobilisierung von Molekülen eignet sich das System insbesondere aufgrund der hohen schnellen Anbindung^[54] und der Tatsache, dass keine Aktivierung durch Säuren, Basen oder sonstige Katalysatoren erforderlich ist.

Streptavidin, ein Protein mit einer Masse von 52 kDa bis 62 kDa, ist ein Homotetramer, welches aus Bakterien des Stammes *Streptomyces avidinii* gewonnen werden kann. Die Quartärstruktur des Tetramers ist in Abbildung 9 gezeigt.

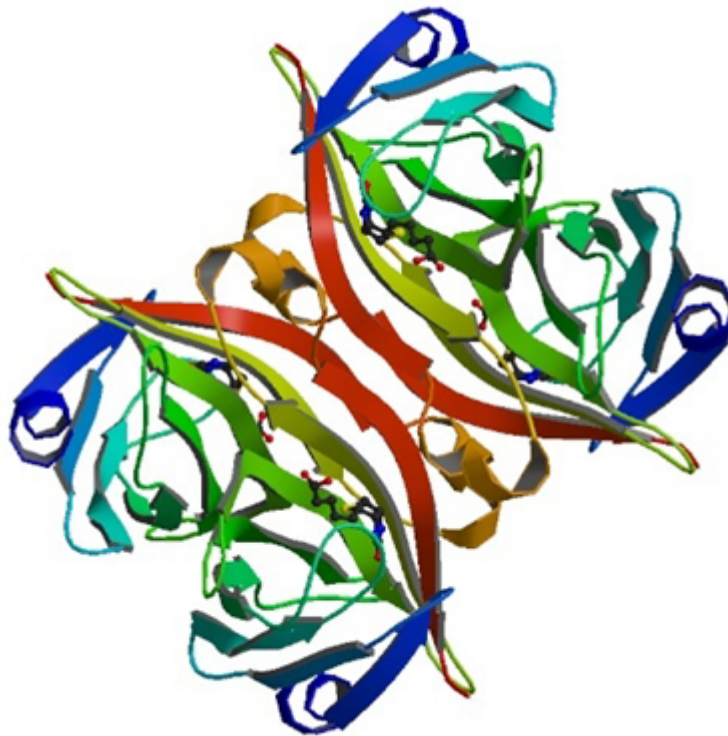


Abbildung 9 Dreidimensionale Struktur des Streptavidin Homotetramers; die Farbgebung entspricht einem Gradienten vom N-(blau) zum C-Terminus(rot) (PDB ID: 1STP)

Erstmals wurde das Protein 1963 von Tausig beschrieben.^[55] Wie auch Avidin zeigt es antibiotische Eigenschaften gegenüber *Escherichia coli* Bakterien, die auf die starke Affinität dieser Proteine zu dem Vitamin Biotin zurückzuführen sind.^[56] Obwohl Affinität und Struktur beider Proteine vergleichbar sind, unterscheiden sie sich sowohl in ihrer Primärstruktur als auch dahingehend, dass Streptavidin kein glykosiliertes Protein ist. Außerdem liegt sein isoelektrischer Punkt deutlich näher am Neutralbereich und es neigt weniger zu unspezifischen Wechselwirkungen als Avidin, welches stark positiv geladen ist.^[57]

Die Bindung von Biotin an Streptavidin wird im Wesentlichen durch Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen vermittelt, bei denen Tryptophane eine wichtige Rolle spielen. Außerdem kommt es während der Bindung zu einer Reorganisation an der Proteinoberfläche.^[58-60]

Die Bindungsdissoziationskonstante K_D beträgt für an Streptavidin gebundenes Biotin 10^{-15} mol/L und ist somit eine der stärksten, nichtkovalenten Bindungen überhaupt.^[56]

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung in wässriger Lösung bei 70 °C gelöst werden kann, ohne das Streptavidin zu denaturieren.^[61] Tatsächlich ändert sich die Denaturierungstemperatur des Streptavidins durch Biotinbindung um etwa 40 °C.^[60] Dies illustriert die insbesondere für Proteine hohe Stabilität der Streptavidin-Biotin-Bindung.

2 Motivation und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein Verfahren zu entwickeln das es ermöglichen sollte, Peptidarrays auf beinahe jede beliebige Zieloberfläche zu übertragen. Insbesondere sollte das Streptavidin-Biotin-System für die Immobilisierung verwendet werden.

Da Streptavidin als Protein bei Kontakt mit TFA und Toluol, die beim Übertrag auf goldbeschichtete Membranen zur Spaltung des RAL dienen, schnell denaturieren würde, war es wichtig, ein alternatives Verfahren zur Abspaltung synthetisierter Peptide zu finden, welches den Transfer unter milden Bedingungen ermöglicht. Idealerweise sollte die Abspaltung dabei eine kontrollierte Freisetzung von Peptiden ermöglichen, da so nicht nur eine Kopie mit verbesserten Eigenschaften, sondern eine möglichst große Anzahl von Kopien erstellt werden kann. Theoretisch sollte eine mit Streptavidin funktionalisierte Oberfläche zwischen 0,1 und 5 pmol Biotinbindungsstellen pro cm^2 besitzen.^[62] Bei einem Derivatisierungsgrad von einigen nmol pro cm^2 nach der Synthese im Arrayformat^[9] sollten selbst bei großen Verlusten während der Überträge mehrere Kopien möglich sein.

Zudem ermöglicht ein Transfer unter milden Bedingungen auch den Transfer auf spezialisierte Oberflächen, z.B. Sensoroberflächen zur markierungsfreien Detektion, auf denen die direkte Arraysynthese problematisch ist. Auch für Oberflächen, die mit der Synthese prinzipiell kompatibel wären, ist eine einfache Möglichkeit der Replikation ohne Qualitätsverlust erstrebenswert. Diese Systeme ermöglichen es, Dissoziationskonstanten zu bestimmen und damit die Affinität von Antikörpern zu Epitopen. So könnten hoch affine, pathogenspezifische Epitope aus Seren ganzer Patientenpopulationen für einen Bruchteil der aktuellen Kosten ermittelt werden.

3 Resultate und Diskussion

3.1 Erste Versuche zur Spaltung und Mehrfachübertrag

Der erste Schritt zur Etablierung des Streptavidin-Biotin-Systems war die Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur Abspaltung von Peptiden von nach deren Synthese. In der SPPS existiert ein breites Spektrum an verfügbaren, spaltbaren Linkern.^[63-64] Deren Spaltbedingungen sind allerdings oft zu drastisch, um von einem Protein wie Streptavidin toleriert zu werden. In Frage kommen daher lediglich photolabile Nitrobenzol-Systeme^[65-67] oder „safety catch“-Linker, wie Hydrazinlinker, die unmittelbar vor der Spaltung oxidiert und dadurch gegenüber nucleophilen Angriffen aktiviert werden.^[68-69] In vorangegangenen Arbeiten zeigte sich allerdings, dass auf den Synthesefilmen nur eine geringe Kupplungsausbeute des Linkers, sowie der ersten Aminosäure auf dem Linker erzielt werden konnte. Des Weiteren erfolgte die Abspaltung nur mit geringer Effizienz und unter Nebenreaktionen, die den Nachweis der übertragenen Epitope nicht zuließen.^[51] Die Trennung von Entschützung, Abspaltung und Übertrag erschien als die bester Ansatz einen Transfer unter milden Bedingungen zu ermöglichen.

In der SPOT-Synthese auf Cellulosemembranen können nach beendeter Synthese die Peptide durch Aminolyse der Esterbindung an der Cellulose mit Ammoniak abgespalten werden. Das so erhaltene Säureamid wird im Anschluss mit Lösungsmittel aufgenommen und für Assays verwendet.^[70-73] Im mikropartikelbasierten Verfahren sind die Peptide ebenfalls über eine Esterbindung an die PEG-Seitenketten der Synthesematrix, einem PEGMA-PMMA-Copolymer gebunden.^[74-76] Um zu testen, ob eine mehrfache Aminolyse dieser Esterbindung möglich ist, wurde ein Peptidarray der Firma PEPperPRINT mit Sequenzvarianten des Hämagglutinin(HA)-Epitops YPYDVDPYA verwendet. Die Peptide wurden *N*-terminal auf eine Kettenlänge von 15 Aminosäuren verlängert, da bei einer Immunfärbung 3-5 Aminosäuren Abstand zwischen Epitop und Oberfläche die Zugänglichkeit für Antikörper und damit die Signalintensität erhöhen können.^[77] An den *N*-Terminus des Peptides wurde deshalb eine alternierende Sequenz aus Glycinen und Serinen angebracht. Serin sollte dabei eine gute Löslichkeit der erhaltenen Peptide gewährleisten. Zusätzlich wurde als letzte Aminosäure ein Cystein gekuppelt, über das die Peptide nach dem Transfer analog dem unter Abschnitt 1.3 beschriebenen Verfahren auf einer goldbeschichteten Membran immobilisiert werden sollten.^[51] Zur Überprüfung der Spezifität der Anbindung wurden außerdem Kontrollpeptide ohne *N*-terminales Cystein eingebaut. Die vollständige Sequenz der Peptide war demnach CGSGSGYPYDVDPYA beziehungsweise SGSGSGYPYDVDPYA. Innerhalb dieser Sequenzen wurden einzelne Aminosäuren substituiert, um insgesamt 5 Varianten zu generieren.

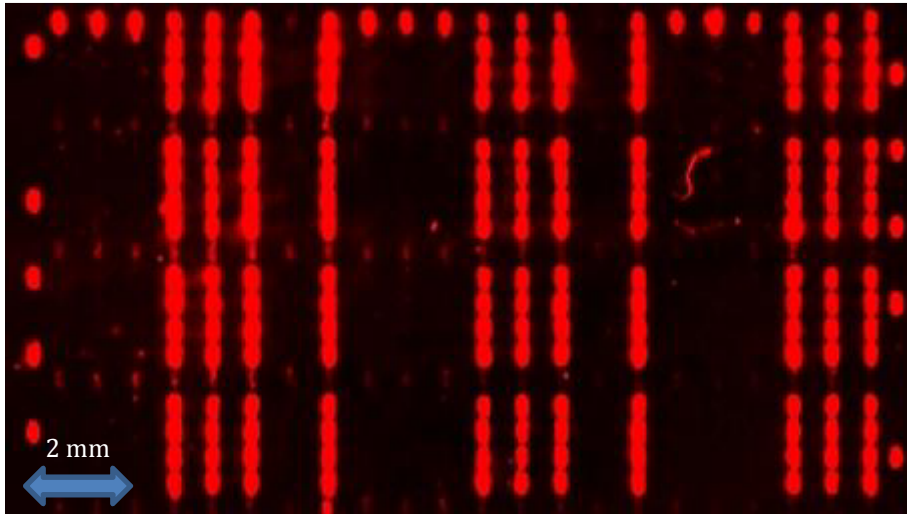


Abbildung 11 Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 des Übertrages des Array 1 auf einer goldbeschichtete PVDF-Membran (Intensität 5). Die Varianten 1,2 und 3 des HA-Epitops innerhalb des Peptids (In Abbildung 10: YPY^TVDPYA (1), YPY^SVDPYA (2), YPY^NVDPYA(3)) waren aufgrund der stark verringerten Affinität zum Antikörper nicht nachweisbar. Wildtyp und die Varianten YPS^DVDPYA (4) YPN^DVDPYA (5) konnten übertragen und detektiert werden.

Die HA-Mutationen mit geringerer Affinität (1-3) zum Antikörper waren auf der Membran nur schwach sichtbar. Die Sichtbarkeit der Kontrollreihen könnte dabei auf eine nicht ausreichende Dicke der Goldschicht und daraus resultierender, unspezifischer Adsorption zurückzuführen sein. Auffällig ist, dass die senkrechten Kontrollreihen weniger sichtbar sind als die waagrechten. Dies konnte auf einen synthesebedingten Fehler in der Aminosäuresequenz innerhalb dieser Reihen zurückgeführt werden. Das Array konnte also erfolgreich übertragen und die Epitope mit Antikörpern nachgewiesen werden.

Mehrfachüberträge eines Arrays konnten mit dem RAL-System bereits realisiert werden.^[51] Daher wurde getestet, ob nach dem in Abbildung 11 gezeigten Transfer weitere Replikate erstellt werden konnten.

Der verwendete Synthesträger wurde nach dem ersten Transfer in Toluol, DCM DMF und MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet, erneut für 24 h in Ammoniakgas inkubiert und das Array zum zweiten Mal auf eine goldbeschichtete Membran übertragen. Dies wurde im Anschluss für den dritten Übertrag wiederholt. Für den vierten Übertrag wurde das Peptidarray 96 h mit Ammoniak inkubiert und anschließend intensiv mit DMF und MeOH gewaschen um abgespaltene Peptide zu entfernen und damit mehrere Überträge ohne Immunfärbung zu simulieren. Nach einer erneuten 24 h Inkubation wurde das Array zum vierten Mal übertragen. Alle Membranen wurden nach dem Transfer mit EG7-SH behandelt und gemäß dem Standardprotokoll angefärbt. Die Scans wurden direkt nach der jeweiligen Immunfärbung nacheinander durchgeführt.

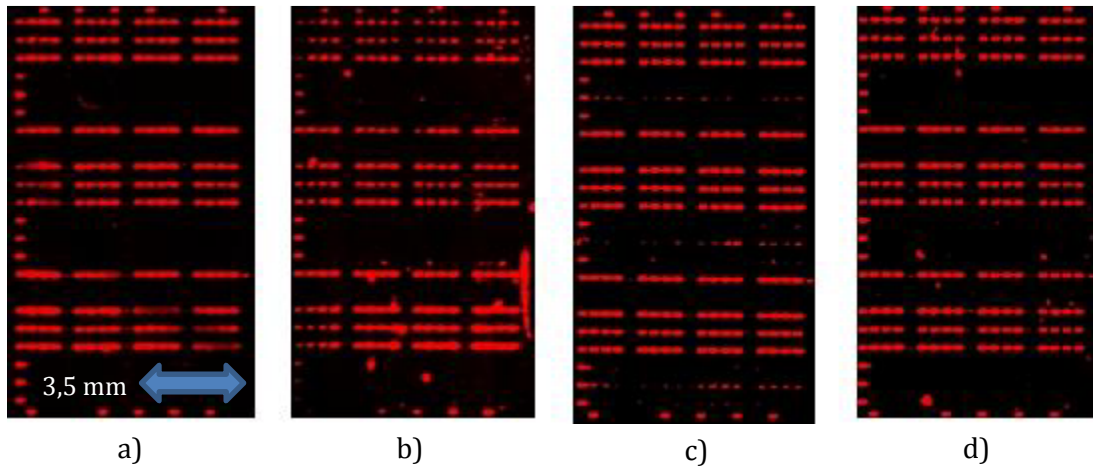


Abbildung 12 Übertrag und Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 von HA-Peptiden auf goldbeschichtete PVDF-Membranen mit anti-HA-DyLight 680; a) erster Übertrag nach 24h Ammoniakinkubation b+c) Übertrag nach jeweils weiteren 24 h Ammoniakinkubation d) Übertrag nach 96 h Ammoniakinkubation, zweistündigem Waschen und erneuter 24 h Inkubation (Intensität: 5)

Die Qualität aller angefertigten Überträge war dabei vergleichbar gut. In Abbildung c) konnten sogar das schwach bindende Epitop YPYSVPDYA nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass nach Inkubation ohne einen Übertrag die adsorbierten Peptide durch das Waschen mit DMF ausreichend entfernt werden konnten, deutete dieser Versuch darauf hin, dass nach acht Überträgen kein Qualitätsverlust durch Verlaufen der Peptidspots auftrat. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Ammoniakgas eine Methode zur kontrollierten und langsamen Abspaltung von Peptiden von der Syntheseoberfläche ist und es möglich ist, die abgespaltenen Peptide mehrmals nacheinander ortsaufgelöst auf goldbeschichteten Membranen zu immobilisieren.

3.2 Bestimmung der Abspaltrate von Peptiden durch Inkubation mit Ammoniakgas

Da für eine möglichst große Anzahl von Replikaten die Kenntnis der Abspaltrate von Peptiden durch Inkubation mit Ammoniak nötig ist, sollte diese bestimmt werden. Dafür wurde ein geeignetes Label auf der Oberfläche angebracht. Nach Inkubation mit Ammoniak für definierte Zeitintervalle wurden die Oberflächen intensiv gewaschen, um abgespaltene Peptide zu entfernen. Die verbleibende Menge an Label wurde dann durch XPS, ToF-SIMS und Photometrie bestimmt. Gleichzeitig sollte verglichen werden, welche der angewendeten Methoden sich zur Messung der Konzentrationsänderungen auf der Oberfläche am besten eignete.

Für die UV/Vis-Bestimmung wurde Methyltrityl-(Mtt)-geschütztes Glutamin, für die XPS-Messreihe ein pentafluoro-Phenylalanin (PheF₅) und für die ToF-SIMS-Messung ein Cystein als Label verwendet.

Alle Versuche wurden auf einem 100 % PEGMA-Polymer durchgeführt. Dieses bietet, im Vergleich zum 10:90-PEGMA-PMMA-Copolymer, einen deutlich höheren DG und damit theoretisch die Möglichkeit zur Erstellung einer noch größeren Anzahl von Replikaten. 100 % PEGMA Filme weisen eine hohe Proteinresistenz auf.^[76] Da diese beim Nachweis schwächer affiner Bindungen von Proteinen problematisch sein kann, wird im Laserdruckverfahren bevorzugt das 10:90-PEGMA-PMMA-Copolymer verwendet. Die hohe Proteinresistenz wirkt sich allerdings nach dem Übertrag nicht mehr auf den Nachweis aus. Daher wurde die Abspaltrate von 100 % PEGMA Filmen untersucht.

Neben der Abspaltrate sollten die Versuche auch die bevorzugte Spaltposition der Aminolyse aufklären. Abbildung 13 illustriert die beiden möglichen Spaltpositionen und -produkte.

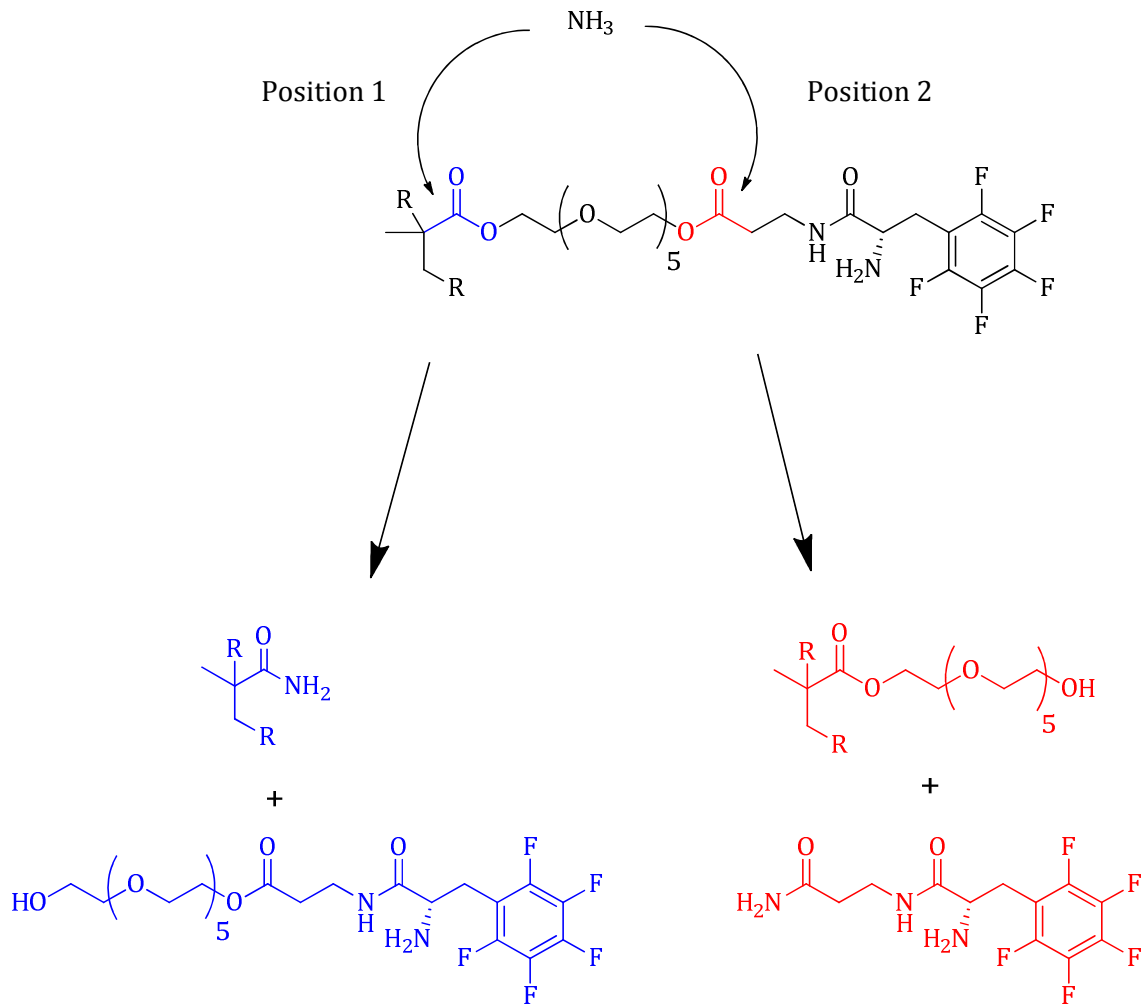


Abbildung 13 Mögliche Spaltpositionen der Aminolyse und resultierende Spaltprodukte, illustriert anhand des PheF₅-Labels; R symbolisiert das alkyliche Polymerrückgrat.

Auch eine Spaltung an beiden Positionen ist denkbar, allerdings durch den Messaufbau nur schwer nachweisbar, da eventuelle Spaltprodukte vor der Analyse aus dem Film entfernt werden. Eine Spaltung am Polymerrückgrat wäre nicht wünschenswert, da eine PEG-Kette am C-terminalen Ende des übertragenen Peptids sich durch seine Protein-abweisenden Eigenschaften eventuell negativ auf die Affinitäten von Antikörpern oder Proteinen auswirken würde.

3.2.1 Photometrische Bestimmung der Abspaltrate über sequenzielle Schutzgruppen-Abspaltung

Mittels Photometrie können Konzentrationen von Molekülen in Lösung anhand ihrer Absorptionseigenschaften quantitativ bestimmt werden.^[78] Indirekt ermöglicht die Photometrie es auch, Oberflächenprozesse zu quantifizieren: Wie unter Abschnitt 1.1.1 beschrieben kann nach Kupplung einer Aminosäure die Konzentration des PDFA bestimmt werden. Dafür wird eine Oberfläche mit angebondenen Fmoc-Schutzgruppen mit einem definierten Lösungsvolumen überschichtet bzw. in einem definierten Lösungsvolumen inkubiert. Unter Kenntnis des spezifischen, molaren Extinktionskoeffizienten kann aus dem Überstand durch das Gesetz von Lambert-Beer nach Gleichung 1 der DG einer Oberfläche in mol pro cm² bestimmt werden.^[9]

$$DG = \frac{E \cdot V}{\epsilon \cdot A \cdot d}$$

Gleichung 1 DG einer Oberfläche; E = gemessene Extinktion, V = aufgetragenes Volumen; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, A = überschichtete Fläche, d = Weglänge durch das Medium

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bestimmungen bei kleinen DG durch systematische Fehler schlechte reproduzierbar sind.^[79] Durch die Verwendung des 100 % PEGMA Polymers sollte der DG allerdings groß genug sein, dass Fehlerquellen wie Produktionsabweichungen von Küvetten nicht ins Gewicht fallen sollten.

Da Ammoniak die Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls quantitativ entfernt,^[6] konnte diese Schutzgruppe nicht zur Bestimmung der Abspaltrate der Aminolyse verwendet werden. Es wurde daher eine photometrische Bestimmung mit einer basenstabilen Seitenkettenschutzgruppe durchgeführt. Dafür wurde zunächst Trityl-geschütztes Glutamin verwendet. Die Tritylschutzgruppe lässt sich von der Seitenkette des Glutamins im Vergleich zu anderen, Trityl-geschützten Aminosäuren schneller abspalten.^[80] Das Tritylkation weist zudem einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten auf.

In einem ersten Versuch zeigte sich allerdings, dass die Entschützung zu langsam war. So stieg der Extinktionswert einer Lösung von Fmoc-Gln(Trt)-COOH in 50 % (v/v) TFA in Toluol kontinuierlich über 2 h, was auf eine nicht vollständige Entschützung innerhalb dieser Zeit hindeutete. Problematisch könnte dabei gewesen sein, dass auf ein Abfangen des Kations mit Triisobutylsilan, wie es in der SPPS üblich ist, verzichtet wurde, um die Absorptionseigenschaften nicht zu beeinträchtigen. Dieser Zeitrahmen ist aufgrund der Verdampfung des Gemisches während dieser Zeit kritisch. Da eine quantitative Entschützung die Grundlage für eine genaue Bestimmung ist, wurde für die Versuche stattdessen Methyltrityl(Mtt)-geschütztes Glutamin verwendet. Diese Schutzgruppe zeichnet sich durch eine höhere Säurestabilität aus und sollte daher schneller quantitativ abspaltbar sein. Allerdings stellten sich auch für diese Schutzgruppe erst nach 1 h unter Berücksichtigung eines Lösungsmittelverlustes durch Verdampfung konstante Extinktionswerte ein. Daher wurden die Bestimmungen nach 1 h Inkubation mit 50 % TFA (v/v) in Toluol durchgeführt.

Zur Ermittlung der Abspaltrate wurde die Änderung des Quotienten von PDFA- und Mtt-Kationen Absorption vor und nach der Ammoniakinkubation betrachtet. Gegenüber dem Vergleich der Mtt-Kationenkonzentration vor und nach der Spaltung bietet dies den Vorteil, dass Schwankungen in der Funktionalisierung zwischen den verschiedenen Trägern und somit dem DG in der Berechnung berücksichtigt werden.

$$\text{Quotient}_{mtt/pdfa} = \left(\frac{E_{mtt}}{E_{pdfa}} \right) = \left(\frac{c_{mtt}}{c_{pdfa}} \cdot \frac{d_{mtt} \cdot \epsilon_{mtt}}{d_{pdfa} \cdot \epsilon_{pdfa}} \right)$$

Gleichung 2 Quotient aus Extinktion des Mtt-Kations und des PDFA

Da die Weglänge d für beide Experimente gleich ist und beide Extinktionskoeffizienten ϵ konstant sind, kann der in Gleichung 2 blau eingefärbte Bruch als konstant betrachtet werden. Somit entspricht ein Vergleich der Extinktion einem Vergleich der Konzentrationen. Ein Vergleich des Quotienten vor und nach der Spaltung kann daher als Maß für die Abspaltrate dienen. Gleichzeitig ermöglicht der direkte Vergleich von Extinktionen eine Ermittlung der Abspaltrate ohne genaue Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten.

Für den Test wurden Glasobjektträger zunächst mit einem $(74 \pm 2,7)$ nm Polymerfilm aus 100 % PEGMA funktionalisiert. Die Schichtdicke wurde dabei anhand eines parallel funktionalisierten Siliziumwaferstücks, welches ellipsometrisch vermessen wurde, ermittelt. Die Hydroxylgruppen der PEG-Seitenketten wurden mit β -Alanin verestert. Nachdem nichtveresterte Hydroxylgruppen acetyliert und die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten wurden, erfolgte die Umsetzung mit Gln(Mtt)-OPfp in Dimethylformamid (DMF) mit der Sandwich-Methode (siehe 5.3.3). Dieses Vorgehen reduziert den Einfluss der angebrachten Aminosäure durch induktive Effekte auf die Abspalteffizienz und erzeugt auf der Oberfläche Aminogruppen. Alle Oberflächen wurden auf Vorder- und Rückseite funktionalisiert, da es oftmals zu einer Fehlfunktionalisierung der Unterseite durch Kapillareffekte kommen kann.

Fünf der Träger wurden anschließend zur Ermittlung des Quotienten $\frac{E_{mtt}}{E_{pdfa}}$ vor der

Spaltung mit 1 mL 20 %iger Piperidinlösung in DMF für 20 min überschichtet und die charakteristische Extinktion des PDFA bei 301 nm^[9] photometrisch bestimmt. Anschließend wurden die Träger mit DMF und mit MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und direkt mit je 10 ml einer Lösung aus 50 % (v/v) TFA in Toluol pro Träger inkubiert, da eine Überschichtung größere Fehler durch Lösungsmittelverlust bewirkt hätte. Nach 30 min wurden die Träger in der Lösung gewendet, um eine beidseitige Entschützung zu gewährleisten. Die resultierenden Messwerte sowie Mittelwert und Standardabweichung sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Extinktionswerte zur Ermittlung von $\frac{E_{mtt}}{E_{pdfa}}$ vor der Inkubation mit Ammoniak

Extinktion_{Fmoc}	0,338	0,382	0,358	0,357	0,361
Extinktion_{Mtt}	1,145	1,154	1,088	0,955	1,064
Quotient $\frac{E_{mtt}}{E_{pdfa}}$	3,388	3,021	3,039	2,675	2,947
Mittelwert	3,014				
Standardabweichung	0,228				

Zu beachten ist dabei, dass der direkte Vergleich der Extinktionen in diesem Versuch den Vorteil bietet, dass die Entschätzung beider Seiten des Trägers bei der Mtt-Kation-Bestimmung in Gleichung 2 nur einen Faktor hinzufügt, der ebenfalls konstant ist und somit nur einen konstanten Faktor zur Gleichung hinzufügt.

