

Entwicklung einer Mikrofluidik- basierten Eine-Kavität-ein-Peptid- Methode

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Zekun Zhou

1. Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

2. Referentin: Prof. Dr. Anne Ulrich

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2022

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2017 bis Januar 2022 unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Breitling und Prof. Dr. Anne Ulrich am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich mich derzeit in keinem laufenden Promotionsverfahren befinde, und auch keine vorausgegangenen Promotionsversuche unternommen habe. Die elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen Version überein und die Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT ist beim Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) am KIT gesichert.

Karlsruhe, den

Zekun Zhou

Kurzzusammenfassung

Die Synthese verschiedener räumlich getrennter