Analog wurde der Extinktionswert des PDFA des zweiten Satzes Träger bestimmt. Nach der Bestimmung wurde mit DMF und MeOH gewaschen, die Träger im Luftstrom getrocknet und gemäß 5.5 für 12 Tage mit Ammoniakgas inkubiert. Um die Bedingungen konstant zu halten, wurde der Exsikkator alle 2 Tage evakuiert und wieder mit Ammoniak beschickt. Danach wurden die Träger entnommen, mit DMSO und MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und die Konzentration des Mtt-Kations photometrisch zur Bildung des PDFA-Mtt-Quotienten bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2 Extinktionswerte zur Ermittlung von $\frac{E_{mtt}}{E_{pdfa}}$ nach der Inkubation mit Ammoniak

Extinktion_{Fmoc}	0,376	0,402	0,339	0,376	0,418
Extinktion_{Mtt}	1,165	0,651	1,044	0,689	1,083
Quotient $\frac{E_{mtt}}{E_{pdfa}}$	3,098	1,619	3,080	1,832	2,591
Mittelwert	2,444				
Standardabweichung	0,618				

Insbesondere bei der Messung nach der Inkubation traten große Schwankungen auf, wie die Standardabweichung zeigt. Durch das Verfahren konnte nur eine grobe Abschätzung getroffen werden. Die Ergebnisse deuten auf eine Abspaltrate von ungefähr 19 % innerhalb von 12 Tagen hin. Geringe Änderungen in der Konzentration konnten, im Rahmen der Messfehler, nicht zuverlässig erfasst werden. Das Verfahren wurde daher nur zur Ermittlung der Größenordnung der Spalteffizienz verwendet, um die Inkubationsdauer für die folgenden Versuchsreihen besser einschätzen zu können. Zur genaueren Bestimmung der Abspaltrate wurden Bestimmungen mit XPS und ToF-SIMS durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der Abspaltrate über abnehmende F1s-Signale im XP-Spektrum

Für die Bestimmung der Abspaltrateffizienz mit XPS wurde, wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben, die Aminosäure PheF₅ angebunden. Dafür wurde ein 3,5 Zoll Siliziumwafer mit einem $(93,6 \pm 6,7)$ nm 100 % PEGMA-Polymerfilm funktionalisiert. Nach Veresterung mit β -Alanin wurde PheF₅ mit DIC/NMI in DMF aktiviert und angebunden. Die PDFA-Bestimmung ergab einen DG von etwa 4 nmol pro cm². Der funktionalisierte Wafer wurde anschließend in Stücke von ungefähr 0,25 cm² mit einer Kantenlänge von je etwa 0,5 cm geschnitten und in einem Exsikkator mit Ammoniakgas inkubiert. Auch in diesem Versuch wurde der Exsikkator nach zwei Tagen evakuiert und erneut mit Ammoniakgas beschickt, um eine gleichbleibende Konzentration zu gewährleisten. Die Probenentnahme erfolgte nach 2, 4, 8, 15, 25, 35 und 45 Tagen. Adsorbierte, abgespaltene Peptide wurden mit DMSO und MeOH entfernt, die Proben im Luftstrom getrocknet und bis zur XPS-Messung unter Schutzgas gelagert. Die Auswahl der Zeitintervalle erfolgte aufgrund der Annahme, dass durch die konstante, im Verhältnis zum DG hohe Ammoniakkonzentration eine Reaktion quasi-erster Ordnung vorlag. Um den entsprechend erwarteten exponentiellen Abfall besser zu erfassen, wurde daher das Messintervall am Anfang der Messung verkürzt. Für die Bestimmung der Abspaltrate wurde die Abnahme des F1s-Signals betrachtet. Ein Detailspektrum des F1s Signals ist Abbildung 14 gezeigt.

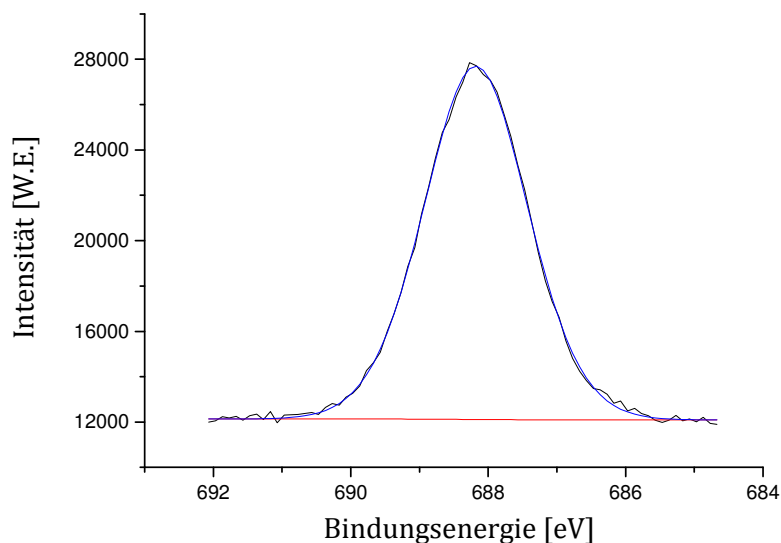


Abbildung 14 Detailspektrum des F1s Bereichs der Referenzprobe

Dabei wurde ein Fluorgehalt von 5,2 % auf der Referenz ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Messreihen wurde der Fluorgehalt der Referenz als 100 % angenommen. Abbildung 15 zeigt die Abnahme des F1s-Signals über die Inkubationsdauer mit Ammoniak.

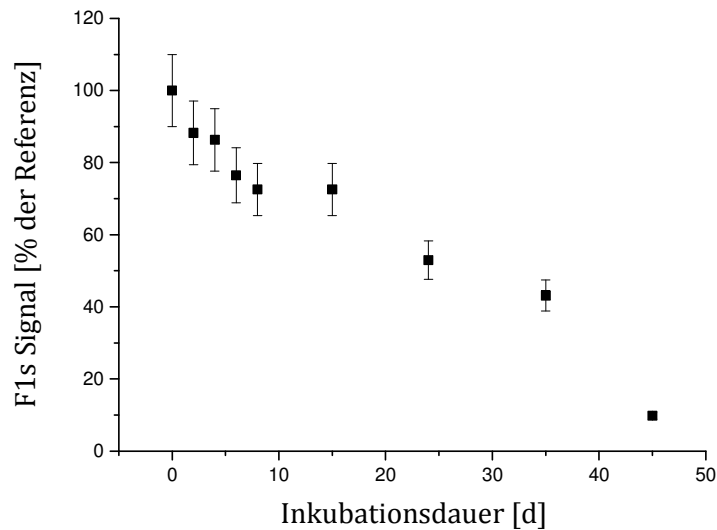


Abbildung 15 Änderung des Fluorgehalts der Probe über die Inkubationszeit

Die in Abbildung 15 gezeigten Messwerte sind jeweils Mittelwerte von zwei bis drei Messungen. Für den Fehler wurden 10 % des Messwertes angenommen (siehe Abschnitt 5). Über die Inkubationszeit ist die abfallende Tendenz erkennbar. Der nach 45 Tagen Inkubation erhaltene Messwert ist, insbesondere unter Berücksichtigung des Kurvenverlaufes und des erwarteten exponentiellen Abfalls, kritisch zu betrachten, da sich bei XPS Messungen für geringe Konzentrationen größere Fehler ergeben, als die Kalibration erwarten ließe.

Eine Betrachtung der O=C-O- beziehungsweise O=C-N- und C-F-Signale wäre zur Bestimmung der Abspaltrate ebenfalls möglich gewesen (siehe Abbildung 16). Allerdings wurde während den Messungen eine von Probe zu Probe unterschiedliche Leitfähigkeit beobachtet, was zu Aufladungen während der Messungen führte, die deutlich verbreiterte Signale zur Folge hatten. Dies resultierte im C1s Bereich zu einer deutlichen Überlagerung. Es war daher nicht für alle Proben möglich, die einzelnen Signale durch Regression zu trennen. Außerdem hätte eine vollständige Aminolyse keine Signalreduzierung auf 0 % zur Folge gehabt, sondern eine maximale Reduzierung auf 12,5 % des Anfangswertes, da mindestens eine Esterbindung beziehungsweise ein Säureamid erhalten bleibt (vgl. Abbildung 13). Des Weiteren wird die Messung in diesem Bereich von nicht vollständig funktionalisierten PEG-Ketten verfälscht. Dies äußert sich im Verhältnis der O=C-O- beziehungsweise O=C-N- zum CF-Signal. Im Falle einer vollständigen und homogenen Funktionalisierung sollte dieses nach der in Abbildung 13 gezeigten Struktur 3:5 sein. Tatsächlich wurde in den Messungen ein Verhältnis von ungefähr 6:5 ermittelt, was in einer geringeren Aussagekraft verglichen mit dem F1s-Signal resultiert. Daher wurde auf eine nähere Betrachtung dieses Bindungsenergiebereichs verzichtet.

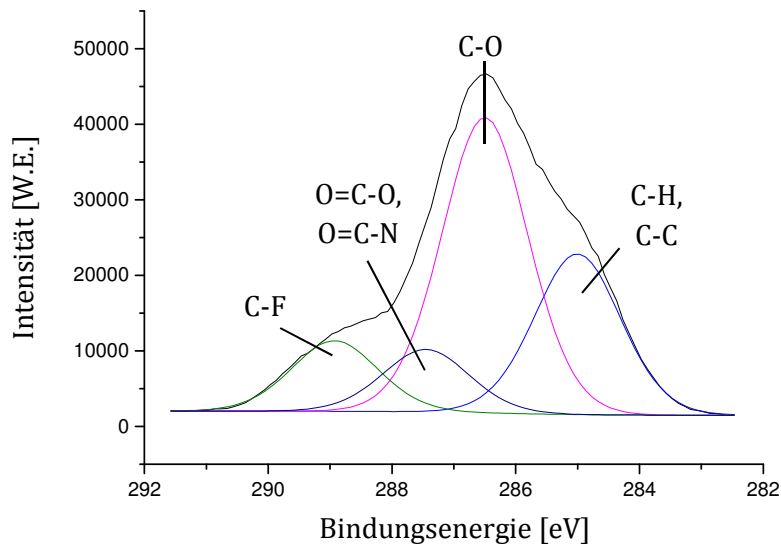


Abbildung 16 C1s Bereich mit verschiedenen Kohlenstoffspezies (anhand der Probe nach 4 d Ammoniakinkubation dargestellt)

Neben der Bestimmung der Abspaltrate bot eine XPS-Messung außerdem die Möglichkeit, die bevorzugte Spaltposition der Aminolyse zu untersuchen. Wie Abbildung 13 zeigt, weist die PEGMA-Syntheseoberfläche zwei Esterbindungen auf, die beide theoretisch spaltbar wären. Eine Bevorzugung der peptidnahen Esterbindung wäre aufgrund der Nähe der Esterbindung am Polymerrückgrat zu einem quartäresn Kohlenstoffatom zu erwarten, da der entsprechende Carbonylkohlenstoffs durch induktive Effekte weniger nucleophil und durch eine höhere sterische Abschirmung schlechter zugänglich ist.

Durch Betrachtung des C-O-korrelierten C1s Signals bei 286,4 eV^[76] über die Inkubationszeit sollte die bevorzugte Spaltposition ermittelt werden. Eine Spaltung am Polymerrückgrat würde eine Reduzierung bewirken, während eine Spaltung am Dipeptid sich in einer leichten Erhöhung äußern sollte, da sich der relative Anteil der entsprechenden Atome erhöht hätte. Die Änderung des CO-korrelierten C1s-Signals ist in Abbildung 17 gezeigt. Erneut wurde zur Veranschaulichung der Messwert der Referenzprobe als 100 % angenommen.

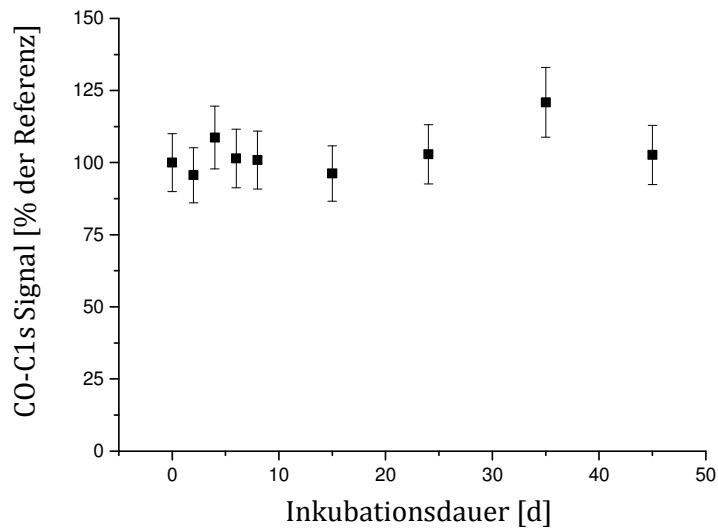


Abbildung 17 Verlauf des CO-korrelierten C1s-Signalintegrals über die Inkubationszeit

Aufgrund der durch F1s-Signalbetrachtung erhaltenen Abspaltrate wäre nach 45 Tagen bei einer Spaltung am Polymerrückgrat ein Abfall des Wertes auf bis zu 10% zu erwarten gewesen. Die scheinbar konstanten Signale suggerieren daher eine bevorzugte Spaltung am Dipeptid.

3.2.3 Bestimmung der Abspaltrate über abnehmende, normierte $C_{19}H_{15}^+$ -Signale im ToF-SIMS

Bei ToF-SIMS wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Flugzeit eines geladenen Teilchens durch ein elektrisches Feld mit definierter Spannung proportional zur Wurzel aus dem Quotienten von Masse und Teilchenladung ist.^[81]

$$t_{oF} \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Gleichung 3 Proportionalität der Flugzeit zu Masse und Ladung

Nach der Ionisierung der Probe durch Primärionen werden die Sekundärionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt und durch die Driftstrecke über ein Reflektren auf den Detektor geleitet. Dieser detektiert das Auftreffen von Ionen zeitaufgelöst, wodurch ein Massenspektrum der untersuchten Probe aufgenommen wird.

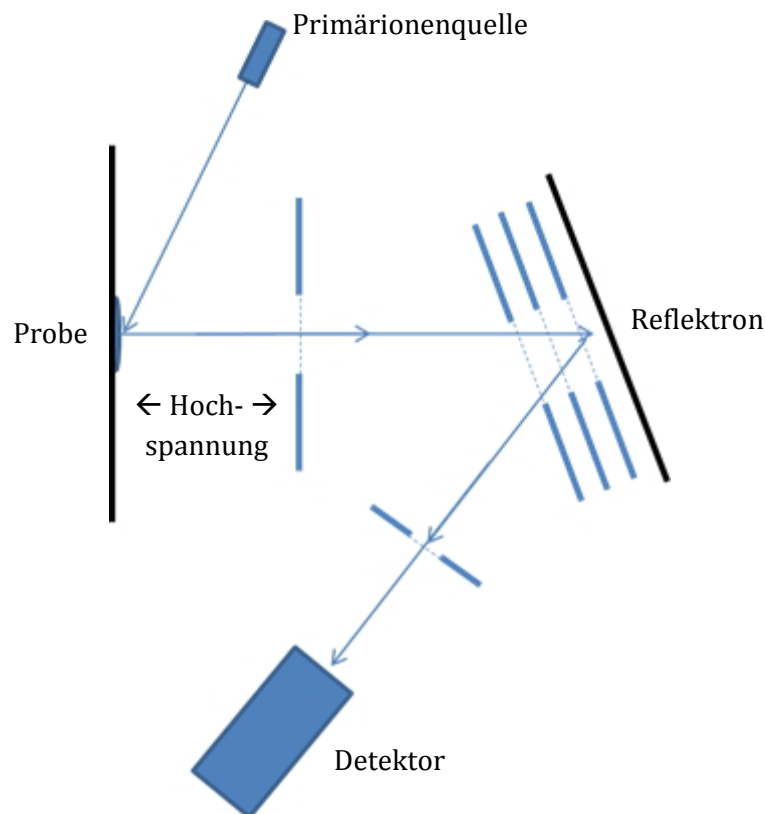


Abbildung 18 Schematischer Aufbau eines Reflektren-ToF-SI-Massenspektrometers

Bei der Messung wird die Probe in der Analysechamber unter Hochvakuum mit Primärionen beschossen. Die Primärionen können dabei monoatomar sein, z.B. Ga, Cs, oder Xe, oder polyatomar, z.B. Bi_n, Au_n oder C₆₀. Die Wahl der Primärionen hängt von der Beschaffenheit der Probe ab. So werden monoatomare Primärionen für hartes Material wie z.B. Legierungen verwendet. Polyatomare Cluster ermöglichen durch die schonendere Ionisation die Detektion größerer Moleküle auf der Oberfläche.^[82-83] Zu beachten ist, dass nicht-leitende Proben z.B. durch Einsatz einer Flood-Gun mit Elektronen entladen werden müssen, um eine Potentialverschiebung zu vermeiden.^[84]

Beim Auftreffen auf die Probe erzeugen die Primärionen eine Kollisionskaskade, die die Emission von Atomclustern und einzelnen Atomen aus der Probe bewirkt. Der Großteil dieser emittierten Atome beziehungsweise Moleküle ist dabei ungeladen. Die negativ oder positiv geladenen Sekundärionen können über ToF analysiert werden. Die genauen Mechanismen der Ionisation sind derzeit Gegenstand aktueller Forschung, diskutiert werden das Desorptions/Ionisations-Modell und das „Nascent Ion Molecule“-Modell.^[83]

Die Vorteile der ToF-SIMS sind zum einen eine hohe Auflösung mit der Strukturen im Bereich von 100 nm darstellbar sind.^[85] Zum anderen besteht die Möglichkeit, Proben quasi zerstörungsfrei statisch zu messen oder Tiefenverteilungen von Elementen und Molekülen in einer Probe zu ermitteln.^[83] Außerdem sind ToF-SIMS-Messungen verglichen mit XPS-Messungen sensitiver.^[86] In massenspektrometrischen Verfahren ist es allerdings oft schwierig, absolute Quantitätsaussagen anhand der Signalintensität zu treffen.

Ein häufiges Problem stellen dabei zu hohe Intensitäten dar die - bedingt durch die Totzeit des Detektors - nicht mehr in einzelne Ionen aufgelöst werden können. Dadurch besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Signalintensität und Quantität des Analyten mehr. Dieses Problem kann im ToF-SIMS durch Betrachtung von Ionen, deren Intensitäten noch im linearen Bereich liegen, umgangen werden. Bis zu einem gewissen Grad kann dieses Problem auch durch eine Poisson-Korrektur behoben werden, die daher auch für die durchgeführten Messungen angewendet wurde.^[87-88]

Die XPS-Messungen deuteten auf keine gravierende Änderung der Matrix durch Abspaltung von PEG-Ketten hin. Daher wurden keine Matrix-Effekte erwartet, die die Messung verfälscht hätten. Kristallisationseffekte oder „sweet spots“,^[89] die in MALDI-ToF-MS Quantifizierung und Reproduzierbarkeit erschweren, sollten aufgrund der Beschaffenheit der Proben ebenfalls keine Rolle spielen.

Ein absoluter quantitativer Vergleich von PEG-Signalen und dem Labelsignal war dennoch nicht sinnvoll, da hierbei Faktoren wie unterschiedliche Ionisierungswahrscheinlichkeiten und Stabilität der erhaltenen Ionen relevant sind.^[83] Allerdings genügte in den durchgeführten Messungen Betrachtung und Vergleich einzelner m/z-Signale untereinander, um die entsprechenden Tendenzen in Bezug auf Abspaltposition und -rate darstellen zu können.

Für die Messungen wurde ein Siliziumwafer - wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben - funktionalisiert, allerdings wurde als Label, Trityl-geschütztes Cystein verwendet. Die Ankupplung erfolgte über den Fmoc-geschützten OPfp-Ester in DMF. Die Fmoc-

Schutzgruppe wurde zur Reaktionskontrolle abgespalten und das PDFA photometrisch vermessen, wobei eine Epitopdichte von etwa 4 nmol pro cm² ermittelt wurde. Die Polymerfilmdicke betrug (117,5 ± 6,2) nm, wobei die Schichtdicke zwischen den Messpunkten deutlich variierte. Der Grund für den Wechsel des Labels war zum einen, dass Fluor aufgrund seiner hohen Ionisierungswahrscheinlichkeit bereits in kleinsten Konzentrationen hohe Signalintensitäten liefert, wodurch die Linearität zwischen Konzentration und Intensität wie oben beschrieben nicht gegeben ist. Zum anderen enthalten viele Hochvakuumumpumpen-Schmiermittel fluorierte Kohlenwasserstoffe, weswegen Verunreinigungen schwer ausgeschlossen werden können. In einem Vorversuch, bei dem ein Array aus Peptiden mit zufälliger Sequenz mit Trifluoressigsäureanhydrid funktionalisiert und eine ToF-SIMS-Messung durchgeführt wurde, war nur ein geringer Kontrast zwischen Peptidspots und Hintergrund zu erkennen. Daher sollte für die quantitative Bestimmung stattdessen Cystein und dessen charakteristische Signale verwendet werden.

Für den Versuch sollte das CHS⁺-Signals, sowie das C₂H₆NS⁺-Signal untersucht werden. In einer Referenzmessung, bei dem ein funktionalisierter Siliziumwafer mit dem Cys-Label mit einem 100 % PEGMA Film ohne Label verglichen wurde, zeigten sich allerdings bei den entsprechenden m/z-Bereichen in der cysteinfreien Probe deutliche Signale (Abbildung 19). Daher wurde stattdessen das Trityl-Kation C₁₉H₁₅⁺ vermessen. Im korrelierten m/z-Bereich zeigte die Referenzmessung keinen relevanten Hintergrund.

Die einzelnen Proben wurden analog der XPS-Versuchsreihe nach der Funktionalisierung in einem Exsikkator mit Ammoniakgas inkubiert und nach definierten Zeitintervallen entnommen. Auch in dieser Versuchsreihe wurde nach jeweils zwei Tagen der Exsikkator evakuiert und neu beschickt, um möglichst gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten.

Es wurden sowohl statische als auch dynamische Messungen durchgeführt. Für eine der XPS-Versuchsreihe ähnliche Quantifizierung würden statische Messungen, die nur die obersten Bereiche der Probe analysieren, ausreichen. Dynamische Messungen sollten helfen sicherzustellen, dass die Abspaltung sowie die Diffusion von Peptiden aus der Polymermatrix tiefenhomogen erfolgt. Als Primärionenquelle diente dafür eine Bismut-Kanone, wobei zur Analyse Bi₃⁺-Cluster verwendet wurden.

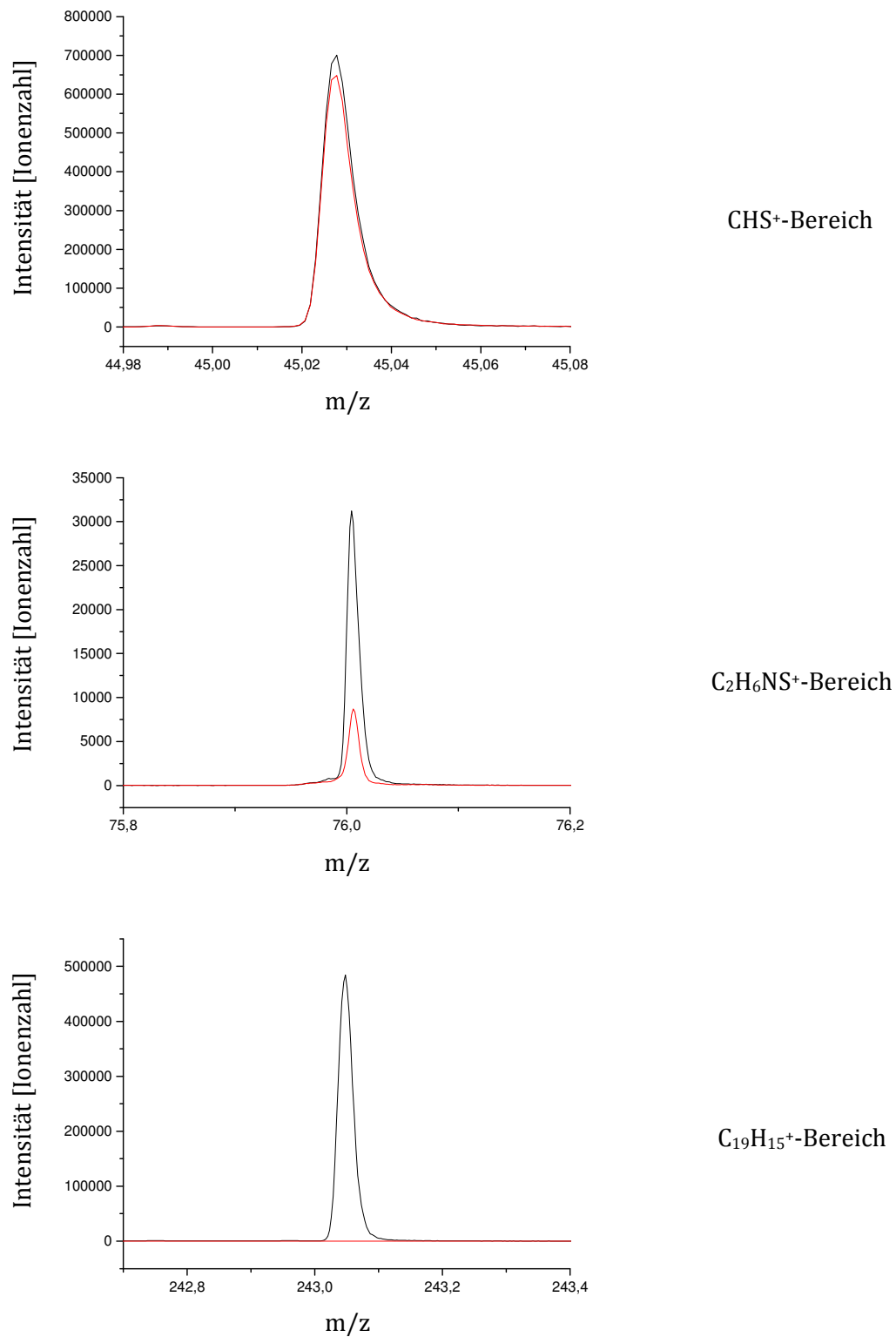


Abbildung 19 Vergleich der m/z-Bereiche der CHS⁺-, C₂H₆NS⁺- und C₁₉H₁₅⁺,-Signale auf einem mit 100% PEGMA funktionalisierten Siliziumwafer vor (rot) und nach der Cysteinkupplung (schwarz)

3.2.3.1 Statische Messung

In den ersten Messungen zeigte sich, dass von Messung zu Messung trotz konstanter Parameter die Gesamtionenzahl stark variierte (Tabelle 3). Gesamtionenausbeuten, die sich um den Faktor 2 unterschieden, wurden häufig beobachtet. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden deshalb nicht die Rohdaten, sondern die auf den Gesamtionenstrom normierten (GIN) Signalintensitäten verglichen.

Um zu testen, ob die Normierung des Ionenstroms des Zielfragments $C_{19}H_{15}^+$ auf den Gesamtionenstroms eine gute Signalstabilität über mehrere Messungen liefert, wurde die Referenzprobe im statischen Modus an zehn Messpunkten vermessen. Die Poisson-korrigierten Werte des Zielfragments wurden durch den Gesamtionenstrom geteilt und Mittelwert sowie Standardabweichung bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3 Messung der Signalstabilität der Referenzprobe bei konstanter Primärionendosis von 10^{11} pro cm^2 ; analysiert wurde jeweils eine Fläche von $500 \times 500 \mu m^2$

Messung	Counts $C_{19}H_{15}^+$ [$\times 10^6$]	Gesamtionenzahl [$\times 10^7$]	Normierter $C_{19}H_{15}^+$ -Wert [$\times 10^{-2}$]
1	2,34	3,25	7,20
2	4,71	7,05	6,68
3	4,72	7,12	6,63
4	4,89	7,45	6,56
5	4,83	7,31	6,62
6	4,92	6,95	7,08
7	4,88	6,92	7,05
8	4,83	6,97	6,93
9	2,55	3,50	7,27
10	2,41	3,28	7,36
Mittelwert			6,94
Standardabweichung			0,20

Die Standardabweichung entspricht demnach einem Messfehler von ungefähr 3%, was deutlich genauer und reproduzierbarer erschien als die Messungen, die bereits mit XPS durchgeführt wurden.

Basierend auf den Ergebnissen der UV/Vis-Bestimmung wurden im Anschluss statische Messungen für Proben nach 2, 4, 6, 8, 13, 15, 17, 24, 35 und 45 Tagen Inkubation mit Ammoniak durchgeführt. Der Verlauf des $C_{19}H_{15}^+$ -Signals gegen die Inkubationsdauer ist in Abbildung 20 gezeigt.

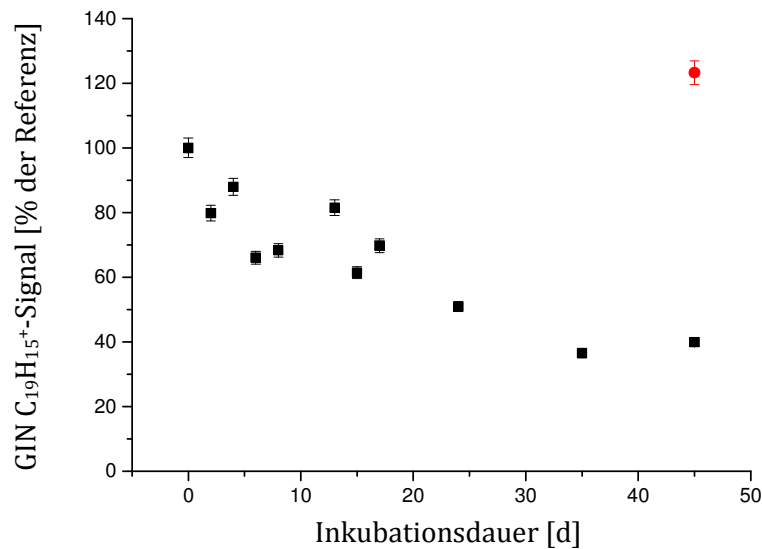


Abbildung 20 Zeitlicher Verlauf des normierten C₁₉H₁₅⁺-Signals über die Inkubationsdauer mit Ammoniak (rot: 45 Tage Inkubation vor Waschschritt)

Der eingezeichnete Fehler entspricht dabei jeweils 3% des Messwertes, da dies als Messwertstabilität in der Referenzmessung gefunden wurde. Um sicherzustellen, dass der Waschschritt abgespaltene Peptide entfernte, und die Inkubation selbst keinen Einfluss auf das Signal hatte, wurde die 45 Tage Probe auch vor dem Waschschritt sowie nach einer erneuten Waschkdauer von 2 h analysiert, wobei ein erneutes Waschen keine weitere Signalreduzierung bewirkte. Es ist ein abnehmender Trend, der in der Größenordnung der UV/Vis- und XPS-Bestimmungen liegt, erkennbar. Allerdings scheinen die Werte eine starke Streuung zu zeigen, die sich zunächst nicht mit der beobachteten Messwertstabilität deckte. Eine Betrachtung der gemessenen Flächen zeigte allerdings Inhomogenitäten und Verunreinigungen der Proben mit Silikonölen und mindestens einer weiteren Substanz, bei der es sich vermutlich um Staub handelte. Abbildung 21 zeigt exemplarisch drei Beispiele für gemessene Flächen und die darauf gefundene C₁₉H₁₅⁺-Intensität.

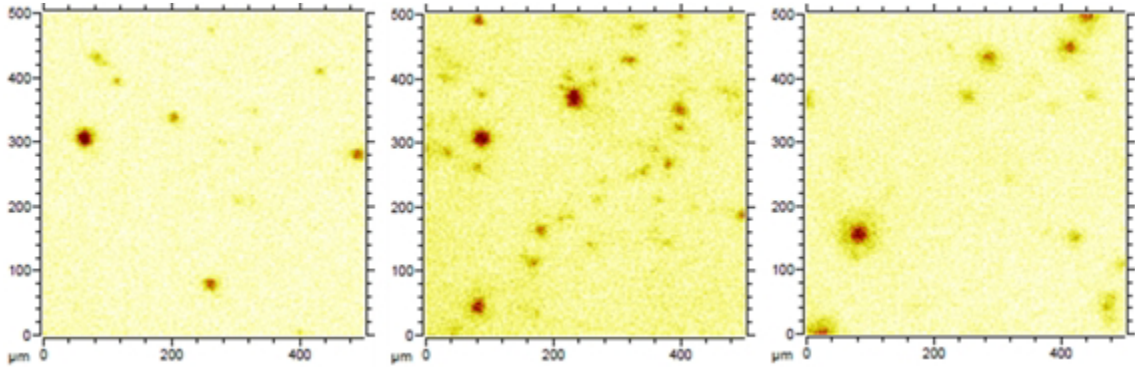


Abbildung 21 Darstellung der Verunreinigungen auf Substraten durch ToF-SIMS-Messung anhand Inhomogenität im $C_{19}H_{15}^+$ -Signal; gezeigt sind $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ Bereiche auf den Proben für 4 (links), 8 (Mitte) und 13 (rechts) Tage Inkubation mit Ammoniak. Helle Bereiche entsprechen einer hohen Anzahl detektierter Ionen, schwarze Bereiche einer geringen Ionenausbeute

Es lassen sich dabei keine deutlichen Tendenzen erkennen: Die Verunreinigung ist weder auf einzelnen Proben homogen, noch nimmt sie im zeitlichen Verlauf des Experiments zu. Die Silikonverunreinigungen kontaminieren die Probe vermutlich, indem Bestandteile des verwendeten Vakuumöls oder des Überdruckventils während der Herstellung aufgebracht werden. Es handelt sich dabei zwar nur um Spuren, jedoch zeigten sie sich deutlich in den Messungen. Eine erneute Funktionalisierung eines Wafers zeigte keine Reduzierung dieser unerwünschten Hintergrundsignale. Es wäre theoretisch denkbar gewesen, Synthese und Analytik unter staubfreien Reinraumbedingungen durchzuführen. Allerdings konnte zum einen nicht ausgeschlossen werden, dass die Funktionalisierung selbst inhomogen erfolgte. Zum anderen sollten die Ergebnisse unter normalen Laborbedingungen reproduzierbar sein. Daher wurde auf eine Wiederholung des Experimentes unter Reinraumbedingungen verzichtet.

Dynamische Scans sollten Hinweise auf die genaue Spaltposition liefern, indem der Verlauf der für PEG-Ketten charakteristischen Signale $C_2H_5O^+$ und $C_2H_5O_2^+$ über die Inkubationszeit betrachtet wurde (Abbildung 22 und Abbildung 23).

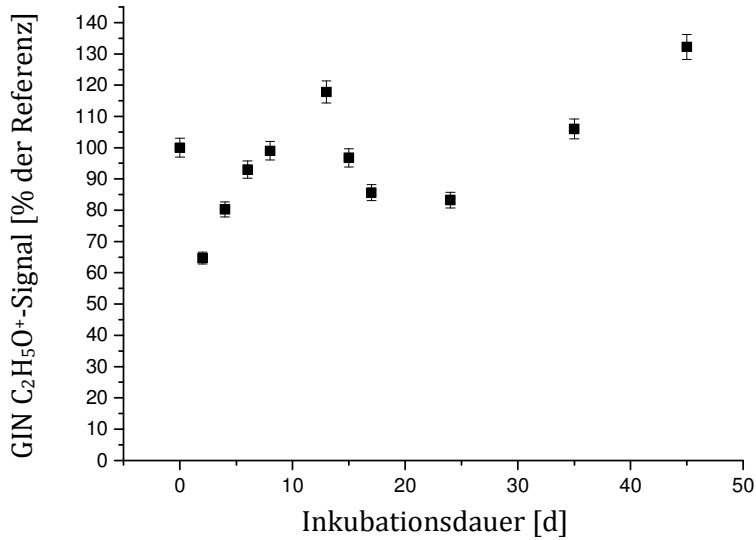


Abbildung 22 Zeitlicher Verlauf des normierten $C_2H_5O^+$ -Signals über die Inkubationsdauer mit Ammoniak

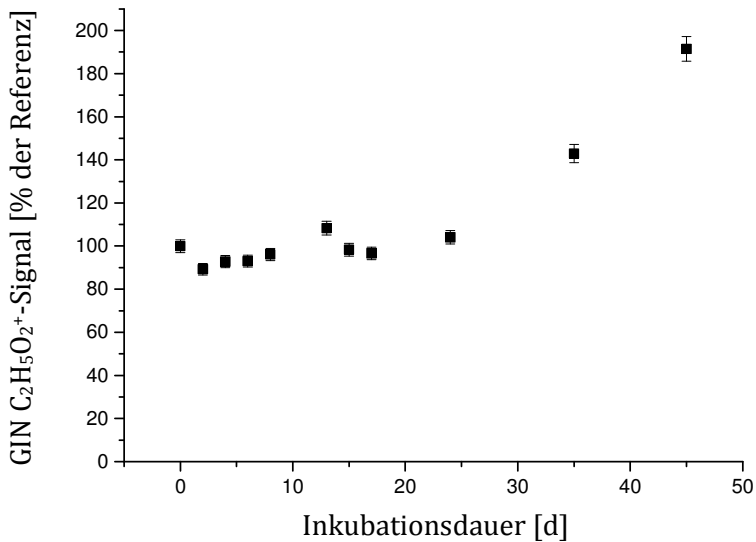


Abbildung 23 Zeitlicher Verlauf des normierten $C_2H_5O_2^+$ -Signals über die Inkubationsdauer mit Ammoniak

Beide Kurvenverläufe zeigen eine aufsteigende Tendenz, insbesondere unter Berücksichtigung der zuvor erwähnten Probeninhomogenität und des Verlaufs der $C_{19}H_{15}^+$ -Intensität in Abbildung 20. Dies deckt sich ebenfalls mit den XPS-Messdaten und deutet darauf hin, dass die Abspaltung nicht am Polymerrückgrat erfolgt und ausschließlich die Säureamide der Peptide durch die Ammoniakinkubation freigesetzt werden.

Im Massenspektrum der Probe nach 45 d Inkubation konnte das Säureamid des Dipeptides mit der Summenformel $C_6H_{13}N_3O_2S$ nachgewiesen werden, wie die Betrachtung des entsprechenden m/z -Bereichs zeigt (Abbildung 24). Es konnte dabei nur im Bereich des $C_6H_{13}N_3O_2S^+$ -Ions ein Signal gefunden werden. Für die m/z -Bereiche der Dipeptide mit angebundenen PEG-Ketten aus 1 bis 5 Ethylenglycoleinheiten konnten keine Signale gefunden werden. Da das entsprechende Fragment möglicherweise nicht stabil gegenüber den Ionisationsbedingungen gewesen wäre war eine Spaltung am Polymerrückgrat dennoch nicht ausgeschlossen. Der Nachweis des Dipeptidamids bestätigt allerdings, dass eine Spaltung am Peptid erfolgt.

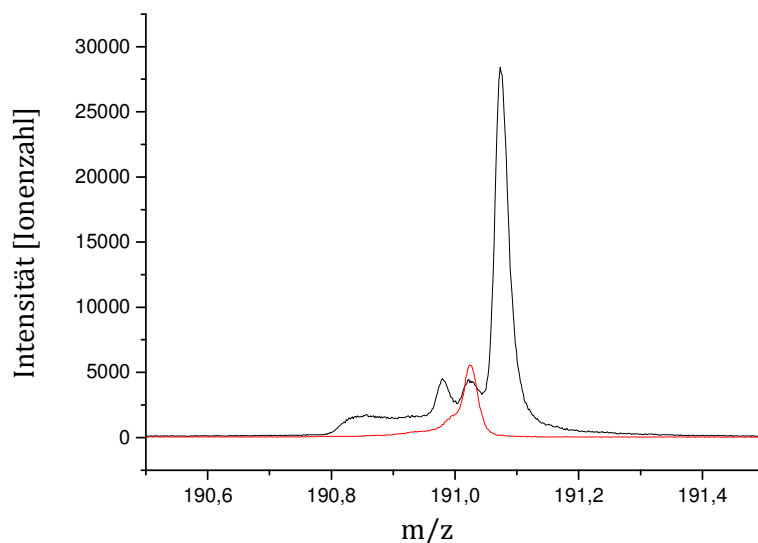


Abbildung 24 Massenbereich des Dipeptidamids; gezeigt sind die Messungen der Probe nach 45 d Inkubationsdauer (schwarz) vor dem Waschschriff und eine nicht funktionalisierte Referenz (rot)

3.2.3.2 Dynamische Messung

Um die Abspaltung der Peptide über die gesamte Tiefe des Films zu betrachten, wurden auch dynamische Messungen durchgeführt. Für den Materialabtrag diente eine C_{60}^+ -Ionenquelle. Wie alle Cluster-Bombardment-Ansätze bietet diese gegenüber Atom-Bombardment den Vorteil eines günstigeren Sputterausbeute-Beschädigungs-Verhältnisses, was in einer besseren Tiefenprofilardarstellung von Molekülen resultiert.^[82]

Des Weiteren wurden Buckminsterfulleren-Cluster bereits erfolgreich zur Tiefendarstellung von kleinen Peptidfragmenten in organischen Polymeren verwendet.^[90] Da die C₆₀-Kanone nur eine geringe laterale Auflösung im Bereich von 50 µm erlaubt, wurde diese allerdings nur für den möglichst schonenden Materialabtrag verwendet. Zunächst wurde ein Tiefenprofil für die Referenz erstellt (Abbildung 25).

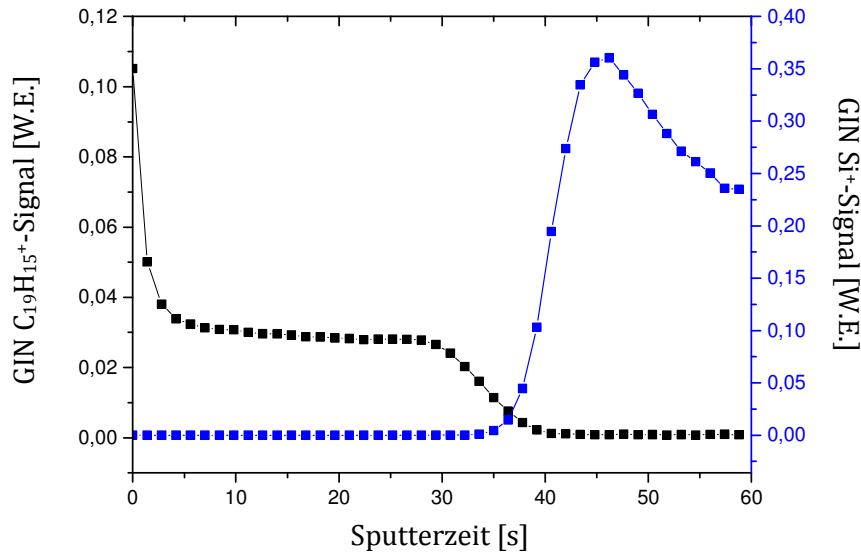


Abbildung 25 Tiefenprofile der Referenzprobe für das GIN C₁₉H₁₅⁺-Signal (schwarz) und das GIN Si⁺-Signal (blau)

Der hohe Anfangswert der Messung ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass vor der ersten Messung kein Sputtern erfolgte. Das Sputtern führte im Verlauf der Messung zu einer Zerstörung von tiefer liegenden Schichten, die der Messfront vorausging. Dadurch wurde nur beschädigtes Material detektiert. Schließlich stellte sich eine Sättigung ein, da alle detektierten Schichten den gleichen Grad an Zerstörung aufwiesen.

Die Intensität des C₁₉H₁₅⁺-Signals nimmt ab, bis der Polymerfilm abgetragen ist. Dies äußert sich in einem Anstieg des Si⁺-Signals in Kombination mit dem Abfall des C₁₉H₁₅⁺-Signals. Die Tatsache, dass die Intensität des Signales nicht abrupt, sondern allmählich abfiel, konnte als Indiz für die Inhomogenität der Proben gedeutet werden. Daher wurde auf eine anschließende Korrelation von Sputterzeit und Kratertiefe verzichtet, da diese nur linear abhängig sind, wenn das abzutragende Material über die gesamte Tiefe eine konstante Zusammensetzung hat. Die Tatsache, dass das C₁₉H₁₅⁺-Signal bereits abfällt bevor das Si⁺-Signal steigt zeigt, dass die Funktionalisierung nicht für den ganzen Film homogen ist. Abbildung 26 zeigt Tiefenprofile für die Proben nach 24, 35 und 45 Tagen Inkubation und Waschen mit DMSO.

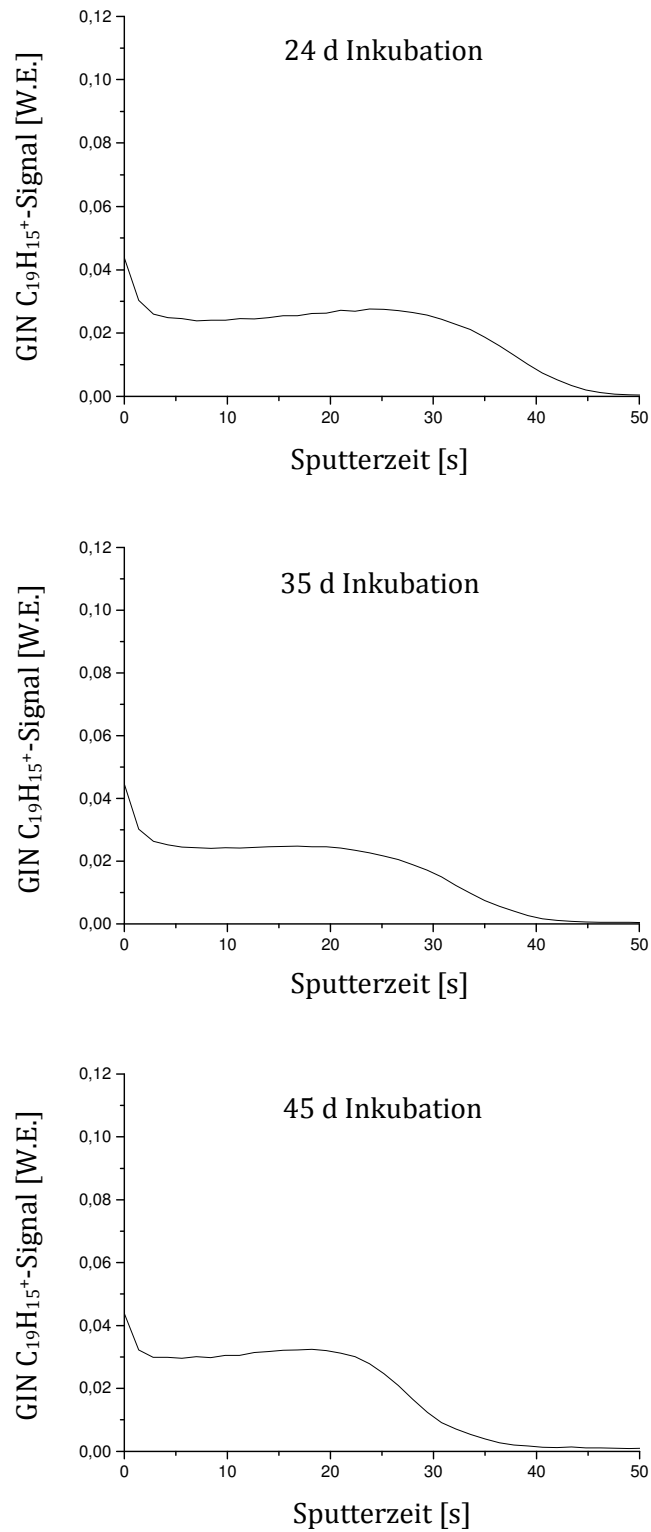


Abbildung 26 Tiefenprofile nach Inkubation mit Ammoniak für das auf den Gesamtionenstrom normierte $C_{19}H_{15}^+$ -Signal

Die Anfangswerte und die Höhe der $C_{19}H_{15}^+$ -Signale liegen deutlich tiefer als in der Referenzmessung, wie es anhand der statisch bestimmten Werte zu erwarten war. Die durch Ellipsometrie bestimmte Schwankung in der Filmdicke erwies sich als kritischer Faktor. Bei einer relativen Schwankung der Schichtdicke im Bereich von 13 % und keiner homogenen Funktionalisierung ist ein Vergleich des $C_{19}H_{15}^+$ -Ionengehalts über die gesamte Tiefe nicht verlässlich. In den erhaltenen Profilen war für zwei Proben eine leichte Steigung zu erkennen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Waschdauer genügte um adsorbierte Peptide auszuwaschen und eine bevorzugte Abspaltung höher liegender Peptide aufgrund der langen Inkubationsdauer fraglich erschien, wurden Vergleichsmessungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Tiefenprofile sicherzustellen. Da sich dabei Schwankungen in Sputterzeit und Kurvenverlauf auf gleichen Proben zeigten, wurde vermutet, dass die Beschädigung der funktionellen Schicht vor der Detektion zu groß ist und zu ungleichmäßig erfolgte, als dass eine eindeutige Aussage über die Tiefenhomogenität der Abspaltung anhand des $C_{19}H_{15}^+$ -Signal hätte getroffen werden können.

3.2.4 MALDI-ToF Messung zur Bestimmung der Spaltposition

Die durch Karas und Hillenkamp entwickelte Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization hat sich seit ihrer Veröffentlichung 1988^[91-92] zu einer der wichtigsten Verfahren zur Analyse von großen Molekülen wie Proteinen oder Peptiden entwickelt. Das Verfahren beruht auf dem Mischen des Analyten mit einem niedermolekularen Feststoff, der Matrix. Als Matrix dient dabei eine organische Säure, wie Bernsteinsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Wird das Präparat mit einem Laserpuls von 1-20 ns bestrahlt, absorbiert die Matrix die Energie und die obersten Schichten aus Matrix und Analyt gehen in die Gasphase über. Verwendet werden hauptsächlich UV- und IR-Laser. Die Ionisierung kann durch verschiedene Prozesse erfolgen, diskutiert werden dabei das Cluster-Modell und das Photoexcitation/Pooling-Modell.^[93-94]

XPS- und ToF-SIMS-Messungen deuteten auf eine bevorzugte Spaltung der peptidnahen Esterbindung hin, das Dipeptidamid konnte nachgewiesen werden. Die mildere Ionisation durch MALDI sollte nun Peptide mit C-terminalen PEG-Ketten detektieren, sofern diese während Abspaltung entstanden waren.

Dafür wurde das Peptid CGSGSGYPYDVPDYA, das HA-Epitop mit einem Rest von Glycinen und Serinen sowie einem N-terminalen Cystein verwendet. Nach einer Funktionalisierung analog den vorherigen Versuchen wurde das Peptid mit der Sandwich-Methode durch Aktivierung mit PyBOP/HOBT/DIPEA in DMF an das terminale β -Alanin angebunden. Eine PDFA-Bestimmung ergab einen DG von jeweils etwa 1 nmol pro cm^2 . Die Polymerfilmdicke betrug $(72 \pm 1,8)$ nm. Insgesamt wurden auf beiden Trägern etwa 40 nmol Peptid angebunden. Um eine ausreichende Menge Peptid abspalten zu können, wurden zwei Glasobjektträger für 25 Tage mit Ammoniakgas inkubiert, was nach den bereits durchgeführten Bestimmungen einer Freisetzung von etwa 20-30 nmol Peptid entsprach. Anschließend wurde das Peptid von der Oberfläche durch wiederholtes Überschichten des Glaträgers mit Dichlormethan (DCM) und absaugen des Überstandes mit einer Eppendorf-Pipette und anschließender Vakuumdestillation des Lösungsmittel isoliert. Im Anschluss wurden die Träger analog mit DMF behandelt für den Fall, dass PEG-Ketten die Löslichkeit des Peptides in DCM beeinträchtigt hätten.

Die mit DCM extrahierte Probe zeigte in der Untersuchung keine Signale. In der mit DMF extrahierten Probe konnten die relevanten Signale $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ und die entsprechenden Analoga mit C-terminalen PEG-Ketten, ebenfalls nicht identifiziert werden. Dies war vermutlich durch Adsorption des Peptids an Oberflächen während der Extraktion bedingt, wodurch trotz der hohen Sensitivität von MALDI-ToF-MS kein Peptid nachweisbar war.

In der DMF extrahierten Probe konnten durch hohe Laserintensität und Schusszahl einige schwache Signale, deren Massenabstand von 44,05 jeweils einer Ethylenglycol-Einheit entsprach, identifiziert werden (Abbildung 27).

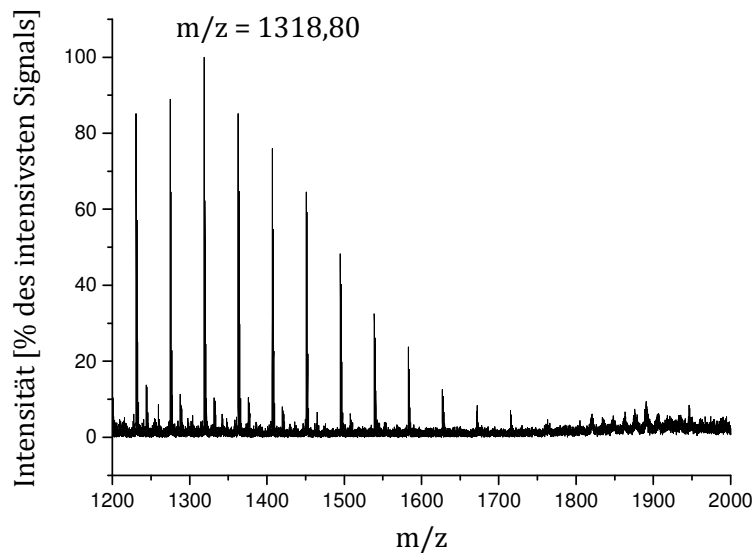


Abbildung 27 MALDI-ToF Signale mit der Massendifferenz einer PEG-Einheit

Eine Zerstörung des Peptides erschien aufgrund des etablierten Einsatzes von Ammoniak zur Abspaltung von Peptiden in der SPPS unwahrscheinlich, insbesondere wegen des Massenunterschiedes der einzelnen Signale. Das Peptid sollte sich zudem in DCM sehr gut lösen lassen. Das Ausbleiben von Signalen nach der DCM Extraktion deutete eher auf ein PEG-Zerfallsprodukt hin. Um eine mechanische Beschädigung während der Extraktion auszuschließen wurde das Experiment mit einem Glasobjektträger mit einer 100 % PEGMA Schicht ohne Peptid wiederholt. Die Signale traten in der Vergleichsmessung nicht auf.

Es ist davon auszugehen, dass der Film zumindest teilweise angegriffen und Spuren von PEG-Abbauprodukten freigesetzt wurden. In einer Anwendung würden allerdings deutlich kürzere Inkubationszeiten verwendet werden. Zudem würde nach jedem Übertrag ein vollständiger Waschschritt mit DMF und MeOH durchgeführt werden. Die geringen Mengen an Zerfallsprodukt sollten demnach geringen Einfluss auf etwaige Überträge haben.

3.2.5 Fazit der Bestimmung der Abspaltrate

Die durch XPS, ToF-SIMS und Photometrie bezüglich der Abspaltrate erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine langsame Abspaltrate hin. Abbildung 28 zeigt die Kombination aller Bestimmungen.

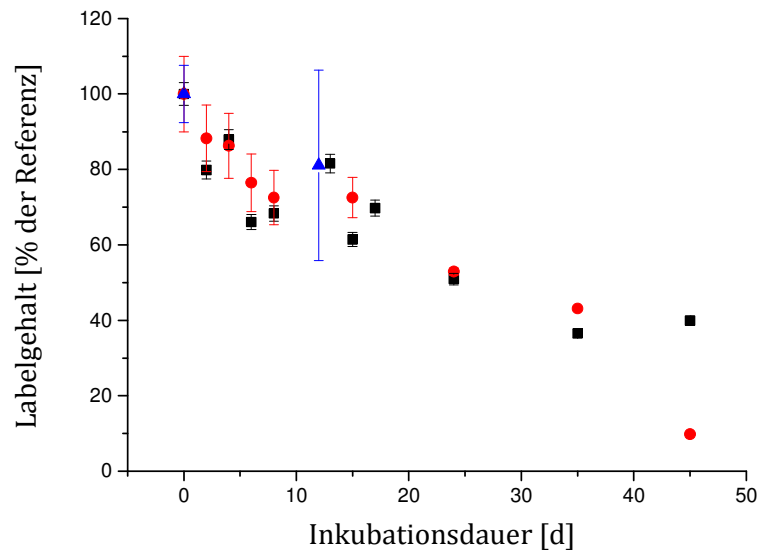


Abbildung 28 Vergleich der ermittelten Abspaltraten durch XPS (F1s Signalintensität, rot), ToF-SIMS (C₁₉H₁₅⁺-Signalintensität, schwarz) und photometrische Mtt-Bestimmung von und nach der Ammoniakinkubation (blau)

Innerhalb der jeweiligen Fehlergrenzen sind die Ergebnisse in gutem Einklang miteinander.

Die bevorzugte Spaltposition wurde durch XPS, ToF-SIMS und MALDI-ToF ermittelt. Werden die C₂H₅O⁺- und C₂H₅O₂⁺-Signale des ToF-SIMS sowie das C-O-korrelierte C1s-Signal der XPS-Messungen kombiniert, ergibt sich ein Verlauf mit leichtem Anstieg über die Inkubationsdauer, der sich vermutlich aus der Erhöhung des relativen Anteils an PEG-Ketten in der Probe ergibt (Abbildung 29).

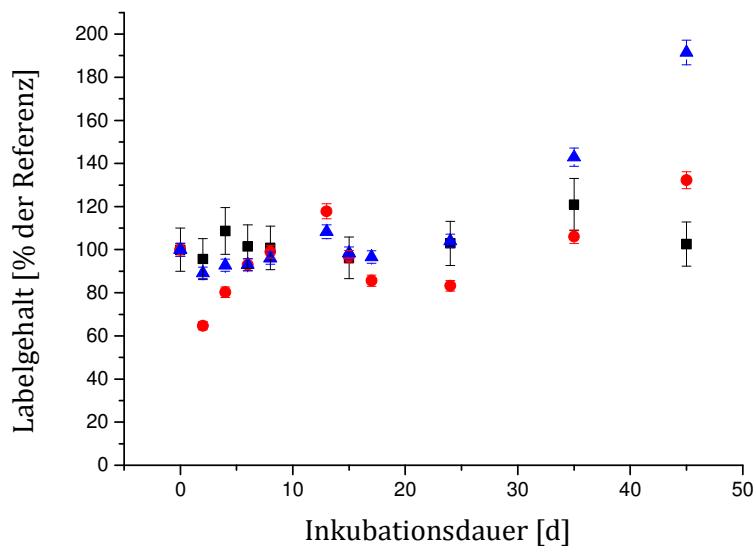


Abbildung 29 Vergleich der PEG-korrelierten Signalverläufe aus ToF-SIMS (C₂H₅O₂⁺-Signal, blau; C₂H₅O⁺-Signal, rot) und XPS (CO-korreliertes C₁s-Signal, schwarz)

Des Weiteren konnte das freigesetzte Dipeptidamid im ToF-SIMS Versuch nachgewiesen werden, wohingegen PEG-konjugierte Dipeptide weder durch MALDI-ToF noch durch ToF-SIMS nachgewiesen werden konnten.

Die Abspaltung von Peptiden mit Ammoniak ist ein langsamer Prozess, der bevorzugt an der Peptid-Esterbindung erfolgt und dadurch hauptsächlich Säureamide ohne C-terminale PEG-Ketten freisetzt. Der Vergleich der einzelnen Methoden zeigte außerdem, dass eine photometrische Bestimmung lediglich zur groben Abschätzung verwendet werden kann. Die Messwertstabilität, die für ToF-SIMS ermittelt werden konnte, sollte in Kombination mit der im Vergleich zu XPS höheren Sensitivität die genaueste Bestimmung ermöglichen, sofern die Probenpräparation unter optimalen Bedingungen erfolgt. Die Messungen zeigten, dass andernfalls schon Staubpartikel oder Spuren von Silikonölen für eine große Streuung sorgen können.

Geht man von einem Übertrag der Peptide auf eine Oberfläche mit einer Bindungsdichte von 0,5 bis 10 pmol und einer Syntheseausbeute von 1-5 nmol pro cm² aus, sollten selbst bei großen Überschüssen und Verlusten während der Überträge 20-30 Kopien eines Arrays möglich sein.

3.3 Immobilisierung von Peptidarrays auf PVDF-adsorbiertem Streptavidin

Nachdem die Größenordnung der Abspaltrate von Peptiden von der 100% PEGMA-Syntheseoberfläche mit Ammoniak ermittelt werden konnte, sollten die gewonnenen Erkenntnisse die Anwendung des Biotin-Streptavidin-Systems zur Immobilisierung von Peptidarrays ermöglichen.

Hydrophobe PVDF Membranen werden aufgrund ihrer Protein-adsorbierenden Eigenschaften unter anderem in Westernblots zur Immobilisierung von Proteinen verwendet. Diese starke Proteinadsorptionsfähigkeit wurde ausgenutzt, um Streptavidin auf den Membranen zu immobilisieren.^[95]

Verwendet wurden Millipore Low Fluorescence PVDF-Membranen des Typs Immobilon-FL. Für die Immobilisierung von Streptavidin wurde ein Membranstück im Objektträgerformat mit MeOH benetzt, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und gewaschen, dann über Nacht mit 1 mL einer 1 mg pro mL Streptavidin Lösung inkubiert. Um eventuelle Multilagen zu entfernen, wurde anschließend mit PBS gewaschen.

Ein Peptidarray des Typs 1 (siehe Abschnitt 3.1) auf einem 10:90-PEGMA-PMMA-Copolymer wurde N-terminal mit Biotin-OPfp durch die Sandwich Methode funktionalisiert. Die Aminosäureseitenketten wurden in diesem Versuch vor dem Übertrag auf die Streptavidin-funktionalisierte Oberfläche entschützt. Dann wurde das Array mit Ammoniak inkubiert, übertragen und auf der mit Streptavidin funktionalisierten Membran immobilisiert. Als Medium diente hierbei anstelle der 50 % (v/v) TFA in Toluol Mischung (PBS). Auf ein Tensid wurde verzichtet, um eine eventuelle Desorption des Streptavidins von der Membran gering zu halten. Die Immunfärbung erfolgte nach dem Standardprotokoll.

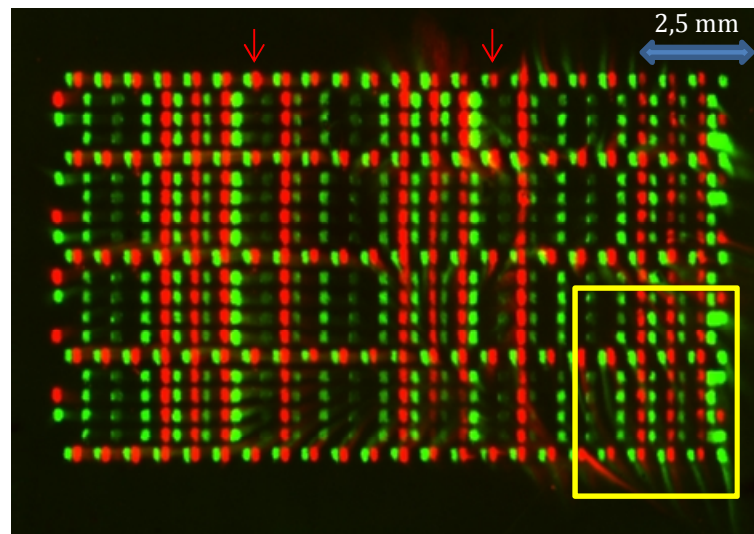


Abbildung 30 Übertrag von Peptiden auf eine mit Streptavidin funktionalisierte Membran und Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün) (Intensität: 3,5)

Das Array konnte erfolgreich immobilisiert und mit Antikörpern angefärbt werden. Die Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen FLAG-Spalten lassen sich durch unterschiedliche Affinitäten des Antikörpers zu den Epitopvarianten erklären.^[96]

Wie bereits bei der Immobilisierung auf Gold konnten die HA-Varianten mit geringer Affinität nicht nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 30). Im rechten unteren Bereich sind deformierte Spots sichtbar (gelber Kasten). Diese wirken, als wäre das zu übertragene Peptid zumindest teilweise verschleppt worden. Als mögliche Ursache dafür kam eine Desorption der Streptavidin-Moleküle während des Trennens von Membran und Syntheseträger nach dem Übertrag in Frage. Außerdem ist zu beachten, dass die zu übertragenden Peptide auf dem Syntheseträger bereits während des Anpressens in abgespaltener Form vorlagen und eine Spaltung nicht erst durch das Übertragsmedium initiiert wurde. Es war daher denkbar, dass Peptide an der Oberfläche des Polymerfilms während des Anpressens durch den entstehenden Flüssigkeitsstrom verschleppt wurden, auch wenn dieses Phänomen auf goldbeschichteten Membranen nicht in dieser Ausprägung beobachtet werden konnte. Über die Spezifität des Übertrages lässt sich in diesem ersten Versuch keine eindeutige Aussage machen. Da das Array geplant wurde, um den Übertrag auf goldbeschichtete Membranen zu testen, war in den Kontrollpeptiden das für die Bindung an Gold notwendige Cystein durch ein Glycin ersetzt. Durch Funktionalisierung mit Biotin-OPfp wurde allerdings Biotin an beide Peptide gleichermaßen gebunden. In Abbildung 30 sind daher die Kontrollreihen, welche in Abbildung 12 nur schwach oder nicht sichtbar sind, deutlich zu erkennen. Das Fehlen der Spots in den zwei vertikalen Kontrollreihen (rote Pfeile) ist auf einen synthesebedingten Sequenzfehler zurückzuführen (siehe 3.1).

Zur Untersuchung der Spezifität war daher ein neues Array erforderlich. Analog zu den vorherigen Arrays wurden auch hier Peptide mit dem FLAG-, HA-, und MYC-Tag verwendet, die ebenfalls mit einer entsprechenden Sequenz aus Glycinen und Serinen auf eine Gesamtlänge von 16 Aminosäuren verlängert wurden. Für die Kontrollpeptide wurde die Synthese bereits nach der 15. Aminosäure abgebrochen. Dadurch waren die Kontrollpeptide am *N*-Terminus acetyliert und dementsprechend nicht mit Biotin-OPfp funktionalisierbar. Die Anordnung der Peptide auf diesem, im Folgenden als Array 2 bezeichneten Layout sind in Abbildung 31 gezeigt.

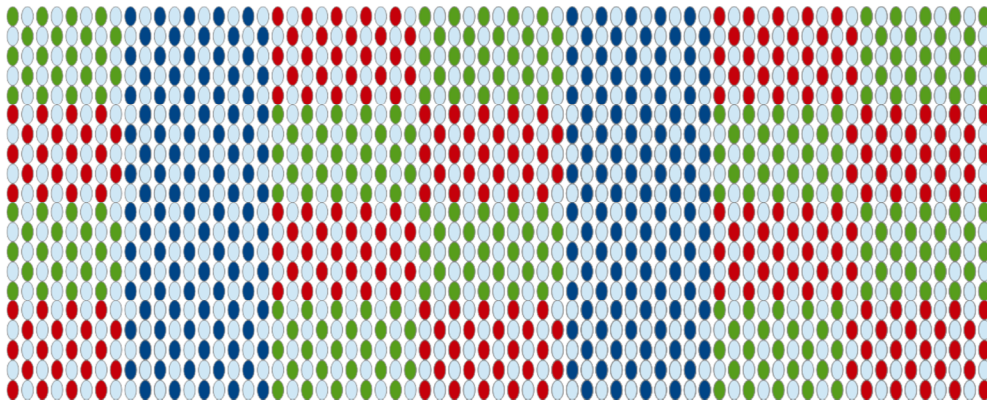


Abbildung 31 Aufbau Array 2; blaue Ellipsen entsprechen dem MYC -Epitop, grüne Ellipsen dem FLAG-Epitop und rote Ellipsen dem HA-Epitop; in den jeweiligen Feldern sind die Kontrollspots (in der Synthese verkürzt und dadurch *N*-terminal acetyliert) ausgegraut

Die neu gestalteten Arrays wurden zunächst mit Biotin funktionalisiert und die Aminosäureseitenketten geschützt. Nach 24 h Inkubation in Ammoniak wurde für 30 min in PBS auf eine mit Streptavidin funktionalisierte Membran übertragen. Abbildung 32 zeigt den Fluoreszenzscan der Immunfärbung mit anti-FLAG- und anti-HA-Antikörpern nach dem Standardprotokoll.

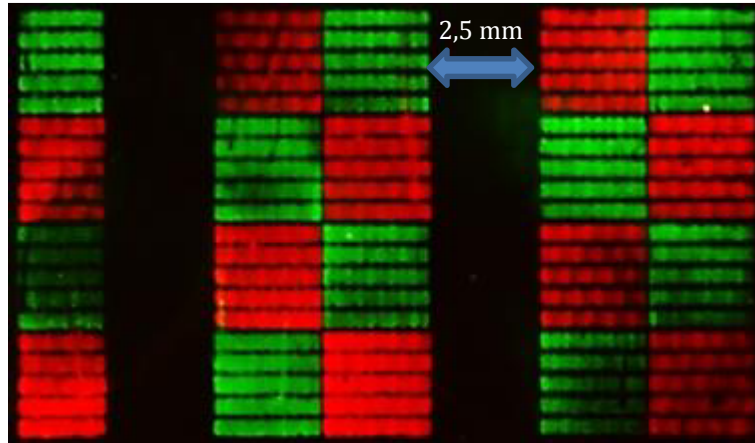


Abbildung 32 Übertrag von Arrays 2 mit Kontrollpeptiden in PBS auf mit Streptavidin funktionalisierte Immobilon-FL-Membran; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün)) (Intensität: 0,5)

Das Array konnte erfolgreich übertragen und angefärbt werden. Eine erhöhte Fluoreszenz der Biotin-funktionalisierten Peptidspots gegenüber den Kontrollpeptiden ist nicht zu erkennen. Laut einer Versuchsreihe der Firma LI-COR besteht für fluoreszenzmarkiertes Protein im Bereich von 0,6 pg bis 5 ng ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Fluoreszenzintensität. Ein großer Konzentrationsbereich sollte demnach darstellbar sein.^[97] Die Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration ist allerdings abhängig von dem verwendeten Fluorophor, so konnte für den Farbstoff Cy5 lediglich eine Linearität über einen 20fachen Konzentrationsbereich gefunden werden.^[98] Es war denkbar, dass geringe Mengen Kontrollpeptid biotinyliert wurden und so ebenfalls nachweisbar waren. Auch war die Fluoreszenzintensität nicht für alle Arrays des gleichen Epitops über die detektierte Fläche stabil. Eine mögliche Ursache dafür war, dass die Übertragungsdauer nicht ausreichend lang war und noch keine Absättigung der Biotin-Bindungsstellen auf der gesamten Membran vorlag. Daher wurde zunächst der Übertrag mit verschiedenen Übertragszeiten wiederholt. Abbildung 33 zeigt aus Übersichtsgründen jeweils eine Zeile der entsprechenden Transferzeit.

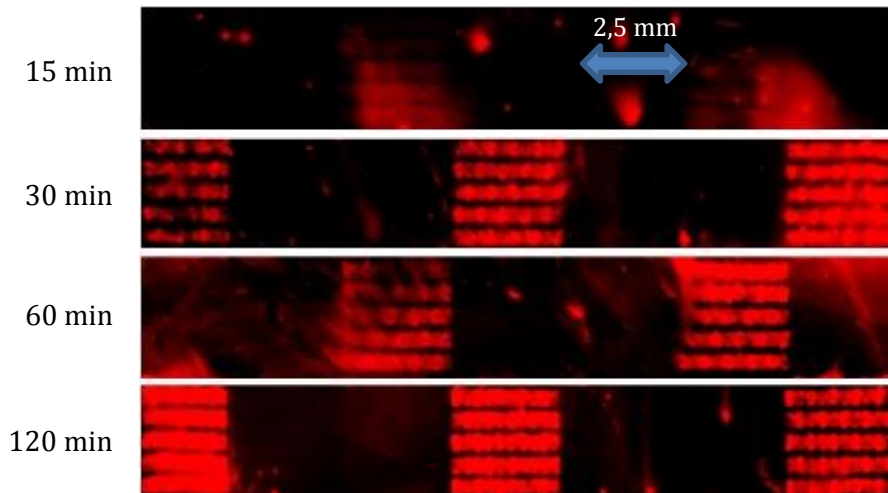


Abbildung 33 Immunfärbung der HA-Epitope mit anti-HA-DyLight 680 auf mit Streptavidin funktionalisierten Membranen nach verschiedenen Transferzeiten (Intensität: 0,5)

Im Rahmen der bereits beobachteten Intensitätsschwankungen ist lediglich ein Unterschied zwischen 15 und 30 min Transferdauer zu beobachten. Somit konnte die Transferdauer als Ursache von Inhomogenitäten ausgeschlossen werden, da eine Transferdauer von 30 min für eine Absättigung ausreichend erschienen.

Im Anschluss wurde eines der biotinylierten Arrays des Typs 2 auf der Syntheseoberfläche mit einem Streptavidin-DyLight 680-Konjugat angefärbt, um zu überprüfen, ob die Kontrollpeptidsynthese bzw. die Acetylierung eine selektive Funktionalisierung mit Biotin und damit einen spezifischen Übertrag ermöglichen konnte (Abbildung 34).

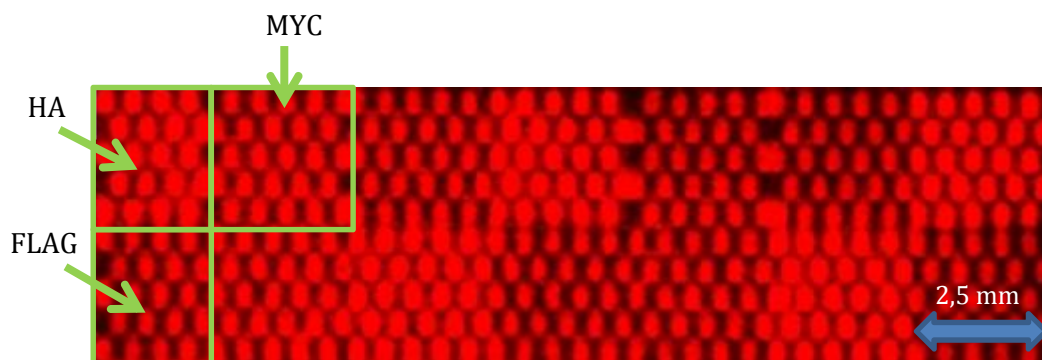


Abbildung 34 Färbung des angehenden Biotins mit Streptavidin-DyLight 680 Konjugat auf der Syntheseoberfläche; Die grünen Kästen zeigen exemplarisch Epitopfelder; zur besseren Vergleichbarkeit mit übertragenen Arrays ist der Scan gespiegelt dargestellt. (Intensität: 3)

Das in Abbildung 31 vorgestellte Array 2 ist zwar erkennbar, allerdings zeigen auch die Kontrollspots Fluoreszenz, obwohl kein Biotin hätte angebunden werden sollen. Dies war

vermutlich auf die Herstellung der Peptidarrays zurückzuführen. Während der Ablagerung der Aminosäuretonerpartikel kann es zu geringen Kontaminationen durch Tonerpartikel in benachbarten Spots kommen.^[99] Zudem werden freie Aminogruppen zwischen den Syntheseschritten automatisierten Synthese nur relativ kurz acetyliert. Es ist daher möglich, dass die Kontrollspots bis zu 10 % biotinylierte Peptide enthalten. Für die Kontrollspots ist daher ein DG von 0,1 bis 1 nmol pro cm² realistisch. Werden davon 2 % durch Ammoniak abgespalten und auf eine Oberfläche mit 0,1-5 pmol pro cm² Bindungsstellen übertragen, kann auch in den Kontrollspots ein Überschuss an Peptiden im Verhältnis zu freien Bindungsstellen vorliegen. Dies kann die geringen Fluoreszenzunterschiede zwischen Zielpeptiden und Kontrollspots erklären und als Hinweis auf eine Normalisierung der Konzentrationen durch den Übertrag gewertet werden.

Der Aufbau der Arrays bedingte, dass die Epitopkonzentration in allen Spots des Arrays vergleichbar sein sollte, da diese bis zum Abbruch der Synthese in den Kontrollspots parallel synthetisiert wurden. Daher kamen zusätzlich unspezifische Wechselwirkungen als Ursache der scheinbar geringen Spezifität in Frage. Im Folgenden wurde daher getestet, inwiefern sich diese für das Streptavidin-Biotin-System reduzieren ließen. Dies ist insbesondere wichtig, da für Färbungen mit Seren oftmals drastische Blockierungsbedingungen angewendet werden müssen, um unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden.^[100] Diese treten zwischen Proteinen und Oberflächen in biologischen Assays häufig auf. In Western Blots oder Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) werden die Oberflächen daher vor dem eigentlichen Nachweis mit Proteinlösungen blockiert, die zum Beispiel bovines Serumalbumin (BSA) oder Milchpulver enthalten. In den ersten ELISA Versuchen wurde Tween20, ein Tensid, zur Blockierung verwendet.^[101] Bei der Immunfärbung von Peptidarrays wird es in Waschpuffern verwendet, um nach einer Immunfärbung unspezifische Proteinadsorbate zu entfernen beziehungsweise deren Ausbildung zu verhindern, sowie eine vollständige Benetzung der Oberflächen zu gewährleisten.^[51]

Der Einfluss von Tween20 und BSA auf die Qualität der Immunfärbung von transferierten Arrays wurde daher untersucht. Im ersten Versuch wurde die Membran in einer 1 %igen BSA Lösung für 30 min inkubiert und ein Peptidarray darauf übertragen. Die Immunfärbung des übertragenen Arrays nach Standardprotokoll ist in Abbildung 35 gezeigt.

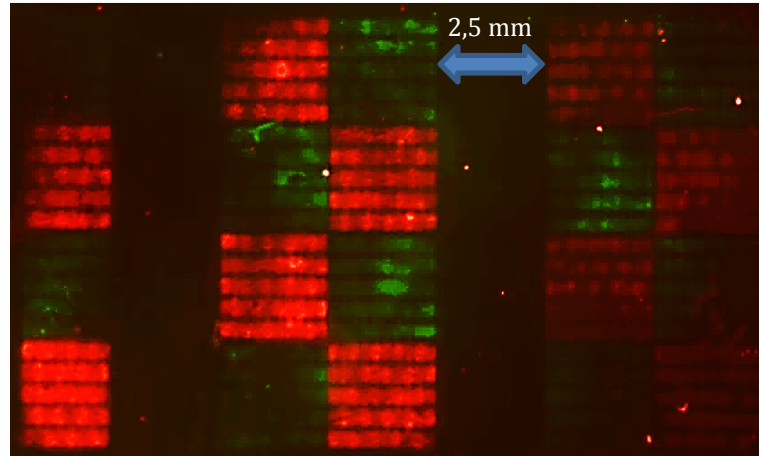


Abbildung 35 Übertrag des Peptidarrays 2 mit Kontrollpeptiden in PBS auf mit Streptavidin funktionalisierte Immobilon-FL-Membran; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün) (Intensität: 0,5)

Es sind deutliche Schwankungen der Signalintensität über die Fläche des Arrays zu sehen, insbesondere für das FLAG-Epitop. Da das HA-Peptid deutlich hydrophober als das FLAG-Epitop ist, wurden hydrophobe Wechselwirkungen mit der PVDF-Membran als Ursache für die Fluoreszenz vermutet, die spezifische Anbindung war demnach verringert. Dies wurde als Verdrängung von Streptavidin durch BSA interpretiert.

Die Immunfärbung des gleichen Übertrags ohne BSA-Behandlung in PBS mit 0,05 % Tween20 (PBS-T) zeigt erneut eine deutlich verschlechterte Nachweisbarkeit des FLAG-Epitops (Abbildung 36) und keine erhöhte Selektivität.

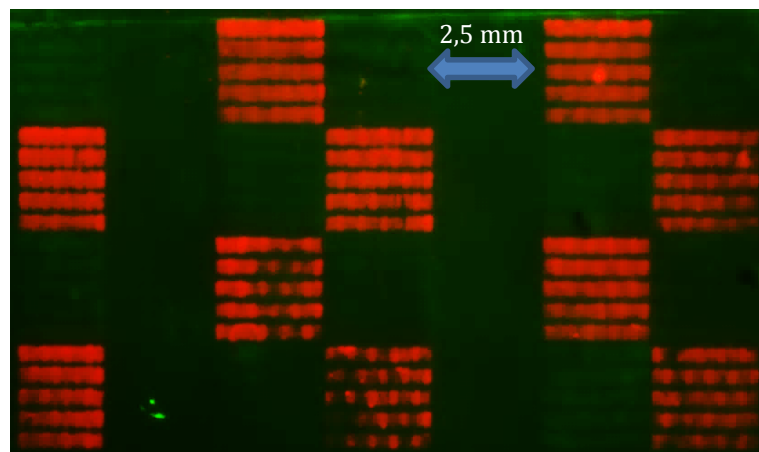


Abbildung 36 Übertrag des Peptidarrays 2 mit Kontrollpeptiden in PBS-T auf mit Streptavidin funktionalisierte Immobilon-FL-Membran; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün) (Intensität: 0,5)

Auch hier war eine Anfärbung des HA-Epitops möglich. Die für das FLAG-Epitop erhaltene Intensität war am Rande der Nachweisgrenze, die Arrays waren nur noch teilweise sichtbar. Die erneute Verschlechterung der Nachweisbarkeit des FLAG-Epitops könnte dabei durch die Ausbildung einer Monolage von Tween20, die die Adsorption von FLAG-Peptide behindert oder verlangsamt, erklärt werden.^[102] Auch wurde eine Desorption des Streptavidins von der PVDF-Membran durch das Tensid in Betracht gezogen, wodurch möglicherweise lediglich unspezifisch auf der Membran adsorbierte Peptide nachgewiesen werden konnten.

Um zu überprüfen, inwiefern HA-Peptide durch unspezifische Wechselwirkungen auf PVDF-Membranen immobilisiert werden können, wurde ein Übertrag eines biotinylierten Peptidarrays auf eine Membran ohne Streptavidin in PBS durchgeführt und nach dem Standardprotokoll angefärbt. Abbildung 37 zeigt den erhaltenen Fluoreszenzscan sowie eine Einzelbetrachtung der für den Scan verwendeten Detektionskanäle. Auf eine Behandlung mit BSA oder Tween20 vor dem Übertrag wurde in diesem Experiment verzichtet, um unspezifische Wechselwirkungen nicht zu beeinträchtigen.

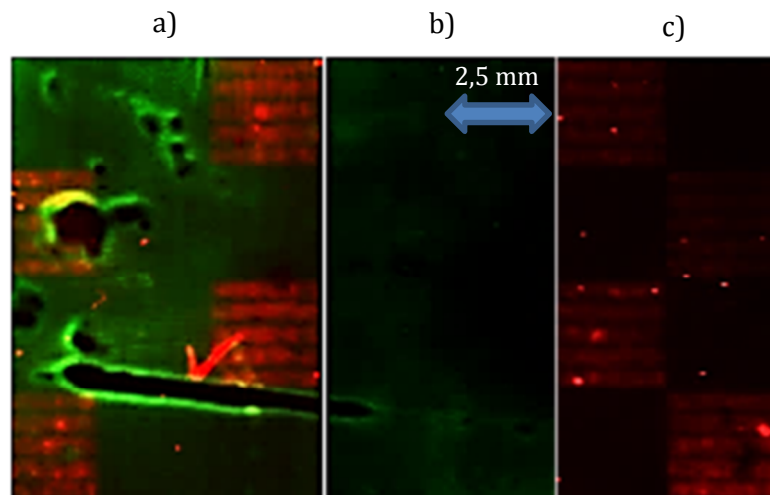


Abbildung 37 Übertrag des Kontrollpeptidarrays 2 auf nicht funktionalisierte PVDF Membran und Einzelbetrachtung der jeweiligen Kanäle nach Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün); Gezeigt sind: a) Gesamtscan; b) 800 nm Kanal; c) 700 nm Kanal (Intensität: 0,5)

Die Einzelbetrachtung zeigt, dass das HA-Epitop übertragen und angefärbt werden konnte, auch wenn die Intensität vergleichsweise schwach ist. Die schwarzen Bereiche waren nur im Fluoreszenzbild sichtbar, möglicherweise handelt es sich dabei um eine Beschädigung der Proteinschicht während des Waschprozesses. Das hydrophilere FLAG-Epitop hingegen konnte auf der Oberfläche nicht nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Immobilisierung in den vorherigen Versuchen, in denen ein ortsaufgelöster Nachweis des FLAG-Epitops möglich war, spezifisch über Biotin auf Streptavidin erfolgte, da die Nachweisbarkeit des FLAG-Epitops mit Antikörpern abhängig vom Abstand des Epitops zur Oberfläche ist.^[77] Deshalb kann allerdings auch eine

unspezifische FLAG-Adsorption nicht ausgeschlossen werden, da das Epitop in diesem Fall einen für den Nachweis zu geringen Abstand zur Oberfläche hätte.

Eine weitere Versuchsreihe sollte die Stabilität der adsorbierten Komplexe gegenüber Blockierungsmedien nach beendetem Übertrag aufklären. Drei Arrays wurden nach in PBS auf Membranen mit immobilisiertem Streptavidin übertragen. Das Kontrollarray wurde im Anschluss nach dem Standardverfahren blockiert und angefärbt. Das zweite Array wurde nach dem Übertrag 16 h in PBS-T geschüttelt und nach dem Standardprotokoll blockiert und gefärbt. Das letzte Array wurde direkt nach dem Übertrag blockiert und für 16 h mit der Antikörperlösung inkubiert. Dann wurden alle drei Arrays parallel gescannt (Abbildung 38).

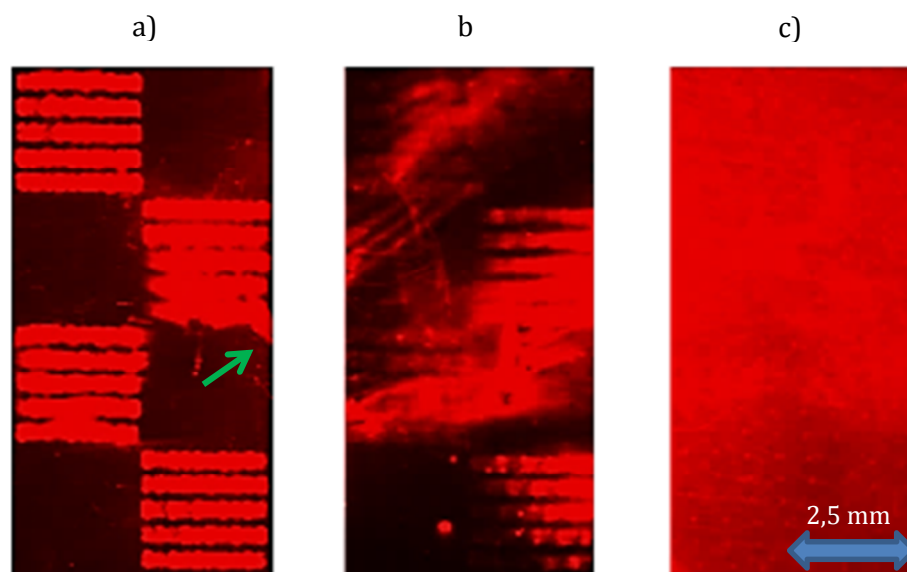


Abbildung 38 Test verschiedener Färbebedingungen übertragener Arrays auf mit Streptavidin funktionalisierter Immobilon-FL-Membran; Vergleich der Immunfärbung der HA-Epitope mit anti-HA-DyLight 680 nach Standardprotokoll (a), der Färbung nach 16 h PBS-T Inkubation (b) und der 16 stündigen Inkubation mit der Antikörperlösung (c) (Intensität: 3)

Das Experiment konnte die bisherigen Ergebnisse und Annahmen untermauern. Das nach dem Standardprotokoll übertragene und angefärbte Array a) zeigt eine gute Auflösung, auch wenn wie bereits beobachtet einzelne Spots leicht verschwommen erscheinen (grüner Pfeil). Nach dem Schütteln in PBS-T, gezeigt in b), waren die HA-Arrays stark verschwommen. Dies schließt eine Entfernung unspezifischer Peptidadsorbate durch längeres Schütteln in PBS-T nach dem Übertrag aus, da offensichtlich die Auflösung mit zunehmender Inkubationszeit verloren ging. Ob dabei unspezifisch adsorbierte Peptide in Lösung gehen oder ganze Streptavidin-Biotin-Peptid-Komplexe desorbieren und an anderer Stelle adsorbieren konnte dabei nicht eindeutig geklärt werden. In c) ist kein Array mehr erkennbar, die Membran ist über die gesamte Fläche beinahe homogen gefärbt. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich innerhalb der Inkubationszeit ein

Gleichgewicht zwischen in Lösung befindlichen und an der Membran adsorbierten Proteinen, Streptavidin-Biotin-Peptidkomplexe, Inertprotein und Antikörper, einstellt. Auch ist eine analoge, durch Desorption und Resorption entstandene Verteilung unspezifisch adsorbierter Peptide auf der Oberfläche möglich.

Im Anschluss sollte untersucht werden, wie es zu den durch den grünen Pfeil markierten Artefakten kam, welche sporadisch immer wieder auftraten. Als Ursache kamen dafür zum einen Strömungen entlang der Oberflächen während des Anpressens, zum anderen eine Beschädigung der Streptavidinschicht während des Trennprozesses in Frage. Daher wurden die eingesetzten Flüssigkeitsmengen während zwei Überträgen variiert. So sollten während des Trennprozesses verschieden starke Kräfte entlang der Oberflächen wirken. Daher wurden anstelle von 1 mL wie in den anderen Versuchen 2 und 0,5 mL auf die Filterscheibe, welche für die Überträge als Flüssigkeitsreservoir diente, gegeben. Nach dem Übertrag für 30 min ließen sich Membran und Syntheseträger für den Versuch mit 0,5 mL deutlich schwerer als für den Versuch mit 2 mL Puffervolumen trennen. Zur Vergleichbarkeit wurden beide Überträge mit demselben Synthesearray nach jeweils 24 h Ammoniakinkubation durchgeführt. Die Fluoreszenzbilder der Immunfärbung nach Standardprotokoll sind in Abbildung 39 gezeigt. Die Scans wurden nacheinander ausgeführt.

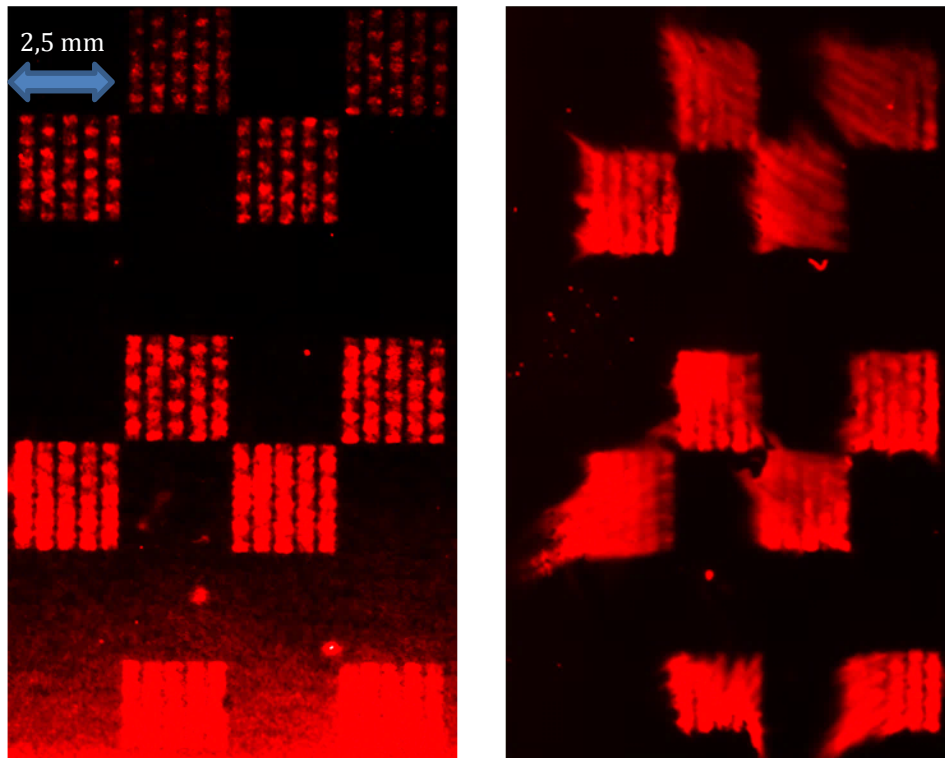


Abbildung 39 Immunfärbung der HA-Epitope mit anti-HA-DyLight 680 zur Veranschaulichung der Auswirkung des PBS-Volumens im auf der Filterscheibe; links: 2 mL Puffer auf Flüssigkeitsreservoir, rechts: 0,5 mL im Flüssigkeitsreservoir (Intensität: 5)

Tatsächlich scheinen die Kräfte, die bei der Trennung von Membran und Synthesearray auftreten, in der Lage zu sein, Bereiche des Arrays mitzureißen, wie der Übertrag mit wenig Puffervolumen auf der rechten Seite zeigt. Die Spots des Arrays sind in keinem Bereich lateral aufgelöst und der bereits beobachtete Effekt des Mitreißens von Peptiden während der Trennung konnte gezielt herbeigeführt werden. Der Übertrag in großem Puffervolumen zeigt hingegen eine gute Auflösung ohne zerstöre Arrays. Der ersichtliche Intensitätsgradient ist dabei vermutlich durch Kontamination des verwendeten PBS mit Bakterien zu erklären.^[103]

Zusammenfassend zeigten die Versuche, dass sich biotinylierte Peptidarrays gut auf PVDF-Membranen mit immobilisiertem Streptavidin übertragen lassen. Die Immunfärbungen ließen dabei sogar Rückschlüsse auf Affinitäten von Antikörpern zu verschiedenen Epitopen zu. Allerdings muss die Trennung der Membranen von der Syntheseoberfläche vorsichtig und mit ausreichendem Lösungsmittelvolumen erfolgen, da es sonst zu Beschädigungen der Streptavidinschicht kommen kann.

Die Versuche mit verschiedenen Blockmedien ergaben zum einen, dass eine Vorbehandlung mit BSA oder Tween20 die Qualität deutlich verschlechtert, zum anderen dass intensive Nachbehandlungen der Membran nach dem Übertrag zu Desorptionen der Komplexe führen können. Für Anwendungen wie Immunfärbungen mit Seren ist es daher wichtig, Blockierung, Inkubationsdauer und Waschprozess perfekt einzustellen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass Streptavidin teilweise desorbiert werden konnte wurde im Folgenden versucht, Glasoberflächen mit kovalent immobilisiertem Streptavidin als Zieloberfläche zu verwenden.

3.4 Transfer auf Glassubstrate mit immobilisiertem Streptavidin

Die mikropartikelbasierte Peptidsynthese durch das Laserdruckverfahren wird bereits auf funktionalisierten Glassubstraten ausgeführt. Diese bieten neben der glatten Oberfläche und der geringen Autofluoreszenz den Vorteil, dass sie unkomplizierter in der Handhabung sind als Membranen. Die kovalente Anbindung von Streptavidin bietet den weiteren Vorteil, dass Blockierungsreagenzien zur Minimierung von unspezifischer Adsorption, sowohl während des Übertrages als auch während einer Anfärbung, eingesetzt werden können, ohne dabei eine Desorption von Streptavidin-Biotin-Peptid-Komplexen zu begünstigen.

Ein denkbarer Ansatz für den Übertrag auf Glasoberflächen war die Verwendung einer porösen Membran zwischen Synthese- und Zielträger, die die Positionierung erleichtern und einen ausreichenden Anpressdruck ermöglichen sollte. Die Membran sollte dabei möglichst dünn sein, da die laterale Diffusionslänge sich - unter der Annahme einer schnellen Adsorption und Immobilisierung - im Bereich der Weglänge von Synthese- zu Zieloberfläche bewegen sollte. Auch sollte sie möglichst eine geringe Adsorptionstendenz gegenüber Peptiden aufweisen, um einen geringen Materialverlust während des Übertrages zu gewährleisten. Diese Anforderungen wurden von Filtern des Typs Durapore der Firma Merck Millipore erfüllt und diese daher verwendet.

Als Zieloberfläche dienten Objektträger der Firma PolyAn, auf welche Streptavidin über Epoxidgruppen auf einer „Anti-fouling-Matrix“, laut Herstellerangaben ein PEG-basiertes Polymer, kovalent gebunden war.

Für eine erste Erprobung wurde das bereits vorgestellte Array 1 (siehe Abschnitt 3.1), welches für erste Immobilisierungsversuche auf Membranen verwendet wurde, erneut eingesetzt. Das mit Biotin funktionalisierte Array ohne Seitenkettenschutzgruppen wurde für 24 h mit Ammoniak inkubiert. Übertragen wurde 30 min in PBS. Abbildung 40 zeigt die Immungfärbung des übertragenen Arrays nach dem Standardprotokoll.

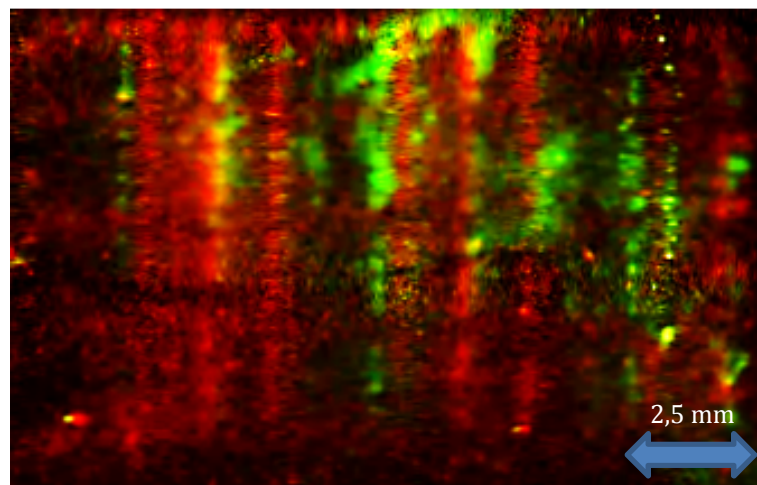


Abbildung 40 Übertragenes Peptidarray auf Streptavidin-funktionalisiertes Glas; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün)) (Intensität: 6)

Sowohl das FLAG-als auch das HA-Epitop konnten nicht orts aufgelöst nachgewiesen werden. Die entsprechenden Spots zeigen eine breite Diffusion, die weit über den erwarteten 30 μm lag. Eine Anpassung der Parameter in Bezug auf Anpressgewicht oder Übertragungsdauer erzielte keine Verbesserung der Auflösung des übertragenen Arrays. Der Ansatz einer Diffusionsmembran zur homogenen Kontaktvermittlung zwischen beiden Oberflächen wurde daher verworfen.

Wie in früheren Arbeiten bereits beobachtet wurde, ist ein direktes Positionieren von Synthese- auf Zieloberfläche schwierig, da die Oberflächen auf dem Feuchtigkeitfilm leicht verrutschen und Peptidarrays so nicht darstellbar sind.^[51] Bei präziser Positionierung und entsprechendem Anpressdruck bewegt sich die Dicke des Flüssigkeitsfilms zwischen Synthese- und Zielträger allerdings im Bereich von weniger als 1 μm . Sind außerdem Synthese- und Zielträger mit einem quellfähigen Polymer funktionalisiert, sollte ein guter Kontakt zwischen beiden Oberflächen gewährleistet sein. Daher wäre im Vergleich zur Diffusion durch eine Membran eine wesentlich geringere laterale Diffusion zu erwarten. Außerdem sollte ohne eine Membran zur Kontaktvermittlung kein Verlust von Peptiden durch Adsorption in der Membran auftreten.

Es wurde daher eine Transfermaschine entwickelt, welche die Möglichkeit zur genauen Positionierung bietet und über ein pneumatisches System definierte Drücke für bessere Reproduzierbarkeit ermöglicht. Die Entwicklung der Maschine ist an anderer Stelle beschrieben beschrieben.^[104] Der Aufbau der Maschine ist in Kapitel 5 gezeigt.

Erste Versuche mit der Transfermaschine zeigten ein diffuses Spotmuster. Abbildung 41 zeigt eine typische Immunfärbung nach einem Übertrag am Beispiel eines Ausschnittes aus Array 2.

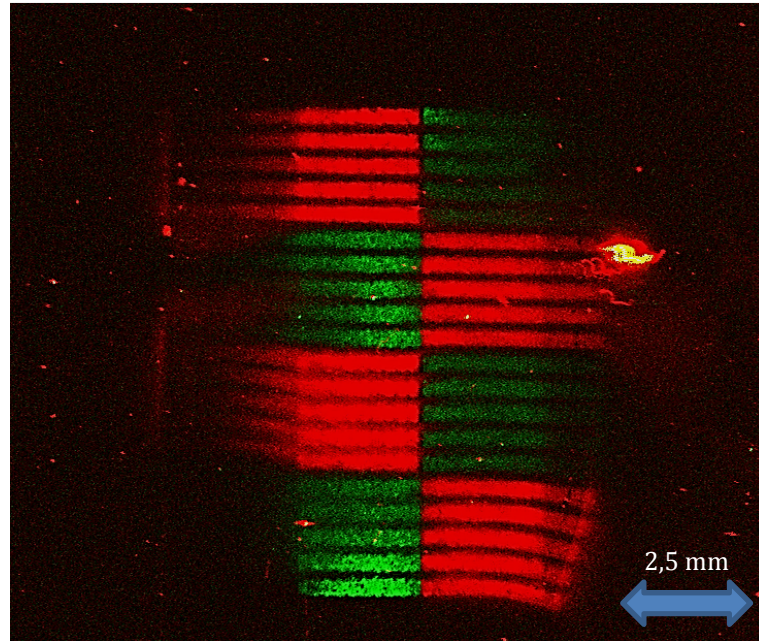


Abbildung 41 Ausschnitt eines Arrays 2-Ausschnittes zur Demonstration des charakteristischen Verwischens von Spots bei direktem Glas zu Glas Transfer; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (rot) und anti-FLAG-DyLight 800 (grün)) (Intensität: 3,5)

Die angefärbten HA- und FLAG-Peptide sind verwischt, die einzelnen Spots nicht mehr aufgelöst. Eine wie in Kapitel 3.3 beschriebene Ablösung von Streptavidin-Adsorbaten für dieses System ist aufgrund der kovalenten Anbindung des Streptavidins nicht wahrscheinlich. Es schien sich bei dem beobachteten Verwischen um Peptide zu handeln, die während der Annäherung vom Syntheseträger desorbieren, durch Strömungen entlang der Oberflächen lateral bewegt werden und in Bereichen, welche weiter von dem Synthesepot entfernt liegen, gebunden werden. Da bereits beobachtet wurde, dass der Übertrag bis zur vollständigen Absättigung von Streptavidin mehrere Minuten beansprucht (siehe Abbildung 33) erschien es möglich, diese oberflächennahen Peptide durch einen kurzen Waschschrift zu entfernen, um diese Artefakte zu vermeiden.

Zwei biotinylierte Arrays des Typs 2 wurden daher für 24 h in Ammoniak inkubiert. Vor dem Übertrag wurde eines 5 min in DMF gewaschen, mit MeOH abgespült und im Luftstrom getrocknet. Das zweite Array wurde 5 min in PBS-T gewaschen, mit Wasser abgespült und dann ebenfalls getrocknet. In beiden Fällen wurde dabei versucht eine möglichst abrupte Trocknung zu erzielen, um zu vermeiden, dass Peptide aus dem Film an anderer Stelle erneut adsorbieren. Beide Arrays wurden im Anschluss übertragen und nach dem Standardprotokoll angefärbt. Abbildung 42 zeigt die erhaltenen Fluoreszenzscans.

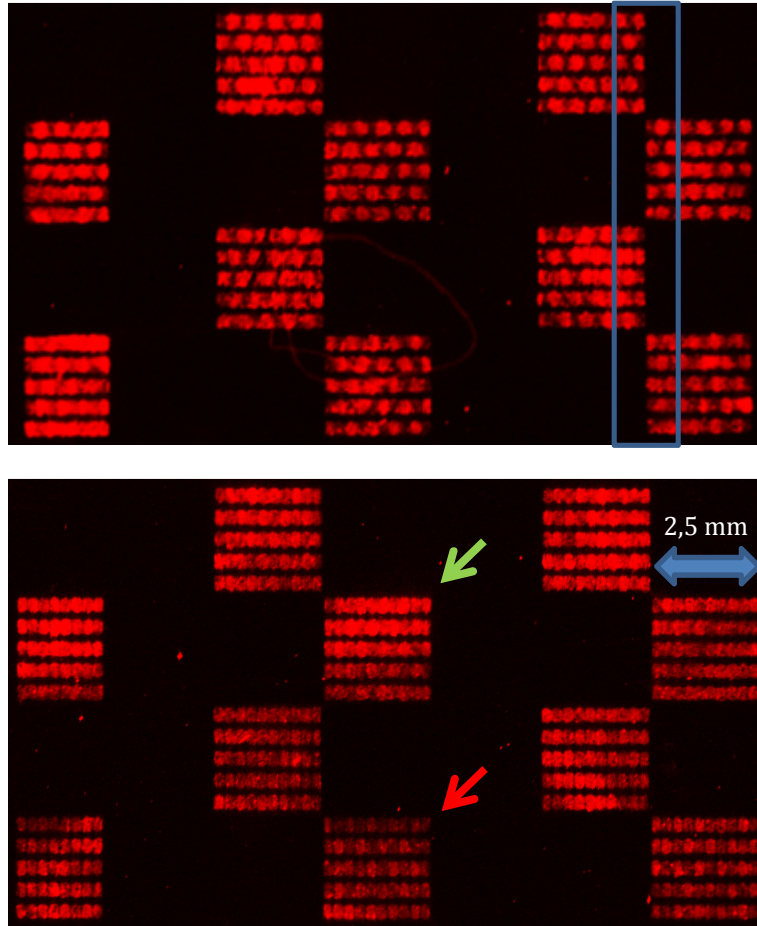


Abbildung 42 Übertrag von biotinylierten Arrays nach Waschen des Syntheseträgers mit DMF(oben) und PBS-T(unten) auf mit Streptavidin funktionalisierte Träger; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680. Grüner Pfeil: Bereich hoher Intensität; Roter Pfeil: Bereich geringer Intensität (Intensität: 3,5)

Das zuvor beobachtete Verwischen von Peptidspots ist nicht mehr sichtbar. Die unterschiedliche Spotbreite ist synthesebedingt und nicht auf Strömungen während des Übertrages zurückzuführen. Wird eine Hilfslinie eingefügt, so ist erkennbar, dass die Spots entlang dieser Linie keine Überlappung zeigen.

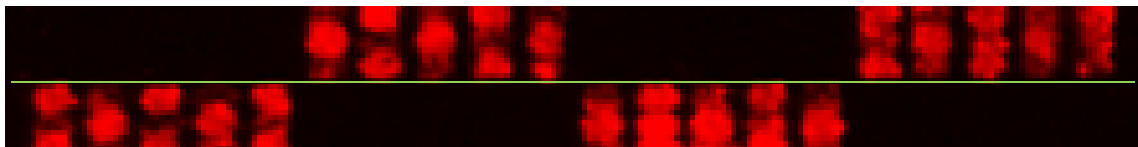


Abbildung 43 Vergrößerung des blau markierten Bereichs der Immunfärbung der übertragenen HA-Arrays (Abbildung 42 oben) mit Hilfslinie an der Kante der Peptidfelder

Innerhalb der Scangenaugigkeit kann demnach keine Spotverbreiterung beobachtet werden. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass eine Immunfärbung der

übertragenen Arrays auch nach 15 min Waschen in DMF noch möglich war. Um den gewünschten Effekt zu erzielen genügte bereits 1 min, weswegen vor den folgenden Überträgen für 1 min mit DMF gewaschen wurden.

In Abbildung 42 sind außerdem Inhomogenitäten in der Fluoreszenzintensität erkennbar. Um auszuschließen, dass diese Inhomogenitäten durch Beschädigung der Zieloberfläche während des Anpressens entstanden, wurde ein Glasstück mit einer Fläche von $4,83 \text{ cm}^2$ ohne Funktionalisierung auf die Zieloberflächen mit verschiedener Kraft für 30 min angepresst. Anschließend wurden die Oberflächen mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid Biotin-SGSGSGYPDVPDYAK(DyLight 680) in PBS-T angefärbt. Dieses ist analog den in vorangegangenen Versuchen übertragenen Peptiden aufgebaut, wobei das Fluorophor an der Seitenkette des C-terminalen Lysins angebunden ist.

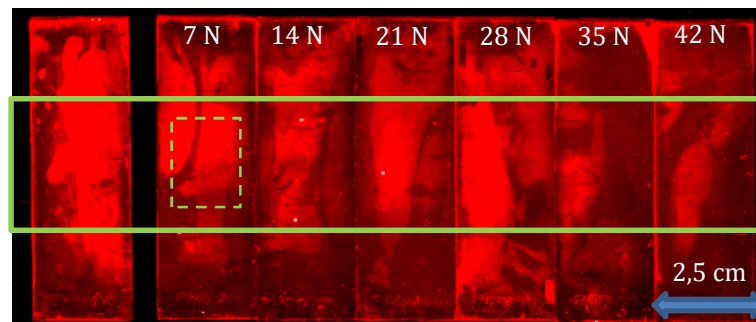


Abbildung 44 Test von verschiedenen Anpressdrücken zur Identifizierung von Oberflächenbeschädigung durch den Übertrag (Anfärbung mit biotinyliertem DyLight 680 Farbstoff); links: Referenz ohne angepresstes Glas; die Kraft wurde von links nach rechts graduell erhöht. (Intensität: 3,5)

Abbildung 44 zeigt keine sichtbare Beschädigung im Bereich des Anpressens (grüner Rahmen; der kleine, gestrichelte Kasten soll die Größe des angepressten Glasstücks illustrieren). Zur erwarten wäre idealerweise eine homogene Färbung über die gesamte Fläche aller Objektträger gewesen, die nicht ausgemacht werden konnte. Die in Abbildung 44 beobachteten Fluoreszenzunterschiede wurden daher hauptsächlich auf eine inhomogene Oberflächenfunktionalisierung zurückgeführt. Die Immobilisierungen auf diesen Oberflächen sind daher stets unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis zu betrachten.

Laut Herstellerangabe werden die mit Streptavidin funktionalisierten Träger hergestellt, indem die Polymermatrix zunächst mit Epoxidgruppen funktionalisiert und anschließend auf dem Substrat immobilisiert wird. Um eine unspezifische Wechselwirkung mit dieser Matrix, die auf PEG basiert, auszuschließen wurde ein Träger mit der Matrix und Epoxidgruppen für 2 h in einer 20 % (v/v) Propylamin in DMF-Lösung zur Desaktivierung der Epoxide geschüttelt und in DMF und MeOH gewaschen. Anschließend wurde ein für 24 h in Ammoniak inkubiertes, N-terminal biotinyliertes Peptidarray auf die Oberfläche

übertragen. Der nach Immunfärbung erhaltene Fluoreszenzscan ist in Abbildung 45 dargestellt.

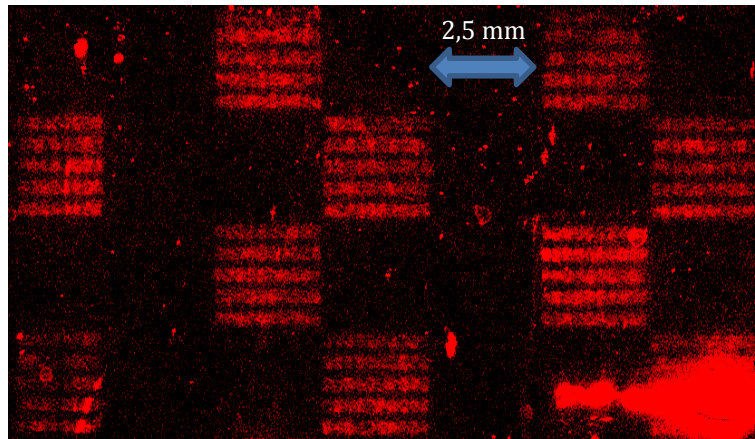


Abbildung 45 Fluoreszenzscan eines Peptidarrays auf desaktivierter Polymermatrix; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (Intensität: 5)

Die biotinylierten HA-Peptide wurden demnach übertragen und konnten mit Antikörpern markiert werden. Die scheinbare, unspezifische Adsorption erschien nahezu irreversibel, auch mehrtägiges Schütteln in PBS-T brachte keine Signalreduzierung. Eine hydrophobe Wechselwirkung war mit dem hydrophilen PEG-Polymer unwahrscheinlich. Da die Signale gering waren, war eine Anbindung an Epoxidgruppen denkbar. Diese sollten nur noch in sehr geringer Konzentration vorgelegen haben, weswegen ein Konzentrationsausgleich wie er zuvor beschrieben wurde die nicht vorhandenen Intensitätsunterschiede erklären kann. Der Einfluss von eventuell auf der Oberfläche vorhandenen Epoxidgruppen auf Immunfärbungen sollte daher gering sein, insbesondere da nicht geklärt werden konnte, inwiefern diese auf den mit Streptavidin funktionalisierten Oberflächen noch reaktiv und zugänglich waren.

Nachdem ein Verfahren für den Transfer von Peptidarrays auf Glasoberflächen entwickelt worden war, sollte die Normalisierung der Peptidkonzentration innerhalb der Spots weiter untersucht werden. Da basierend auf den in Abbildung 45 vorgestellten Ergebnissen anzunehmen ist, dass ein besserer Konzentrationsausgleich für geringe Konzentrationen an Bindungsstellen erzielt werden kann, sollten Oberflächen mit einer geringeren Epitopdichte untersucht werden. Dafür wurden Oberflächen eingesetzt, auf denen Streptavidin beziehungsweise Neutravidin statt in einem dreidimensionalen Netzwerk auf einer Monolage von Epoxiden immobilisiert war. Bei Neutravidin handelt es sich um deglycosyliertes Avidin. Dieses hat eine höhere Affinität zu Biotin als Streptavidin und Avidin.^[105] Die Deglycosylierung verringert zudem unspezifische Adsorptionen verglichen mit Avidin. Die Oberflächen besitzen weniger als 0,5 pmol pro cm² Biotinbindungsstellen, wodurch eine eventuelle Normalisierung noch stärker ausfallen sollte. Die Immunfärbungen dieser Überträge nach Standardprotokoll sind in Abbildung 46 gezeigt.

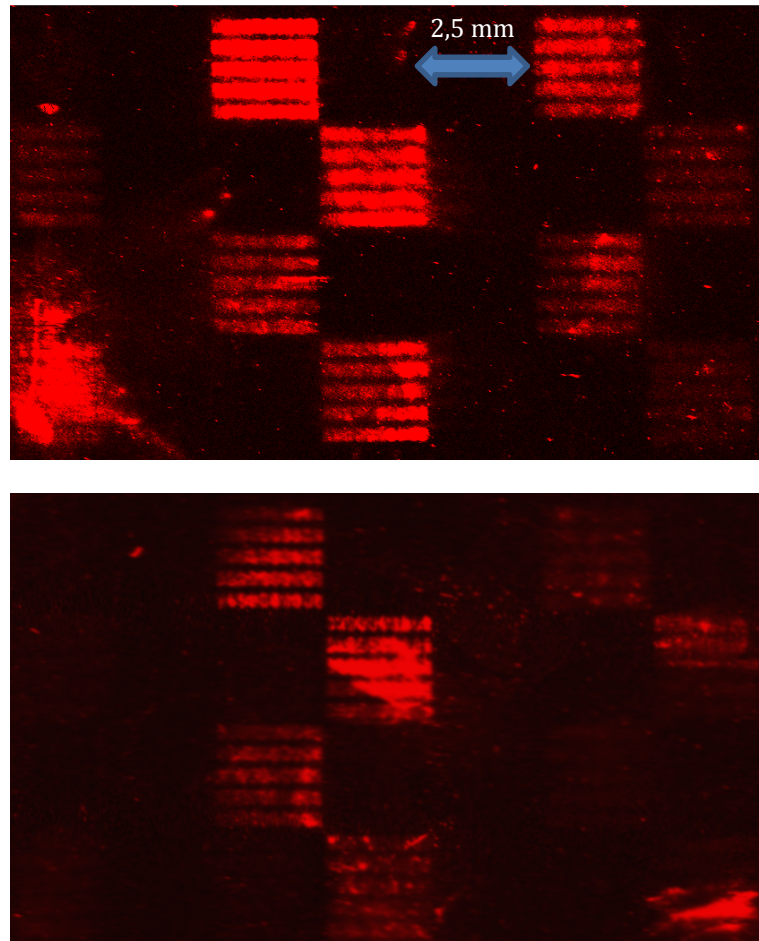


Abbildung 46 Auf 2d-Streptavidin (oben) und 2d-Neutravidin (unten) immobilisiertes HA-Array ; Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (Intensität: 3,5)

Erkennbar ist, dass die Zieloberflächen ebenfalls inhomogen funktionalisiert waren, was sich in der verschiedenen starken Intensität einzelner Bereiche äußerte. Hierbei könnte auch, bedingt durch das Fehlen einer quellfähigen Polymerschicht auf dem Zielträger, ein schlechterer Kontakt zwischen Synthese- und Zielträger die Inhomogenitäten verstärkt haben. Zwischen Zielpeptiden und Kontrollspots sind erneut keine eindeutigen Intensitätsunterschiede erkennbar, was ein weiteres Indiz für eine Normalisierung der Peptidkonzentration während des Übertrages ist.

Schließlich sollte die Tatsache genutzt werden, dass Streptavidin kovalent auf Glassubstraten gebunden war, um die spezifische Anbindung von Peptiden im Vergleich zu unspezifischer Adsorption zu begünstigen.

Dafür wurde zunächst versucht, die spezifische Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung auszuschließen, indem drei Träger in einer gesättigten Biotinlösung je eine Stunde inkubiert wurden, was aufgrund der hohen Affinität zu einer Absättigung des

Streptavidins mit Biotin führen sollte. Vor dem Übertrag wurden die Träger mit 1 % BSA in oder den kommerziell erhältlichen Blockpuffern RB und Smartblock (SB) gegenüber unspezifischer Anbindung blockiert. Während der RB dabei auf Proteinen basiert, enthält der SB-Puffer Peptide, was ihn für eine Passivierung gegenüber Peptidadsorption eventuell besser geeignet macht. Ausschnitte der jeweiligen Immunfärbungen nach Standardprotokoll sind in Abbildung 47 gezeigt.

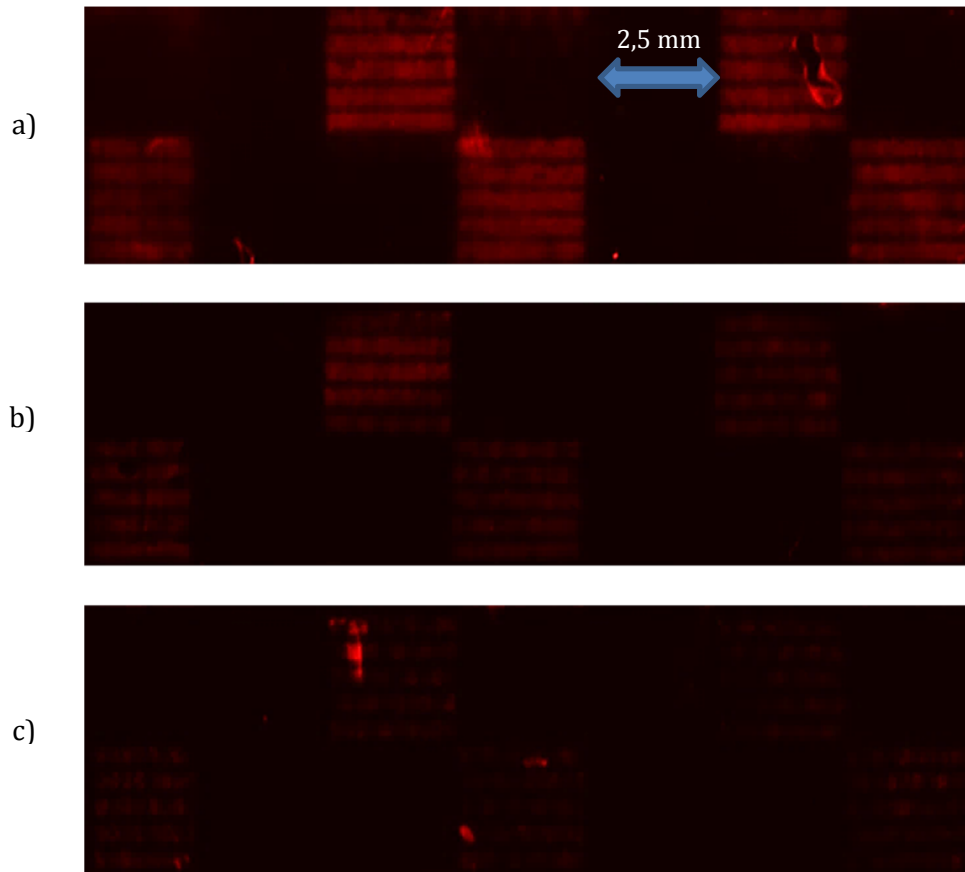


Abbildung 47 Vergleich der Effektivität verschiedener Blockmedien bei der Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680; a) RB; b) 1 % BSA in PBS; c) SB (Intensität: 5)

Die Intensitäten sind dabei gering, wobei die SB Blockierung den stärksten Effekt hat. Dennoch ist die Intensität höher als erwartet. Der Austausch von an Streptavidin gebundenem Biotin erfolgt in der Regel nur sehr langsam, konnte aber aufgrund der Sensitivität des Nachweises nicht ausgeschlossen werden.^[106] Daher wurde untersucht, ob es während des Übertrages zu einem Austausch von Biotin mit biotinyliertem Peptid kam. Zwei Streptavidinträger wurden dafür mit Biotinlösung analog dem vorherigen Experiment inkubiert und mit SB geblockt. Dann wurden erneut Peptidarrays darauf übertragen, wobei ein Übertrag in biotinhaltigem Puffer durchgeführt wurde. Während beim Übertrag ohne freies Biotin nur ein Austausch zwischen an Streptavidin gebundenem Biotin und biotinylierten Peptiden stattfinden konnte, war in Gegenwart von freiem Biotin auch ein Austausch mit diesem möglich. Das Ergebnis wäre eine geringere Menge an immobilisiertem Peptid auf dem Zielträger und damit ein geringeres Fluoreszenzsignal. Ausschnitte des simultanen Scans beider Arrays sind in Abbildung 48 gezeigt.

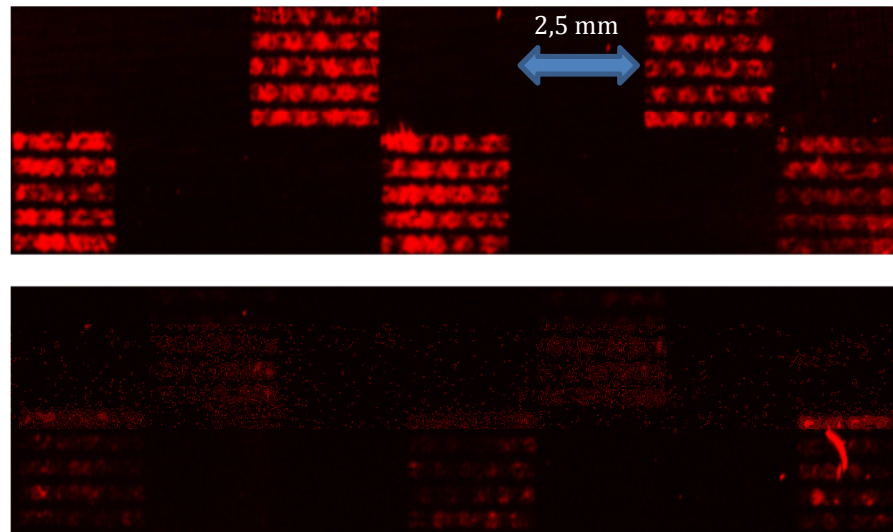


Abbildung 48 Vergleich von Überträgen in PBS ohne Biotin (oben) und mit Biotin (unten);
Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 (Intensität: 3,5)

Die Anwesenheit von Biotin bewirkte eine deutliche Signalabschwächung. Somit ist es wahrscheinlich dass durch die Verwendung von SB eine Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen erzielt werden kann und die beobachtete Restfluoreszenz auf Austauschprozesse von gebundenem Biotin und biotinyliertem Peptid zurückzuführen ist. Wie bereits erwähnt ist der Austausch von auf Streptavidin gebundenem Biotin bei Raumtemperatur langsam. Möglicherweise bewirkt die Immobilisierung von Streptavidin auf der Oberfläche, insbesondere da das Protein bei einer Bindung von Biotin seine Tertiärstruktur ändert, eine Verringerung der Affinität zu Biotin, was den unerwartet schnellen Austausch erklären könnte.^[57,60]

Es wurde ebenfalls ein Waschen der Zielträger nach dem beendeten Übertrag mit PBS-T zum Entfernen unspezifischer Adsorbate in Erwägung gezogen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es während längerer Inkubationen mit Lösungen auch zu Verlusten an über Biotin immobilisiertem Peptid kommen kann, wurde diese Idee allerdings verworfen. Tatsächlich könnte dieser Effekt auch beim kompletten Verlust des Peptid-Spotmusters, der bei langen Inkubationszeiten in Membranexperimenten beobachtet werden konnte, eine Rolle gespielt haben.

3.5 Anfärbung freier Biotinbindungsstellen nach Übertrag eines Peptidarrays

Einer der Vorteile des Streptavidin-Biotin-Systems, dass freie Biotinbindungsstellen mit einem Farbstoff-markierten Biotin angefärbt werden können. Dies ermöglicht einen Nachweis der spezifischen Anbindung an Streptavidin, zudem kann eine Normalisierung, also der Ausgleich von Peptidkonzentrationen während des Übertrages, weiter belegt werden. So sollten im Falle einer vollständigen Normalisierung aller Peptidmengen während des Übertrages alle übertragenen Peptidspots keine Fluoreszenz zeigen.

Für diesen Test musste ein Konzentrationsgradient auf einem Peptidarray erzeugt werden. Dafür wurde ein Array des Typs 2 verwendet und auf einem Objektträger über 130 Zeilen synthetisiert, wobei sich das Layout nach jeweils 20 Zeilen wiederholt. Der Konzentrationsgradient wurde durch Polyproline am C-terminalen Ende aller zu übertragenden Peptide erzeugt, da sich Polyprolinsequenzen laut Hersteller in der Synthese negativ auf Kupplungsausbeuten auswirken. Der Anbau am C-Terminus sollte dabei gewährleisten, dass sich die Konzentration an Epitopen verringerte, um den Einfluss von unspezifischen Adsorptionen zu reduzieren. Für die C-terminal eingeführten Proline wurden die N-terminalen GS-Sequenzen entsprechend gekürzt. Für das FLAG-Epitop befanden sich die folgenden Peptide auf dem Array:

GSGSGSGSGDYKDDDDK

GSGSGSGSDYKDDDDKP

GSGSGSGDYKDDDDKPP

GSGSGSDYKDDDDKPPP

GSGSGDYKDDDDKPPPP

GSGSDYKDDDDKPPPPP

MYC- und HA-Peptide wurden analog variiert. Die Aminosäuresequenz in den Kontrollspots war erneut am N-terminalen Ende verkürzt, um die Biotinylierung der Kontrollpeptide zu verringern.

Für den Versuch wurde das Array mit Biotin-OPfp in DMF funktionalisiert, die Seitenkettenschutzgruppen entfernt und für 24 h in Ammoniak inkubiert. Nach einem Waschschriff mit DMF wurde auf einen zuvor 1 h mit SB blockierten Objektträger mit Streptavidin übertragen. Zur Anfärbung der nicht abgesättigten Biotinbindungsstellen des Streptavidins wurde das bereits erwähnte Peptid Biotin-SGSGSGYPYDVPDYAK(DyLight 680) in PBS-T verwendet. Die Färbungsdauer wurde auf 15 min reduziert, da eine Desorption von biotinylierten Peptiden von Streptavidin unter Berücksichtigung der vorangegangenen Experimente mit längerer Färbungsdauer wahrscheinlich war. Der entsprechende Scan ist in Abbildung 49 gezeigt.

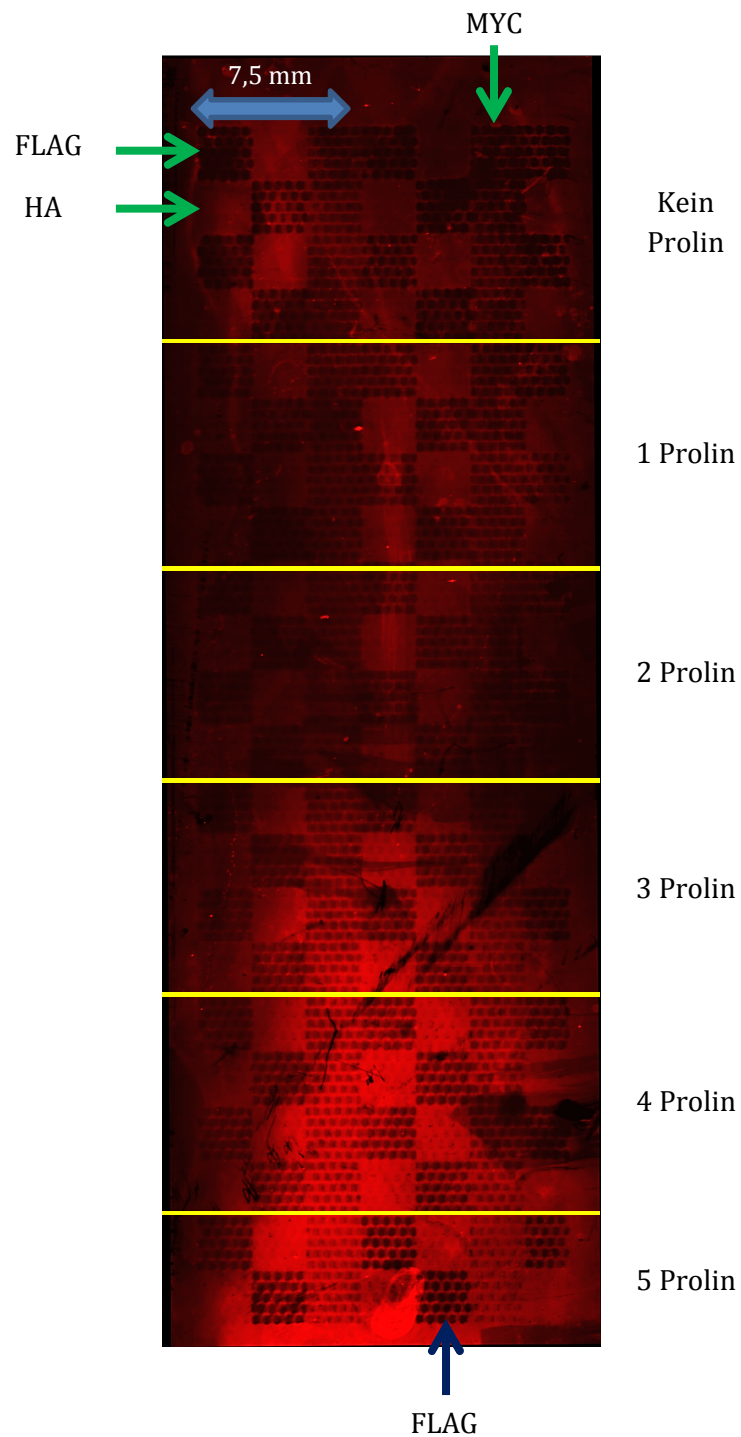


Abbildung 49 Anfärbung nicht durch biotinylierte Peptide besetzter Biotinbindungsstellen nach Transfer mit Biotin SGSGSGYPDYAK(DyLight 680) (Intensität: 3,5)

Erneut sind Inhomogenitäten auf der Oberfläche erkennbar. Auffällig ist, dass das Spotmuster der HA-Peptidspots nur in manchen Feldern leicht sichtbar ist, was zunächst

auf keine vollständige Absättigung beziehungsweise auf eine unspezifische Anlagerung hindeutet. Unter Berücksichtigung vorangegangener Versuche, bei denen Übertrag und Nachweis von HA-Epitopen möglich war, erschien dies unwahrscheinlich. Peptide mit dem HA-Epitop hatten allerdings in anderen Versuchen eine Tendenz zur unspezifischen Adsorption auf hydrophoben Oberflächen gezeigt. Es wurde daher vermutet, dass auf dem Zielträger in den HA-Bereichen die Oberfläche hydrophober war. Da das Nachweispeptid ebenfalls das HA-Epitop enthielt, konnte es sich in diesen Bereichen möglicherweise durch hydrophobe Effekte anlagern, was in den FLAG- und MYC-Bereich weniger ausgeprägt war.

Aufgrund der Hintergrundschwankungen ist es zudem schwer, in MYC-Bereichen eine Aussage über eine eventuelle Normalisierung zu treffen. Die Intensitäten in den biotinylierten Spots scheinen sich zu höheren Prolingehalten hin zu erhöhen, was eher gegen eine Normalisierung spricht.

Für das FLAG-Epitop konnte eine Normalisierung vermutlich erzielt werden, wie die Spots ohne Fluoreszenz im Bereich mit 5 C-terminalen Prolinen zeigen (blauer Pfeil). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Anbindung von biotinylierten Peptiden spezifisch am Streptavidin erfolgt. Erneut zeigte sich eine Anbindung von Peptiden in den Kontrollspots. Dieser Effekt war in den Peptidbereichen mit hohem Prolingehalt am wenigsten ausgeprägt, was möglicherweise durch den inhomogenen Hintergrund erklärbar war, allerdings auch ein Hinweis auf die verringerte Konzentration an Peptiden in diesem Bereich sein könnte. Es wurde bereits diskutiert, dass Konzentrationsänderungen im Bereich einer Zehnerpotenz während des Übertrages ausgeglichen werden können, solange ein Überschuss von Peptiden gegenüber den Bindungsstellen vorliegt. Wird die Peptidkonzentration allerdings durch Polyproline verringert, ist in den Kontrollspots kein Überschuss mehr gegeben. Dies könnte die Zunahme der Selektivität entlang des Prolingradienten erklären.

3.6 Transfer auf Sensoroberflächen zur markierungsfreien Detektion

Die Konjugation von Proteinen mit Farbstoffen durch z.B. NHS-Ester hat den Nachteil, dass unter Umständen Aminosäuren funktionalisiert werden, welche für eine Bindung wichtig wären. Ansätze wie Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)^[107-109], akustische Oberflächenwellen (SAW)^[110] oder Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS bzw. iRIFS)^[111-113] sind daher im Fokus aktueller Forschung. Da für diese Nachweissysteme allerdings spezielle Oberflächen zum Einsatz kommen, ist eine direkte Peptidsynthese mit mikropartikelbasierten Verfahren auf den Sensoren schwer zu realisieren und oftmals mit Einbußen in der Signalqualität verbunden. Es wurde daher versucht, den Transfer auf eine Sensoroberfläche sowie einen anschließenden, markierungsfreien Nachweis zu realisieren. Insbesondere RIFS wird auf sehr glatten Oberflächen, Glas mit einer 45 nm dicken Tantaloxydschicht sowie einer 5 nm dicken Siliziumoxydschicht, durchgeführt. Diese glatten Oberflächen sind für den entwickelten Transfer von Syntheseträgern auf rigide Substrate daher geeignet. Im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Biametrics innerhalb des EU-Projektes TARGETBINDER wurde ein Peptidarray des Typs 2 auf eine Sensoroberfläche übertragen. Diese war mit einem PEG-basierten Polymer^[114-115] funktionalisiert, auf dem Streptavidin über NHS-Ester immobilisiert wurde. Der Messaufbau des iRIFS ist schematisch in Abbildung 50 gezeigt.



Abbildung 50 Schematischer Aufbau der iRIFS-Messung: Der Aufbau besteht aus einer sCMOS Kamera (1), einem telezentrischen Objektiv (2), einer Hochleistungsdiode (3) und einem $\lambda/2$ Filter (4). Die Sensoroberfläche (schwarz) wird mit monochromatischem Licht bestrahlt, welches dann von der Kamera detektiert wird. Während der Messung wird der Analyt in Lösung senkrecht zum Lichteinfall durch eine aufgedruckte Silikonkammer (siehe Abdruck in Abbildung 54) gepumpt. (Mit freundlicher Genehmigung der Biametrics GmbH)

Als Nachweismolekül dienten HA-Antikörper, da deren Bindung ans HA-Epitop weniger reversibel erschien und somit bessere Signale als FLAG ergeben sollte. Für die Messung wurde zunächst ein DyLight-konjugierter Antikörper verwendet, um eine spätere Analyse am Fluoreszenzscanner zu ermöglichen. Danach wurde eine höher konzentrierte Lösung eines nicht markierten Antikörpers zugegeben (2 μg pro mL für den markierten Antikörper und 50 μg pro mL für den nicht markierten). Die Endpunkte beider Bestimmungen sind in Abbildung 51 gezeigt.

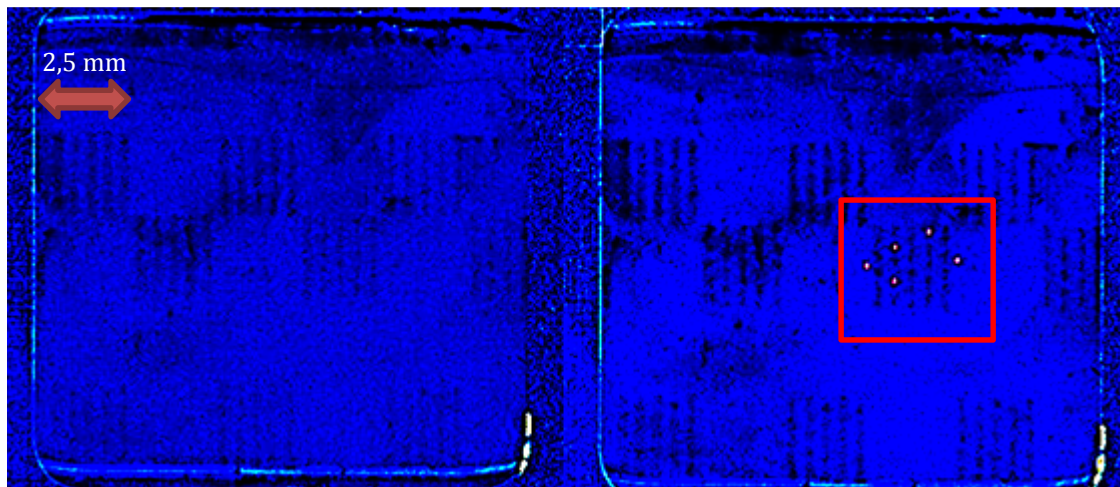


Abbildung 51 Aus den Messungen mit geringer Anti-HA Konzentration (links) und hoher Anti-HA Konzentration (rechts) erhaltene Aufnahmen; der rote Kasten markiert den Auswertungsbereich

Es konnte eine Anbindung nachgewiesen werden. Für eine quantitative Auswertung wurden im Anschluss an die Messungen drei Punkte eines Arrays ausgewählt. Deren Intensität wurde für jedes Bild der Messung mit jeweils zwei Hintergrundpunkten, entlang der Flußrichtung des Analyten vor und nach dem untersuchten Array, referenziert. Abbildung 52 zeigt den vergrößerten Messbereich mit den zur Analyse verwendeten Spots.

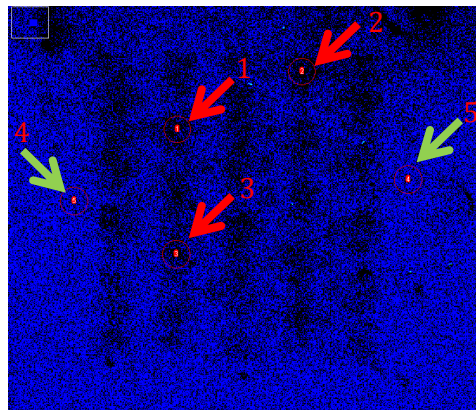


Abbildung 52 Vergrößerung des Auswertungsbereichs; rote Pfeile: Zur Auswertung verwendete Punkte; grüne Pfeile: Für die Hintergrundnormierung verwendete Punkte

Die erhaltenen Messkurven sind in Abbildung 53 dargestellt.

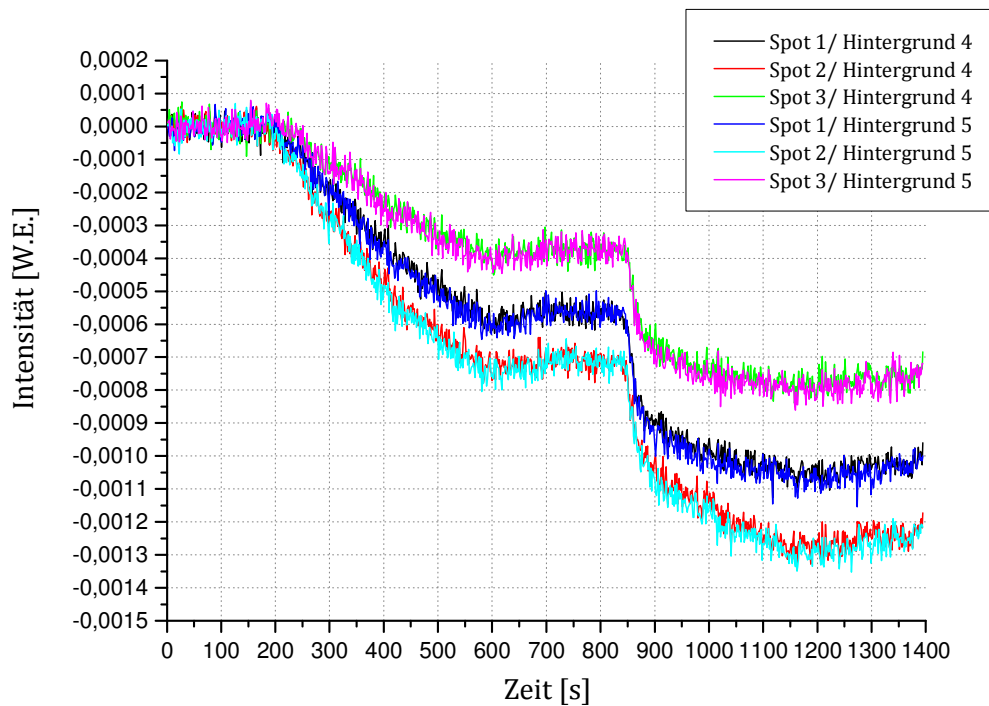


Abbildung 53 Reflektionsintensität während der Messungen mit 2 μg pro mL (von 200 bis 600s, danach Dissoziation mit PBS) und 50 μg pro mL (850-1200 s, danach Dissoziation mit Puffer)

Aus der Kurvensteigung ist ersichtlich, dass die Messung mit geringer Konzentration massentransportkontrolliert ist, was sich in einer linearen Intensitätsabnahme bis zu einer Sättigung äußerte. Der Intensitätsverlust während der Messung mit hoher Konzentration verlief hingegen exponentiell bis zur Sättigung, was auf einen kinetisch-kontrollierten Prozess hindeutet.^[116-117] Die Wahl des Referenzpunktes hatte auf den Kurvenverlauf im Rahmen des Messfehlers vernachlässigbare Auswirkungen.

Nach der beendeten Analyse wurde der Träger flächig mit konjugiertem Anti-HA angefärbt, um die Qualität des Übertrages und der Oberflächenfunktionalisierung zu evaluieren. Der resultierende Fluoreszenzscan ist in Abbildung 54 gezeigt.

Die Homogenität des Arrays ist, verglichen mit einem Übertrag auf einen PolyAn-Träger deutlich verbessert. Der Hintergrund im Bereich der Messzelle kam durch den Verzicht von Blockmedien während der iRIFS-Messung zustande. Der Übertrag des Peptidarrays auf die Sensoroberfläche sowie der markierungsfreie Nachweis der Antikörperbindung konnten demnach erfolgreich durchgeführt werden.

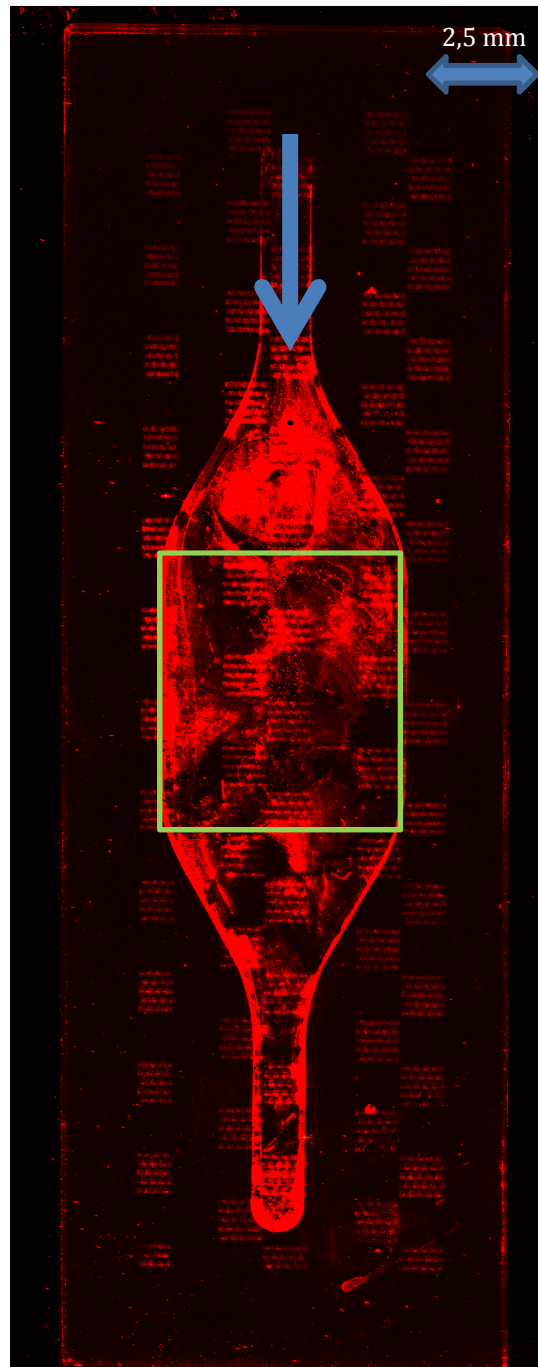


Abbildung 54 Immunfärbung der Sensoroberfläche mit anti-HA-DyLight 680 zur Darstellung der Messzelle und Qualitätskontrolle des Übertrages; Der Messbereich ist durch das grüne Rechteck markiert; Die Flussrichtung ist durch den blauen Pfeil gezeigt (Intensität: 3,5)

3.7 Übertrag auf potentielle Zellkulturoberflächen

Die Untersuchung von Peptid-Rezeptorwechselwirkungen auf Zelloberflächen mit Hilfe von festphasengebundenen Peptidarrays scheiterte bislang an der Tatsache, dass Peptidarrays sich nicht auf biokompatiblen Oberflächen synthetisieren ließen. Ein Übertrag auf diese Medien war mit dem eingangs erwähnten Rink-Amid-Linker durch die harschen Übertragsbedingungen nicht durchführbar. Sequentielle Entschützung, Spaltung und anschließender Transfer von Peptiden ermöglichten hingegen eine Prozessierung in wässrigem Medium.

Es wurde daher im Rahmen einer Kooperation mit dem Center for Advanced Bioanalysis Linz der Versuch unternommen, Peptidarrays auf biokompatible Polymerfilme zu übertragen. Aufgrund ihrer optischen Eigenschaften und ihrer Biokompatibilität wurden dafür Cycloolefinpolymere (COP) verwendet.

Nach der Optimierung des Transfers konnten Übertrag und Immobilisierung auf die funktionalisierte COP-Folie realisiert werden, wobei die Anbindung erneut über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung erfolgte (Abbildung 55).

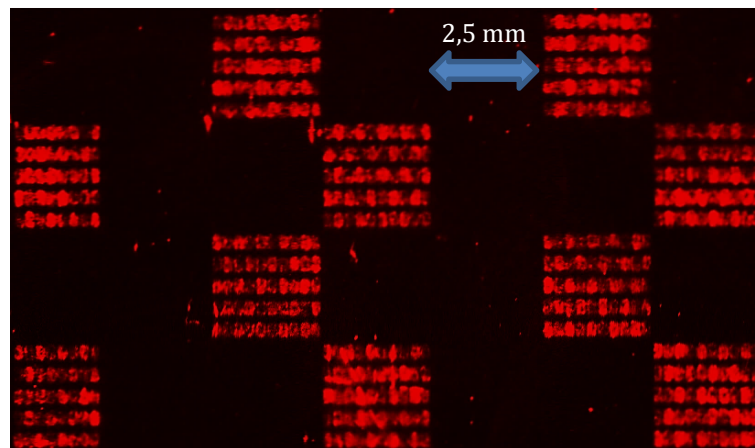


Abbildung 55 Immunfärbung eines auf mit Streptavidin funktionalisierte COP-Folie übertragenen biotinylierten Arrays mit anti-HA-DyLight 680 (Intensität: 3,5)

Der Übertrag ist bezüglich des Signal/Rauschen-Verhältnisses und der Signalintensität von vergleichbarer Qualität, wie zuvor bereits bei Überträgen auf Glassubstrate erzielt werden konnte. Tatsächlich erscheint die Funktionalisierung sogar homogener als bei den verwendeten 3d-Streptavidin-Substraten der Firma PolyAn.

3.8 Alternative Immobilisierung auf Epoxid-Oberflächen

In den vorangegangenen Kapiteln konnte das Streptavidin-Biotin-System erfolgreich für die Immobilisierung von Peptiden eingesetzt werden. Wie bereits diskutiert wurde bietet das System dabei diverse Vorteile, wie beispielsweise die schnelle, nicht katalysierte Reaktion unter milden Bedingungen. Allerdings wurden auch einige Nachteile herausgearbeitet, wie die Reversibilität der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung und das Problem unspezifischer Adsorption. Alternativ könnten die Peptide kovalent auf einer Zieloberfläche angebunden werden. Dies hätte den Vorteil, dass nur spezifisch gebundene Peptide immobilisiert würden und unspezifische Adsorbate mit Lösungsmittelgemischen entfernt werden könnten, ohne dabei das zur Immobilisierung verwendete Streptavidin zu denaturieren. Um zu zeigen, dass das Transfervorgang auch für andere Systeme anwendbar ist, wurde der Versuch unternommen, Peptide über eine Thiol-Epoxid-Reaktion zu immobilisieren (Abbildung 56). Diese Reaktion wurde gewählt, da sie gute Ausbeuten erzielen sollte^[118] und sich Thiole in Form von Cystein gut einführen lassen. Ein weiterer Vorteil ist außerdem, dass sich Epoxidoberflächen durch Kondensation von Epoxysilanen unter Ausbildung selbstorganisierender Monolagen (SAM) herstellen lassen.^[119] Insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in vorangegangenen Versuchen eine homogene Funktionalisierung als wichtiger Parameter für die Qualität übertragener Arrays identifiziert werden konnte, erschien das System geeignet.

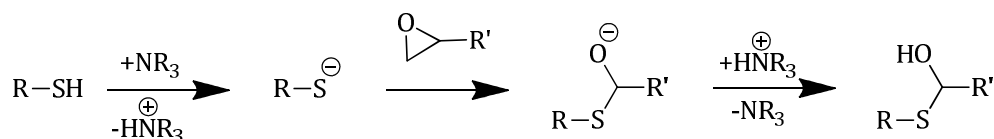


Abbildung 56 Stickstoffbasenkatalysierte Thiol-Epoxid-Click-Reaktion^[118]

In einem Versuch, der parallel zu dem in Abbildung 40 gezeigten durchgeführt wurde, wurde Cystein auf ein Peptidarray angebunden. Nach vollständiger Entschützung und Ammoniakinkubation wurde das Array durch eine Membran auf einen Zielträger mit einer 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan(GPS)-SAMs. Als Lösungsmittel diente dabei PBS, als Base wurden 5 % 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) zugesetzt. Eine Immunfärbung der übertragenen Peptide lieferte allerdings nur schwache Signale, wie Abbildung 57 zeigt.

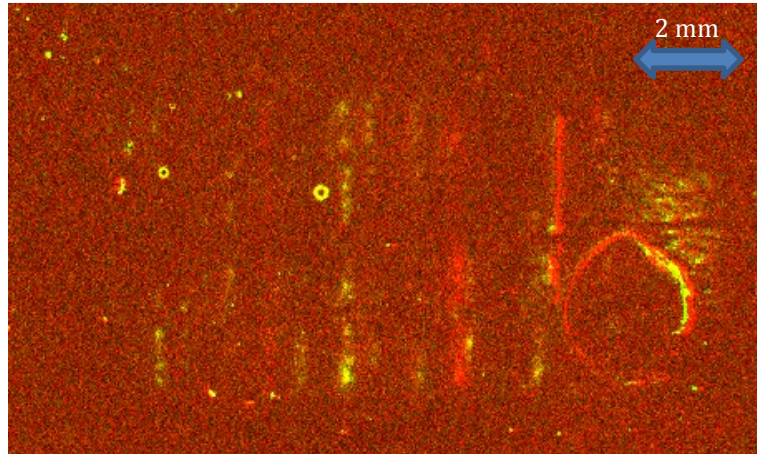


Abbildung 57 Immunfärbung eines Übertrages von N-terminal mit Cystein funktionalisierten Peptiden auf GPS-Oberfläche mit anti-HA-DyLight 680 und anti-FLAG-DyLight 800 (Intensität: 6)

Da das Verfahren mit einer Membran zwischen Synthese- und Zielträger auch für die Immobilisierung von Peptiden auf mit Streptavidin funktionalisierten Trägern keinen Erfolg brachte, wurde auf eine weitere Optimierung dieses Transferprinzips verzichtet. Nachdem allerdings der Transfer auf Glasoberflächen realisiert werden konnte, wurde getestet, ob das Verfahren sich auch für die Immobilisierung von Thiolen auf 3-GPS-SAMs eignete. Allerdings konnten nach Übertragen in wässrigem Medium trotz Variation von Übertragsdauer sowie Base und Basenkonzentration keine Peptide nachgewiesen werden. Erst durch eine Änderung des Lösungsmittels zeigte eine Immunfärbung deutliche Fluoreszenzsignale. Für den Versuch wurde eine 10 %ige DABCO Lösung in DMF (m/v) verwendet. 100 μ l wurden zwischen Synthese- und Zieloberfläche gegeben und Beide für 1 h aneinander gepresst. Die Immunfärbung ist in Abbildung 58 gezeigt.

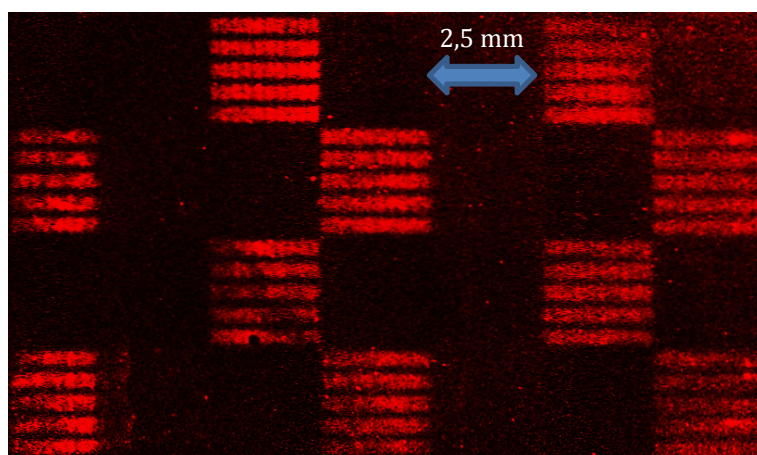


Abbildung 58 Immunfärbung von auf einer 3-GPS-SAM immobilisierter Peptide mit anti-HA-DyLight 680 (Intensität: 5)

Das HA-Peptid konnte erfolgreich übertragen, auf der Oberfläche immobilisiert und angefärbt werden. Eine unspezifische Wechselwirkung konnte durch den Verzicht auf Polymere und das intensive Waschen mit DMF nahezu ausgeschlossen werden. Wie bereits für die 2d-Streptavidin und 2d-Neutraavidin Oberflächen beobachtet, sind auch hier keine Konzentrationsunterschiede zu erkennen, was für eine Normalisierung der Konzentrationen spricht.

4 Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren zur Aufreinigung von Peptidarrays unter Erhalt der lateralen Spot-Auflösung zu entwickeln, das den Peptidtransfer unter milden Bedingungen und die Erstellung mehrerer Replikate ermöglicht. Die entscheidenden Verbesserungen gegenüber bestehenden Methoden waren die zeitliche Trennung von Entschützung der Peptidseitenketten, der Abspaltung der Peptide und der Immobilisierung auf einer Zieloberfläche.

Durch Charakterisierung mit XPS, ToF-SIMS, Photometrie und MALDI-ToF wurde die Abspaltrate von Peptiden von der Syntheseoberfläche mit gasförmigem Ammoniak ermittelt, wobei alle Daten eine gute Übereinstimmung zeigten. Das Peptidamid konnte durch ToF-SIMS detektiert werden, wohingegen Peptide mit C-terminalen PEG-Ketten weder durch MALDI-ToF noch durch ToF-SIMS nachweisbar waren. Da insbesondere im MALDI-ToF Versuch auch das Peptidamid nicht nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass zumindest ein kleiner Teil der Peptide C-terminale PEG-Ketten enthält. Allerdings deuten die Änderungen der PEG-korrelierten Signale in XPS und ToF-SIMS-Messungen über die Inkubationszeit darauf hin, dass diese allenfalls in Spuren vorliegen. Selbst mit MALDI waren PEGMA-Zerfallsprodukte nur schwer nachweisbar, was auf eine vernachlässigbare Beschädigung des Films durch die Ammoniakinkubation hinweist. Da sich aus der langsamen Abspaltrate lange Inkubationszeiten ergeben, könnten für eine bessere Anwendbarkeit weitere Untersuchungen nötig sein. Höhere Temperaturen während der Inkubation mit Ammoniak sollten die Spaltdauer deutlich verkürzen und die Erstellung von Replikaten beschleunigen.

Basierend auf der ermittelten Abspaltrate konnten für die gezeigten Versuchsreihen bereits Mehrfachüberträge durchgeführt werden. Abbildung 59 zeigt die Immunfärbung des 15. Übertrages eines Peptidarrays auf mit Streptavidin funktionalisiertem Glas.

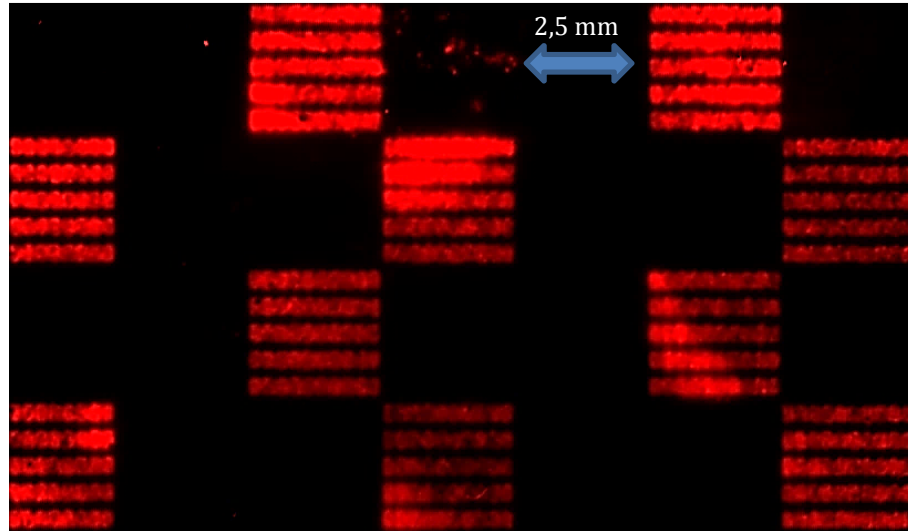


Abbildung 59 Immunfärbung mit anti-HA-DyLight 680 des 15. Übertrages eines Peptidarrays auf Streptavidinträger (Intensität: 5)

Als erstes mögliches System zur Immobilisierung biotinylierter Peptidarrays wurde auf hydrophoben PVDF-Membranen adsorbiertes Streptavidin eingesetzt. Die Immunfärbungen der Überträge waren dabei von vergleichbar guter Qualität wie die Vorversuche, bei denen Peptide auf einer goldbeschichteten Membran immobilisiert wurden. Membran und Syntheseträger müssen nach beendetem Transfer allerdings vorsichtig und mit genügend Lösungsmittel getrennt werden, um die Adsorbate nicht zu beschädigen. Die Fehlagerung von Aminosäurepartikeln während der mikropartikelbasierten Peptidsynthese bedingte, dass auch Kontrollpeptidspots, welche nicht biotinyliert sein sollten, nach Immunfärbungen Fluoreszenz zeigten. Wahrscheinlich befanden sich auch in diesen Spots geringe Mengen biotinylierter Peptide. Diese lagen wahrscheinlich trotz der geringen Konzentration im Überschuss zu den verfügbaren Bindungsstellen vor, weswegen beide Bereiche gleichermaßen mit Peptiden abgesättigt wurden und daher keine Fluoreszenzunterschiede aufwiesen. Die Verwendung gängiger Blockierungsreagenzien wie BSA oder Tween20 ist für das System nur begrenzt möglich. Da sogar der Nachweis verschiedener Affinitäten durch Fluoreszenzunterschiede möglich ist, erscheint eine Optimierung auf durchzuführende Screenings dennoch lohnenswert. Möglicherweise könnte auch eine Funktionalisierung von Membranen und eine Immobilisierung von Streptavidin über kovalente Bindungen oder auf an der Membran gekuppeltem Biotin einen aggressiveren Einsatz von Blockierungsreagenzien ermöglichen.

Der Transfer von Peptidarrays auf Glassubstrate mit kovalent gebundenem Streptavidin zeigte anfänglich deutliche Artefakte. Die Einführung eines kurzen Waschschrittes zur Desorption von Peptiden in den oberen Schichten des Synthesefilms verhindert diese zuverlässig. Innerhalb der Scannerauflösung von $21\ \mu\text{m}$ war keine Spotverbreiterung zu erkennen, was für eine hohe Qualität der Überträge spricht. Beobachtete Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten nach der Immunfärbung von übertragenen Arrays sind auf eine inhomogene Funktionalisierung der verwendeten Oberflächen als wahrscheinlichste Ursache zurückzuführen.

Die Anfärbung freier Biotinbindungsstellen bestätigte zusätzlich die Spezifität der Anbindung, da ein deutlicher Kontrast zwischen Bereichen mit gesättigten und nicht gesättigten Biotinbindungsstellen darstellbar war. Es zeigte sich dabei allerdings auch, dass gebundene Peptide die Oberflächeneigenschaften eventuell lokal beeinflussen, was eine unspezifische Adsorption des Nachweismoleküls in manchen Bereichen bewirkte.

Die Immobilisierung ganzer Peptidarrays auf iRfS-Sensoroberflächen oder funktionalisierten COP-Folien gelang ebenfalls. Erste Versuche mit Zellen wurden bereits am CBL durchgeführt und zeigten dabei, dass der Nachweis von Membranproteinbindungen, an übertragenen Peptidarrays möglich ist.

Der markierungsfreie Nachweis und die Charakterisierung der anti-HA-Bindung an das HA-Epitop wurde dabei sowohl massentransport- als auch kinetisch kontrolliert demonstriert. Die markierungsfreie Detektion im Arrayformat ermöglicht durch Ermittlung von Dissoziationskonstanten die Identifikation von Epitopen, gegen die hochaffine Antikörper gebildet werden können. Es konnte bereits in den 1980er Jahren am Beispiel von Hepatitis B gezeigt werden, dass pathogenspezifische Peptide die Bildung von Antikörpern induzieren können.^[120] Die Kombination aus markierungsfreier Detektion und billiger Sensorherstellung ermöglicht es, ganze Populationen von Patienten auf hochaffine Antikörper zu testen, was zur Entwicklung von Impfstoffen gegen derzeit schwer therapierbare Krankheiten wie Malaria führen könnte.

Auch neue Systeme wie Alkin-Azid-Reaktionen zur Immobilisierung von Peptidarrays sind durch die hohe Flexibilität des Systems möglich. Insbesondere in Kombination mit der Transfermaschine und ihrer Positioniergenauigkeit ist es denkbar, mehrere Peptidarrays nacheinander auf dieselbe Zieloberfläche zu übertragen und parallel an mehrzähligen Linkern zu immobilisieren. So könnten mit dem Verfahren sogar proteinähnliche Strukturen erzeugt werden.

5 Material und Methoden

Alle verwendeten Lösungsmittel und Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen und in den aufgeführten Qualitätsstufen ohne weitere Aufreinigung eingesetzt:

Ammoniak 99,99 % von **Air Liquide** (Düsseldorf, Deutschland)

1-Propylamin (mind. 98 %) 2,2'-Bipyridin (mind. 99 %) und Molekularsieb 3 Å und 4 Å von **Alfa Aesar** (Karlsruhe, Deutschland).

Fmoc-Gln(Mtt)-OPfp von **Bachem** (Bubendorf, Schweiz).

Biotin-OSu, Biotin-OPfp, D-Biotin und Fmoc-beta-Ala-OH von **Iris Biotech** (Marktredwitz, Deutschland).

Chloroform zur Analyse (z.A.) DABCO zur Synthese (z.S.), DCM (z.A.), DIPEA (z.S.), DMF (z.A.), DMSO (z.A.), H₂O₂ (z.S.), H₂SO₄ (z.S.), iPrOH (z.A.), KOH (z.A.), MeOH (z.A.), Piperidin (z.S.) und TFA (z.S.) von **Merck** (Darmstadt, Deutschland).

3-GPS (mind. 98 %), APTES (mind. 99 %), BIBS (mind. 98 %), CuBr (mind. 98 %), DIC (mind. 99 %), EG7-SH (mind. 95 %), Fmoc-Cys-OPFP (mind. 98 %), Fmoc-pentafluoro-Phenylalanin (mind. 97 %), HOBT (mind. 99 %), NaN₃ (mind. 99 %), NMI (mind. 99 %), PBS BioPerformance Certified pH 7,4 Mischung, PyBOP (mind. 98 %), TIBS (mind. 99 %) und Tween20 von **Sigma Aldrich Chemie GmbH** (Steinheim, Deutschland).

Toluol (mind. 99,5 %), Ethanol (mind. 99,5 %), Essigsäureanhydrid ((mind. 98 %) von **VWR** (Darmstadt, Deutschland).

DMF wurde mind. 72 h über Molekularsieb 4 Å, DCM mind. 72 h über Molekularsieb 3 Å vor der Verwendung getrocknet. Für alle Oberflächenbehandlungen mit Wasser oder wässrigen Lösungen wurde Millipore® Wasser verwendet.

Als Glasobjektträger wurden Objektträger, ca. 76 × 26 × 1 mm, Kanten geschliffen, ohne Mattrand, LOT 26420 202 **Paul Marienfeld GmbH & Co. KG** (Lauda-Königshafen, Deutschland) verwendet.

Proteine

Anti-HA (12CAS) wurde von Herrn Dr. Gerd Moldenhauer am DKFZ hergestellt, Anti-FLAG (M2) von **Sigma Aldrich Chemie GmbH** (Steinheim, Deutschland). Die Fluoreszenzmarkierung beider Antikörper mit NHS-Estern wurde am DKFZ durchgeführt.

Streptavidin und Streptavidin DyLight 680 wurden von der **Thermo Fisher Scientific** (Schwerte, Deutschland) verwendet, BSA von **PAA cell culture** (mittlerweile GE Healthcare, München, Deutschland). Des Weiteren wurden die Blockpuffer SB von Candor Bioscience, „Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting - MB-070 von **Rockland** (Gilbertsville, USA).

XPS-Messungen

XPS-Charakterisierungen wurden mit einem K-Alpha XPS-Spektrometer von **ThermoFisher Scientific** (East Grinstead, UK) durchgeführt. Zur Anregung wurde mikrofokussierte, monochromatisierte Al-K α -Röntgenstrahlung benutzt (400 μ m Anregungsfleckdurchmesser). Die Aufladung wurde mit Hilfe von Elektronen (8 eV) und niederenergetischen Argon Ionen kompensiert. Die Datenerfassung und Auswertung wurde mit der Thermo Advantage Software durchgeführt^[121], die Peakanpassung erfolgte dabei mit einer oder mehreren Voigt-Funktionen. Zur Quantifizierung werden die Transmissionsfunktion des Analysators, die mittleren freien Weglängen der Photoelektronen sowie die Wirkungsquerschnitte für die Photoionisation nach Scofield berücksichtigt.^[122] Alle Spektren wurden auf die C1s = 285,0 eV (C-C, C-H) Photoelektronenlinie referenziert. Die Energieskala wurde über die bekannten Photoelektronenlinien von metallischem Gold, Silber und Kupfer kalibriert. Die Energieauflösung bei einer Durchlassenergie von 50 eV ist 1,0 eV Halbwertsbreite der Ag3d $_{5/2}$ Line. Die experimentelle Unsicherheit beträgt $\pm 0,2$ eV, die Reproduzierbarkeit einzelner Messungen lag innerhalb 10 % des Messwertes.

Die Messparameter waren: Paßenergie: 50 eV; Verweilzeit: 50 ms; Schrittweite: 0,1 eV. Durchgeführt wurden je 10 Scans pro Elementbereich.

ToF-SIM-Spektrometrie

Die Messungen wurden im Ultrahochvakuum ($p < 5 \times 10^{-9}$ mbar) an einem TOF.SIMS5 Gerät mit Reflektron-ToF-Analysator **ION-TOF GmbH** (Münster, Deutschland) durchgeführt. Für die orts aufgelösten Messungen wurde eine Bi-Cluster Liquid Metal Ion Gun im high current bunched mode verwendet (Pulsdauer: 1,1-1,3 ns). Bi $_3^+$ -Primärionenpulse wurden bei einer Spannung von 25 keV erzeugt, die laterale Auflösung betrug etwa 4 μ m. Für eine Messung wurde eine Fläche von 500 \times 500 μ m abgerastert, was 128 \times 128 Datenpunkten entsprach. Die Primärionendosis wurde unterhalb des statischen Limits von 10 11 Ionen pro cm 2 gehalten. Für Tiefenprofile diente eine C60-Quelle mit einer Spannung von 20 keV als Sputterquelle. Ladungskompensation wurde wenn nötig mit einer Elektronenkanone bei 21 eV durchgeführt und das Ionen-Reflektron entsprechend nachjustiert. Zur Kalibration der Spektren wurden die C $^+$, CH $^+$, CH $_2^+$, und CH $_3^+$ Signale verwendet.

UV/Vis-Spektrometrie

Für die photometrischen Bestimmungen wurde ein Jenway 7305 Spektralphotometer verwendet. Für die PDFA-Bestimmungen wurden 12,5 \times 12,5 \times 45 mm Einwegküvetten „UV-Cuvette micro“ von **Brand GmbH & Co. KG** (Wertheim, Deutschland) mit einer Zentrumshöhe von 15 mm verwendet (LOT 206-1). Für die Mtt-Kation-Bestimmungen wurden aufgrund der Instabilität der Einwegküvetten gegenüber Toluol Suprasil 100-QS Quarzküvetten der Firma **Hellma Analytics** (Müllheim, Deutschland) verwendet.

Ellipsometrie

Für die ellipsometrische Schichtdickenbestimmung wurde ein Ellipsometer des Typs M44 von **JA Woollam Co. Inc.** (Lincoln, USA) verwendet. Der Wellenlängenbereich betrug 280-800 nm, als Lichtquelle diente eine polychromatische Xenonlampe. Zur Berechnung der Schichtdicke wurde das Cauchy-Modell verwendet.^[123] Zur Bestimmung wurden jeweils drei Messpunkte gemittelt, wobei die Standardabweichung als Fehler angegeben wurde.

MALDI-ToF-Spektrometrie

Die MALDI-ToF-Messungen wurden an einem 4800 *Plus* MALDI TOF/TOF™ Analyzer von **AB SCIEX** (Framingham, USA) und dem 4000 Series Explorer durchgeführt. Der Messbereich wurde auf m/z von 1200 bis 2000 gesetzt, wobei der Fokusbereich 1500 war. Gemessen wurde bei einem Druck in der Analysekammer von $2,7 \times 10^{-7}$ mbar. Zur Kalibration der Spektren dienten zwei charakteristische Signale von Angiotensin bei m/z 904,47 und 1570,68.

Peptidarrays

Sämtliche verwendeten Peptidarrays wurden von der Firma **PEPperPRINT GmbH** (Heidelberg, Deutschland) geordert. Als Synthesematrix diente 100% PEGMA sowie 10:90-PEGMA-co-PMMA-Copolymer. Die verwendeten Arrays waren wie folgt aufgebaut:

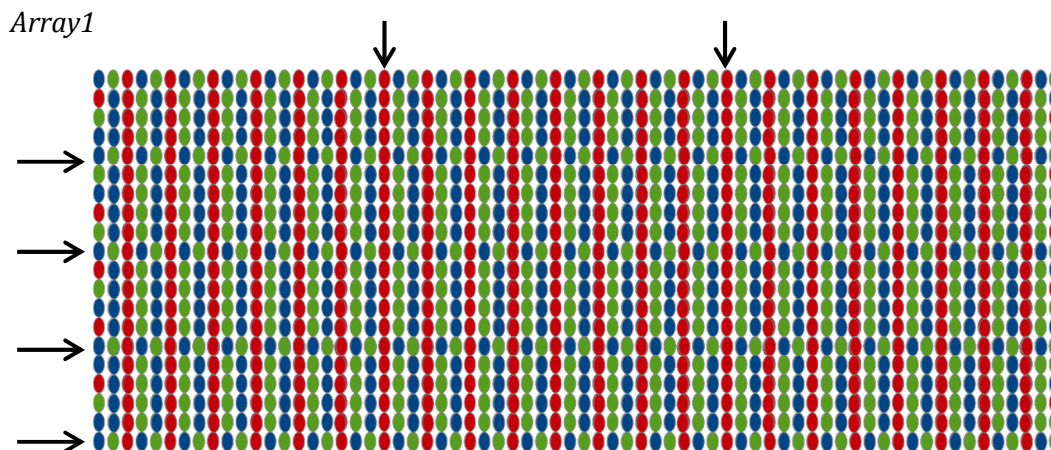


Abbildung 60 Aufbau Array 1; blaue Ellipsen entsprechen MYC-Mutationen, grüne Ellipsen FLAG-Mutationen und rote Ellipsen HA-Mutationen; die Pfeile markieren Kontrollreihen bzw. -spalten ohne N-terminales Cystein.

Die verwendeten Mutationen waren dabei (von links nach rechts; die Abfolge wiederholt sich nachdem alle 8 Varianten eingebaut wurden) YPYTVDPDYA, YPYSVPDYA, YPYNVPDYA, YPSDVPDYA, YPNDVPDYA, YPYDVPDYA, YPYKVPDYA, YPKDVPDYA für HA, EQKCISEEDLN, EQKLIPEEDLN, EQKLI AEEDLN, EQKPISEEDLN, EQKAISEEDLN, EQKLISEEDLN, EQKVI SEEDLN, EQKLICEEDLN für MYC und DYKADDDK, DYKDDADK,

DYKFDDDK, DYKEDDDK, DYKDDEDK, DYKDDDDK, DYKDDFDK, DYKWDDDK für FLAG. Alle Epitope wurden mit S und G auf 15 Aminosäuren verlängert.

Array2

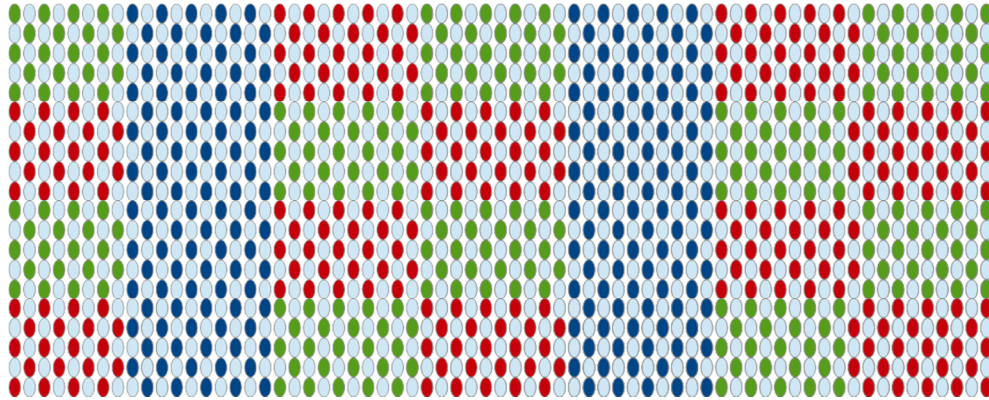


Abbildung 61 Aufbau Array 2; blaue Ellipsen entsprechen dem MYC -Epitop, grüne Ellipsen dem FLAG-Epitop und rote Ellipsen dem HA-Epitop; in den jeweiligen Feldern sind die Kontrollspots (in der Synthese verkürzt und dadurch N-terminal acetyliert) ausgegraut.

Transfermaschine

Die verwendete Transfermaschine wurde am IMT konstruiert. Die 4-dimensionale Verfahrenseinheit besteht aus zwei Lineartischen M-414, einem Hubtisch M-501 und einem Rotationstische M-060 der Firma **Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG** (Karlsruhe, Deutschland). Die pneumatische Linearachse MXQ-12 von **SMC Pneumatik GmbH** (Egelsbach, Deutschland) besteht aus einem Zylinder mit integrierter Linear-Kugelumlauflührung und Schlitten und ermöglicht aufgrund der hohen Führungsgenauigkeit, eine präzise Handhabung des eingespannten Peptidarrays.

Für die halb-automatisierte Prozessdurchführung wurde eine Labview Ansteuerung programmiert. Diese steuert die pneumatische und die elektrischen Achsen, die Vakuumbreifer und beinhaltet zudem die beiden Videobilder des Positioniermoduls. Der Aufbau ist in Abbildung 62 gezeigt.

Für die Überträge wurde über den Zylinderdurchmesser die Kraft bestimmt und diese konstant gehalten. Dafür wurde die Fläche des anzupressenden Syntheseträger durch wiegen bestimmt und der Druck so eingeregelt, dass bei 5 bar eine Kraft von 7,25 N pro cm^2 wirkte.

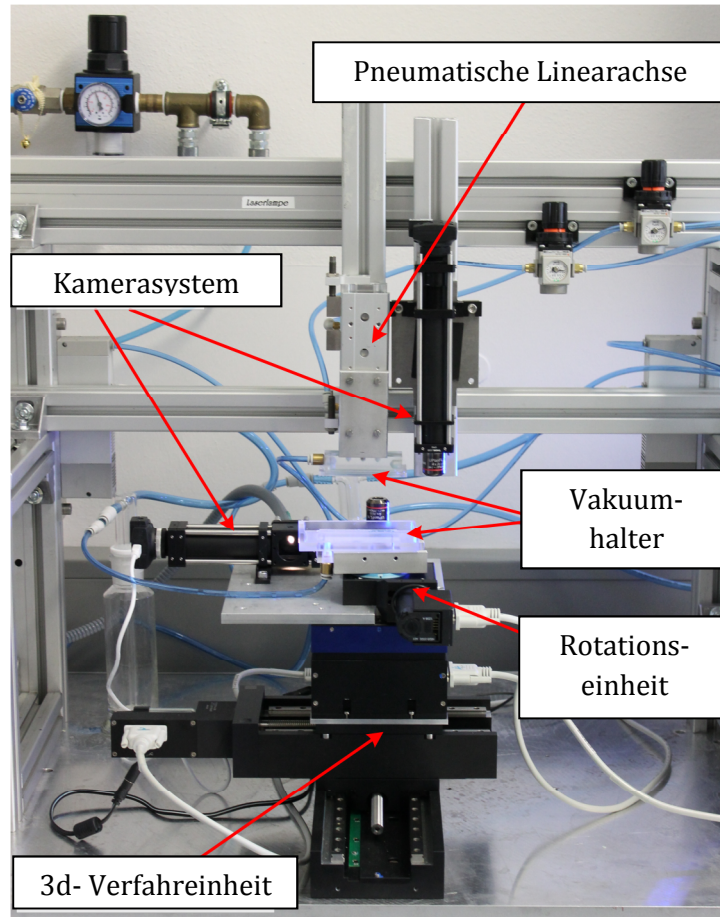


Abbildung 62 Aufbau der Transfermaschine

Fluoreszenzscans

Die gezeigten Fluoreszenzscans wurden mit dem Odyssey Infrared Imager von **LI-COR Biosciences** (Lincoln, NE/USA) für „DyLight 680“- und „DyLight 800“-Fluorophore. Alle Scans wurden mit der „Odyssey Application Software 3.0 (V. 3.0.21)“ kontrastoptimiert. In einer Abbildung gezeigte Scans wurden, soweit nicht anders deklariert, parallel gescannt um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Membranen wurden während des Scannens mit beschwert, um homogene Scanresultate zu ermöglichen. Die Auflösung der gezeigten Scans betrug 21 μm , als Qualität wurde „high“ oder „highest“ gewählt.

Goldbeschichtung von Membranen

Membranen wurden mit einem MED 020 Modular High Vacuum Coating **System Bal-Tec AG (Leica Microsystems)** (Wetzlar, Germany) bei 2×10^{-4} mbar und 60 mA für 15-35 s mit Gold beschichtet. Bis zur Verwendung wurden die Oberflächen unter Argon gelagert.

5.1 Immobilisierung von Streptavidin auf PVDF-Membranen

Eine Immobilon-FL Membran wurde auf Objektträgerformat zugeschnitten und in eine passende Polypropylen-Inkubationskammer gelegt. Die Membran wurde mit MeOH benetzt und direkt mit PBS gespült, dann für 3×10 min in PBS von MeOH gereinigt.

Anschließend wurden 3 mL einer 1 mg/mL Streptavidinlösung aufpipettiert und die Membran mindestens für 16 h bei 4 °C geschüttelt. Vor der Verwendung wurde die Membran 1 × 5 min und 3 × 2 min mit PBS gewaschen und direkt auf das Filterpapier mit dem Transfermedium gegeben.

5.2 Funktionalisierung von Siliziumdioxid-Substraten

5.2.1 Reinigung und Aktivierung

Um auf SiO₂-haltigen Oberflächen freie Silanolgruppen zu erzeugen, wurde die Substratoberfläche zunächst gereinigt und angeätzt. Für Glasträger wurde dafür in einer Petrischale 3 h in 1 M KOH in Isopropanol geschüttelt. Siliziumwafer wurden in einer Petrischale mit einer 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid in Schwefelsäure Lösung (Caro'sche Säure) 45 min geschüttelt. Die Oberflächen wurden dann gründlich mit destilliertem Wasser, entionisiertem Wasser und Ethanol gewaschen, im Luftstrom getrocknet und mit der entsprechenden Silanlösung direkt umgesetzt.

5.2.2 Silanisierung mit APTES

Die gemäß 5.2.1 gereinigten Oberflächen wurden in einem Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre in einer Petrischale mit einer Mischung aus 2,4 % Millipore-gefiltertem Wasser und 2,9 % (v/v/v) APTES in Ethanol übergossen und mindestens 16 h inkubiert. Die Reaktionslösung wurde abgegossen und gleichzeitig mit Ethanol gespült, um ein Auskristallisieren des APTES auf der Oberfläche zu vermeiden (Eventuell auftretende Verunreinigungen wurden 3 × 5 min in Chloroform in einem Ultraschallbad entfernt). Um die Kondensationsreaktion abzuschließen wurden die Träger 45 min bei 120 °C im Ofen erhitzt und bis zur weiteren Verwendung unter Schutzgas bei 4 °C gelagert werden.

5.2.3 Silanisierung mit 3-GPS

Die gemäß 5.2.1 gereinigten Oberflächen wurden in einem Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre in einer Petrischale mit einer Lösung aus 10 % (v/v) 3-GPS in über Molsieb getrocknetem Toluol übergossen und mindestens 16 h inkubiert. Die Lösung wurde abgegossen und die Träger 3 × 1 min in Toluol und 2 × 1 min in DCM gewaschen, im Exsikkator getrocknet und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung unter Schutzgas gelagert.

5.2.4 Veresterung mit α -Bromoisobutyrylbromid (BIBS)

Eine APTES-funktionalisierte Oberfläche wurde in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt. Für die Funktionalisierung wurde 1 Äquivalent BIBS (0,1 mM) im Gegenstrom in eine Lösung von 6 Äquivalenten (0,6 mM) DIPEA in auf 0 °C gekühltes DCM getropft. Nach kurzem Rühren wurde die Lösung direkt auf die APTES-funktionalisierten Oberflächen gegeben und mindestens 16 h inkubiert. Die Oberflächen wurden dann 2 × 3 min mit DCM und 2 × 2 min mit MeOH gespült, im Luftstrom getrocknet und bis zur weiteren Umsetzung bei 4 °C unter Argon gelagert.

5.2.5 Polymerisation mit 100% PEGMA

Eine nach 5.2.2 und 5.2.4 funktionalisierte Oberfläche wurde in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt. In einem Schlenkkolben wurden nach dreimaligem Evakuieren und Beschicken mit Argon je 10 mL PEGMA, 10 mL MilliPore-gefiltertes Wasser und 10 mL MeOH unter Gegenstrom zugegeben. Anschließend wurde im Gegenstrom 280 mg 2,2'-Bipyridin zugegeben und die Lösung gerührt, bis dieses vollständig gelöst war. Nun wurden 128 mg CuBr, welches aufgrund der schlechten Löslichkeit fein zerrieben wurde, ebenfalls im Gegenstrom zugegeben. Nach 5 min Rühren wurde die Lösung ebenfalls im Gegenstrom auf die zu funktionalisierenden Oberflächen gegossen und mindestens 16 h inkubiert. Auf diese Weise wurden Synthesefilme im Bereich von 80 bis 130 nm erhalten; die Filmdicke ließ sich durch die Inkubationsdauer verringern oder erhöhen. Nach beendeter Reaktion wurden die Träger mit destilliertem Wasser abgespült, 3 × 5 min mit Wasser und 2 × 3 min mit MeOH gewaschen. Eventuelle Rückständen wurden mit Ultraschallbehandlung in Chloroform entfernt. Die Träger wurden anschließend im Luftstrom getrocknet und bei 4 °C über Schutzgas bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Reaktionskontrolle auf Glas wurde stets ein kleines Stück Siliziumwafer mitprozessiert. Die Farbänderung konnte dabei als zuverlässiger Indikator einer erfolgreichen Reaktion verwendet werden.

5.3 Peptidchemie

5.3.1 Kondensation von Aminosäuren und Peptiden mit freien Amino- und Hydroxylgruppen mit DIC/NMI

Die Syntheseträger wurden in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt. Eine 0,2 M Lösung des zu kuppelnden Eduktes in DMF wurde unter Schutzgas in einem Schlenkkolben im Gegenstrom mit 1,2 Äquivalenten DIC (0,24 M) versetzt und für 5 min gerührt. Dann wurden 2 Äquivalente NMI (0,4 M) im Gegenstrom zugegeben und nach 1 min weiterem Rühren auf die Syntheseoberflächen gegeben. Der Exsikkator wurde dreimal evakuiert und mit Schutzgas beschickt und die Syntheseoberflächen über Nacht inkubiert. Anschließend wurde 3 × 5 min mit DMF, 2 × 3 min mit MeOH gewaschen und anschließend im Luftstrom getrocknet. Der Syntheseträger wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C unter Schutzgas gelagert.

5.3.2 Kondensation von Aminosäuren und Peptiden mit freien Aminogruppen mit HOBt/PyBOP

Es wird eine 0,2 M Mischung des zu kuppelnden Eduktes und eine je 0,2 M Lösung von PyBOB/HOBt in trockenem DMF angesetzt. Die Lösungen wurden gemischt und für 5 min gerührt. Anschließend wurde 0,2 M DIPEA zugegeben. Die Lösung wurde direkt zu den Syntheseträgern gegeben. Das Gefäß wurde in einen Exsikkator gestellt und dieser dreimal evakuiert und mit Schutzgas beschickt. Nach Inkubation über Nacht wurde 3 × 2 min mit DMF gewaschen.

5.3.3 Kondensation von Aminosäure-Aktivestern mit freien Aminogruppen

Zwei Oberflächen mit freien Aminogruppen wurden mit der Sandwich Methode funktionalisiert (Sollte nur ein Träger funktionalisiert werden, so wurde ein unfunktionalisierter Objektträger zum Auflegen verwendet). Dafür wurde einer der

Träger in einer Petrischale vorgelegt und 250 µl einer 0,03 M Lösung des Aktivesters in DMSO für NHS-Ester bzw. in DMF für OPfp-Ester entlang einer Kante mit einer Eppendorfpipette aufpipettiert. Der zweite Träger wurde in die Lösung getaucht und so aufgelegt, dass sich keine Luftblasen zwischen den beiden Trägern befanden. Nach 16 h Inkubation wurden die Träger vorsichtig getrennt, 3 × 5 min mit DMSO bzw. DMF, 2 × 3 min mit MeOH gewaschen und anschließend im Luftstrom getrocknet. Der Syntheseträger wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Schutzgas gelagert.

5.3.4 Acetylierung von freien Amino- und Hydroxylgruppen

Nach der Anbindung einer Aminosäure oder eines Peptids werden die Oberflächen in einer Petrischale mit einer Mischung aus 10 % Essigsäureanhydrid, 20 % Diisopropylethylamin und 70 % (v/v/v) DMF übergossen und in einem Exsikkator inkubiert. Hydroxylgruppen wurden über Nacht inkubiert, für freie Aminogruppen sind 2 h ausreichend. Anschließend werden die Oberflächen 3 × 5 min mit DMF und 2 × 3 min mit MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und bei 4 °C über Schutzgas bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.3.5 Fmoc-Entschützung

Nach der Anbindung einer Aminosäure und Acetylierung nicht abreagierter funktioneller Gruppen wurden die Oberflächen auf einer ebenen Unterlage in Petrischalen mit einer 20 % Lösung von Piperidin in DMF (v/v) überschichtet. Nach 20 min Inkubation wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und zur Reaktionskontrolle in eine Küvette überführt. Die Extinktion bei 301 nm wurde in Kombination mit Gleichung 1 (siehe Abschnitt 3.2.1) zur Bestimmung des Derivatisierungsgrades verwendet.

5.3.6 Seitenkettenentschützung

Vollständig synthetisierte und funktionalisierte Peptidarrays auf Glasträgern wurden für 30 min in DCM in einer Glaspetrischale gequollen. Anschließend wurde 3 × 30 min mit einer Lösung aus 51 % TFA, 3 % TIBS, 2 % (v/v/v/v) MilliQ-gemindertem Wasser in DCM geschüttelt, 2 × 5 min mit DCM, 5 min mit DMF, 30 min mit einer 5 % DIPEA in DMF Lösung (v/v), 3 × 5 min in DMF und 2 × 3 min in MeOH gewaschen. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

5.4 Immunfärbungen

5.4.1 Passivierung von Oberflächen gegenüber unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen

Um unspezifische Proteinanbindung auf Oberflächen vor einer Immunfärbung zu verhindern, wurden die Arrayträger für 1 h in einer Blocklösung geschüttelt. Verwendet wurden entweder 1% BSA in PBS-T (w/v), LowCross, RB, SB oder 2% PVP in PBS (w/v). Nach der Inkubation wurde die Lösung abgegossen und die Träger 5 min in PBS-T geschüttelt und direkt mit der Färbelösung inkubiert. Übertragene Arrays, die vor dem Übertrag blockiert wurden, wurden danach nicht erneut blockiert.

5.4.2 Passivierung von Gold-beschichteten Oberflächen mit PEG-SH

Mit Gold beschichtete PVDF-Membranen wurden direkt nach Übertrag und Immobilisierung von Peptidarrays in eine 2 mM ethanolische EG₇-SH Lösung für 24 h

inkubiert, 5×2 min mit EtOH und 2×2 min mit Millipore-gefiltertem Wasser gewaschen. Vor der Anfärbung wurde zusätzlich gemäß 5.4.1 blockiert, um Adsorptionen auf der Membranrückseite zu verhindern.

5.4.3 Antikörperfärbung

Die Antikörperlösung wurde unmittelbar vor der Inkubation frisch angesetzt. Für einen Glaträger wurden 10 mL PBS-T mit 10 μ L einer 0,1 mg pro mL konzentrierten Antikörperlösung (Anti-HA) bzw. 10 μ L einer 1 mg pro mL konzentrierten Antikörperlösung (Anti-Flag) und 10 μ L des zum Blockieren verwendeten Puffers versetzt. Die zu färbenden, gemäß 5.4.1 blockierten Träger wurden für mindestens 1 h bis maximal 16 h unter Lichtausschluss inkubiert. Dann wurde 5×5 min mit PBS-T gewaschen, Puffersalze vorsichtig mit Wasser entfernt und mit Argon getrocknet. Bis zur Analyse mit einem Fluoreszenzscanner wurden die Träger unter Argon und Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

5.4.4 Streptavidinfärbung

Die Streptavidinlösung wurde unmittelbar vor der Inkubation frisch angesetzt. Für einen Glaträger wurden 10 mL PBS-T mit 1 μ L einer 1 mg pro mL konzentrierten Streptavidinlösung und 10 μ L des zum Blockieren verwendeten Puffers versetzt. Die zu färbenden, gemäß 5.4.1 blockierten Träger wurden für mindestens 1 h bis maximal 16 h unter Lichtausschluss inkubiert. Dann wurde 5×5 min mit PBS-T gewaschen, Puffersalze vorsichtig mit Wasser entfernt und mit Argon getrocknet. Bis zur Analyse mit einem Fluoreszenzscanner wurden die Träger unter Argon und Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

5.5 Abspaltung von Peptiden mit NH₃

Die zu spaltenden, PEGMA-funktionalisierten Träger wurden trocken in einen Exsikkator mit zwei Abgängen gelegt, wahlweise in einer Petrischale oder einer Inkubationskammer. An einen der Abgänge wurde eine Kautschukblase als Gasreservoir luftdicht angeschlossen. Die Blase und der Exsikkator wurden evakuiert und Ammoniakgas eingeleitet, bis die Blase gefüllt war, ohne dass Druck im Exsikkator aufgebaut wurde. Die Träger wurden für die gewünschte Dauer bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde der Exsikkator geöffnet, um das Ammoniakgas entweichen zu lassen. Die Träger wurden für 10 min unter Vakuum von eventuellen Resten befreit und entweder direkt weiterverwendet oder unter Schutzgas bei 4 °C gelagert.

5.6 Übertrag und Immobilisierung von Peptidarrays

5.6.1 Übertrag auf PVDF-Membranen

Für den Übertrag von Peptidarrays auf funktionalisierte PVDF-Membranen wurden diese in einer Glaspetrischale auf ein Filterpapier des Typs Whatman 595 von **GE Healthcare UK Limited** (Buckinghamshire, UK) mit einem Durchmesser von 110 mm platziert. Das Filterpapier wurde mit dem Transfermedium getränkt (Für Transfer auf Streptavidinmembranen: PBS; Für Transfer auf goldbeschichtete Membranen: 50 % (v/v) TFA in Toluol und der Syntheseträger fest angepresst. Für 30 min wurde der Syntheseträger mit ca. 3 kg beschwert, dann die Membran vorsichtig vom Syntheseträger getrennt. Vor der weiteren Prozessierung wurden die Membranen gereinigt (Transfer auf

Streptavidin: 5 min mit PBS schütteln; Transfer auf Gold: 3 × 5 min Toluol, 2 × 2 min DCM, dann im Luftstrom trocknen und 5 min in PBS schütteln).

5.6.2 Übertrag auf Streptavidin-Glasobjektträger

Der Zielträger wurde vor dem Übertrag 10 min in 10 mL PBS geschüttelt, dann 1 h mit 10 mL SB blockiert, 5 min mit PBS gewaschen. Der gemäß 5.5 prozessierte Syntheseträger mit N-terminalem Biotin wurde 1 min mit DMF gewaschen. Das DMF wurde durch waschen mit MeOH entfernt und der Träger im Argonstrom getrocknet. Die Synthese- und Zielträger wurden in der Transfermaschine übereinander auf der Silikondichtung positioniert. Anschließend wurde der obere Vakuumbreifer vorsichtig angefahren und beide Vakuumbreifer eingeschaltet. Der Syntheseträger wurde angehoben und das Reservoir mit PBS befüllt. Die Oberflächen wurden in Kontakt gebracht und eine Kraft von 7,25 N für die Dauer des Übertrages (10 min bis 2 h) angelegt. Danach wurde der Druck entfernt und das System 20 s relaxiert. Die Träger wurden pneumatisch mit einer Kraft von 1,5 N pro cm² getrennt und der Zielträger entnommen. Vor der Färbung wurde der Zielträger 5 min in PBS gewaschen und direkt mit der Färbelösung inkubiert. Wurde nicht unmittelbar im Anschluss angefärbt, wurde der Zielträger in PBS gelagert. Der Syntheseträger wurde 3 × 10 min mit DMF und 2 × 3 min mit MeOH gewaschen und war danach für eine erneute Ammoniak Inkubation bereit.

5.6.3 Übertrag auf 3-GPS funktionalisierte Träger

Der Syntheseträger mit N-terminalem Cystein wurde nach der Ammoniakinkubation 1 min mit DMF gewaschen. Das DMF wurde durch waschen mit MeOH entfernt und der Träger im Argonstrom getrocknet. Ein nach 5.2.3 hergestellter Zielträger wird in der Transferapparatur vorgelegt und mit 250 µl einer 10 % (m/v) DABCO in DMF Lösung überschichtet. Der Syntheseträger wurde für 2 h angepresst. Dann wurde der Zielträger 2 × 5 min mit DMF und 2 × 2 min mit MeOH gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Dann wurde 5 min mit PBS inkubiert und analog zu 5.4 passiviert und gefärbt. Der Syntheseträger wurde 3 × 10 min mit DMF und 2 × 3 min mit MeOH gewaschen und war danach für eine erneute Ammoniak Inkubation bereit.

6 Literaturverzeichnis

- [1] E. Fischer, E. Otto, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1903**, 36, 2106-2116.
- [2] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154.
- [3] R. B. Merrifield, *Science* **1965**, 150, 178-184.
- [4] R. B. Merrifield, J. M. Stewart, *Nature* **1965**, 207, 522-523.
- [5] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach*, Oxford University Press, New York, NY, USA, **2000**.
- [6] L. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, 5748-5749.
- [7] L. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37, 3404-3409.
- [8] L. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of Organic Chemistry* **1973**, 38, 4218.
- [9] M. Beyer, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2005**.
- [10] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 7829-7832.
- [11] J. Kovacs, G. L. Mayers, R. H. Johnson, R. E. Cover, U. R. Ghatak, *The Journal of Organic Chemistry* **1970**, 35, 1810-1815.
- [12] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Kloose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, 41, 441-445.
- [13] S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447-2467.
- [14] E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron* **1991**, 47, 259-270.
- [15] H. Li, X. Jiang, Y.-h. Ye, C. Fan, T. Romoff, M. Goodman, *Organic Letters* **1999**, 1, 91-94.
- [16] F. Albericio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Nájera, *Organic Preparations and Procedures International* **2001**, 33, 203-303.
- [17] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, 55, 6813-6830.
- [18] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 201-203.
- [19] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, P. Henklein, H. Wenschuh, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 241-244.
- [20] E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *The Journal of Peptide Research* **1999**, 53, 507-517.
- [21] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, 41, 2307-2309.
- [22] A. El-Faham, S. N. Khattab, *Synlett* **2009**, 886-904.
- [23] R. P. Ekins, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1989**, 7, 155-168.
- [24] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767-773.
- [25] R. D. Egeland, E. M. Southern, *Nucleic acids research* **2005**, 33.
- [26] M. J. Heller, A. H. Forster, E. Tu, *Electrophoresis* **2000**, 21, 157-164.
- [27] E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nature Genetics* **1999**, 21, 5-9.
- [28] F. J. Steemers, J. A. Ferguson, D. R. Walt, *Nature Biotechnology* **2000**, 18, 91-94.
- [29] F. J. Steemers, K. L. Gunderson, *Biotechnology Journal* **2007**, 2, 41-49.
- [30] C. N. LaFratta, D. R. Walt, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 614-637.
- [31] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, 289, 1760-1763.

- [32] L. Berrade, A. E. Garcia, J. A. Camarero, *Pharmaceutical Research* **2011**, *28*, 1480-1499.
- [33] R. Volkmer, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1431-1442.
- [34] C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *261*, 1303-1305.
- [35] J. P. Pellois, X. Zhou, O. Srivannavit, T. Zhou, E. Gulari, X. Gao, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 922-926.
- [36] X. Gao, J. P. Pellois, Y. Na, Y. Kim, E. Gulari, X. Zhou, *Molecular Diversity* **2004**, *8*, 177-187.
- [37] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [38] F. Breitling, A. Nesterov, V. Stadler, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff, *Molecular BioSystems* **2009**, *5*, 224-234.
- [39] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angewandte Chemie - International Edition* **2008**, *47*, 7132-7135.
- [40] A. Nesterov, K. König, T. Felgenhauer, V. Lindenstruth, U. Trunk, S. Fernandez, M. Hausmann, F. Ralf Bischoff, F. Breitling, V. Stadler, *Review of Scientific Instruments* **2008**, *79*.
- [41] T. Felgenhauer, V. Stadler, R. Bischoff, F. Breitling, *Peptidchip : Hochkomplexe Peptidarrays auf Mikrochips* **2008**, *14*, 151-153.
- [42] C. Schirwitz, I. Block, K. König, A. Nesterov, S. Fernandez, T. Felgenhauer, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, V. Stadler, F. Breitling, F. R. Bischoff, *Current Protocols in Protein Science* **2009**, 18.12.11-18.12.13.
- [43] F. Märkle, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2014**.
- [44] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, V. Stadler, F. Breitling, *Science* **2007**, *318*, 1888.
- [45] H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, *Biopolymers - Peptide Science Section* **2000**, *55*, 188-206.
- [46] J. D. Young, A. S. Huang, N. Ariel, J. B. Bruins, D. Ng, R. L. Stevens, *Peptide Research* **1990**, *3*, 194-200.
- [47] F. Molina, D. Laune, C. Gougat, B. Pau, C. Granier, *Peptide Research* **1996**, *9*, 151-155.
- [48] A. Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmüller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *Journal of Peptide Research* **1999**, *54*, 319-327.
- [49] B. Ay, M. Streitz, P. Boisguerin, A. Schlosser, C. C. Mahrenholz, S. D. Schuck, F. Kern, R. Volkmer, *Biopolymers - Peptide Science Section* **2007**, *88*, 64-75.
- [50] M. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, *Chemistry - A European Journal* **2000**, *6*, 3196-3203.
- [51] C. Schirwitz, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Heidelberg), **2012**.
- [52] C. Schirwitz, F. F. Loeffler, T. Felgenhauer, V. Stadler, A. Nesterov-Mueller, R. Dahint, F. Breitling, F. R. Bischoff, *Advanced Materials* **2013**, *25*, 1598-1602.
- [53] R. R. Chance, A. H. Miller, A. Prock, R. Silbey, *Fluorescence and energy transfer near interfaces: The complete and quantitative description of the Eu+3/mirror systems, Vol. 63*, AIP, **1975**.
- [54] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello, J. B. Edel, *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7063-7067.
- [55] F. Tausig, F. J. Wolf, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1964**, *14*, 205-209.
- [56] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1964**, *106*, 1-5.

- [57] P. Weber, D. Ohlendorf, J. Wendoloski, F. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85-88.
- [58] P. S. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. Le Trong, T. P. Lybrand, R. E. Stenkamp, *Biomolecular Engineering* **1999**, *16*, 39-44.
- [59] W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86*, 2190-2194.
- [60] M. González, L. A. Bagatolli, I. Echabe, J. L. R. Arrondo, C. E. Argaraña, C. R. Cantor, G. D. Fidelio, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 11288-11294.
- [61] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlén, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 501-510.
- [62] F. Lechhart, *Herstellerauskunft*, PolyAn **2012**.
- [63] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [64] N. Jung, M. Wiehn, S. Bräse, *Topics in Current Chemistry* **2007**, *Vol. 278*, pp. 1-88.
- [65] C. P. Holmes, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 2370-2380.
- [66] C. G. Bochet, *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1* **2002**, *2*, 125-142.
- [67] M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese, C. G. Bochet, *Organic Letters* **2003**, *5*, 1179-1181.
- [68] Y. Wolman, P. M. Gallop, A. Patchornik, A. Berger, *Journal of the American Chemical Society* **1962**, *84*, 1889-1892.
- [69] F. Berst, A. B. Holmes, M. Ladlow, P. J. Murray, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 6649-6653.
- [70] K. Hilpert, D. F. H. Winkler, R. E. W. Hancock, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 1333-1349.
- [71] A. M. Bray, N. J. Maeji, A. G. Jhingran, R. M. Valerio, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 6163-6166.
- [72] A. M. Bray, N. J. Maeji, R. M. Valerio, R. A. Campbell, H. M. Geysen, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 6659-6666.
- [73] A. M. Bray, R. M. Valerio, N. J. Maeji, *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 4411-4414.
- [74] M. Beyer, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff, F. Breitling, V. Stadler, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3505-3514.
- [75] V. Stadler, M. Beyer, K. König, A. Nesterov, G. Torralba, V. Lindenstruth, M. Hausmann, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Journal of Proteome Research* **2007**, *6*, 3197-3202.
- [76] V. Stadler, R. Kirmse, M. Beyer, F. Breitling, T. Ludwig, F. R. Bischoff, *Langmuir* **2008**, *24*, 8151-8157.
- [77] G. J. Wegner, H. J. Lee, R. M. Corn, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 5161-5168.
- [78] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, **2005**.
- [79] J. Striffler, Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2011**.
- [80] B. L. P. Sieber, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 739-742.
- [81] R. G. Kratzer, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2001**.
- [82] J. S. Fletcher, X. A. Conlan, E. A. Jones, G. Biddulph, N. P. Lockyer, J. C. Vickerman, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 1827-1831.
- [83] D. B. J. Vickerman, *IM Publications LLP* **2013**, 1-39.
- [84] C. P. Hunt, C. T. H. Stoddart, M. P. Seah, *Surface and Interface Analysis* **1981**, *3*, 157-160.
- [85] M. Kubicek, G. Holzlechner, A. K. Opitz, S. Larisegger, H. Hutter, J. Fleig, *Applied Surface Science* **2014**, *289*, 407-416.
- [86] M. J. Hearn, B. D. Ratner, D. Briggs, *Macromolecules* **1988**, *21*, 2950-2959.
- [87] M. R. Keenan, V. S. Smentkowski, J. A. Ohlhausen, P. G. Kotula, *Surface and Interface Analysis* **2008**, *40*, 97-106.
- [88] B. J. Tyler, R. E. Peterson, *Surface and Interface Analysis* **2013**, *45*, 475-478.

- [89] E. Szájli, T. Fehér, K. F. Medzihradzsky, *Molecular & Cellular Proteomics* **2008**, *7*, 2410-2418.
- [90] J. Cheng, N. Winograd, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 3651-3659.
- [91] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.
- [92] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 1193A-1203A.
- [93] M. Karas, R. Krüger, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 427-440.
- [94] R. Knochenmuss, *Analyst* **2006**, *131*, 966-986.
- [95] Millipore, Herstellerauskunft, **2012**.
- [96] J. Slootstra, D. Kuperus, A. Plückthun, R. Meloen, *Molecular diversity* **1997**, *2*, 156-164.
- [97] Z. Y. Schutz-Geschwender A., Holt T., McDermitt D., Olive D.M., in <http://www.licor.com/bio/PDF/IRquant.pdf>, **2004**.
- [98] J. Fradelizi, E. Friederich, M. C. Beckerle, R. M. Golsteyn, *BioTechniques* **1999**, *26*, 484-486.
- [99] T. Felgenhauer, Herstellerauskunft, **2013**.
- [100] A. Masch, J. Zerweck, U. Reimer, H. Wenschuh, M. Schutkowski, in *Small Molecule Microarrays, Vol. 669* (Eds.: M. Uttamchandani, S. Q. Yao), Humana Press, **2010**, pp. 161-172.
- [101] M. Steinitz, *Analytical Biochemistry* **2000**, *282*, 232-238.
- [102] L. Shen, A. Guo, X. Zhu, *Surface Science* **2011**, *605*, 494-499.
- [103] Li-Cor, *Operation Manual, Vol. 2013*, **2012**.
- [104] S. Schillo, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie **2014**.
- [105] Y. Hiller, E. A. Bayer, M. Wilchek, in *Methods in Enzymology, Vol. 184*, Academic Press, **1990**, pp. 68-70.
- [106] Y. Pazy, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 30892-30900.
- [107] F. C. Liu, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Heidelberg), **2011**.
- [108] S. Ray, G. Mehta, S. Srivastava, *Proteomics* **2010**, *10*, 731-748.
- [109] C. Lausted, Z. Y. Hu, L. Hood, C. T. Campbell, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2009**, *12*, 741-751.
- [110] K. Länge, S. Grimm, M. Rapp, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *125*, 441-446.
- [111] F. Pröll, B. Möhrle, M. Kumpf, G. Gauglitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, 1889-1894.
- [112] G. Proll, L. Steinle, F. Pröll, M. Kumpf, B. Moehrle, M. Mehlmann, G. Gauglitz, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1161*, 2-8.
- [113] B. Möhrle, K. Köhler, J. Jaehrling, R. Brock, G. Gauglitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *384*, 407-413.
- [114] J. Mehne, G. Markovic, F. Pröll, N. Schweizer, S. Zorn, F. Schreiber, G. Gauglitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 1783-1791.
- [115] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosensors and Bioelectronics* **2000**, *15*, 473-481.
- [116] J. Piehler, *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*, Shaker, **1997**.
- [117] R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, **2008**.
- [118] T. Ware, D. Simon, K. Hearon, T. H. Kang, D. J. Maitland, W. Voit, *Macromolecular Bioscience* **2013**, *13*, 1640-1647.
- [119] A. K. Y. Wong, U. J. Krull, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *383*, 187-200.

- [120] S. E. Brown, A. J. Zuckerman, C. R. Howard, M. W. Steward, *The Lancet* **1984**, 324, 184-187.
- [121] K. L. Parry, A. G. Shard, R. D. Short, R. G. White, J. D. Whittle, A. Wright, *Surface and Interface Analysis* **2006**, 38, 1497-1504
- [122] J. H. Scofield, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, 8, 129-137.
- [123] A. L. Cauchy, *Bulletin des Sciences Mathématiques* **1830**, 14, 6-10.

Lebenslauf

Jakob Immanuel Aron Striffler

Geburtsort: Heidelberg

3/2011 bis 4/2014 Promotion (Abschlussnote: magna cum laude [sehr gut])

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Thema "Replikation von μ -Peptidarrays" am Institut für Mikrostrukturtechnik

5/2010 bis 2/2011 Diplomarbeit (Abschlussnote: 1,1)

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Thema "Effizienz spaltbarer Linker für die kombinatorische Peptidsynthese im Array-Format" in der Arbeitsgruppe Chipbasierte Peptidbibliotheken

10/2003 bis 1/2011 Chemiestudium (Diplom) (Abschlussnote: 1,6)

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

Studium der Chemie, Nebenfach Biophysikalische Chemie

9/1993 bis 7/2002 Abitur (Abschlussnote: 1,5)

Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Eppelheim

Auszeichnung für die beste Gesamtnote im Fach Mathematik

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, sowie die wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Des Weiteren habe ich die Satzung der Universität Karlsruhe zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet.

Jakob Striffler

Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung. Ebenfalls möchte ich allen Kollegen danken, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Zuletzt möchte ich mich bei Dr. Frank Breitling für die hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken.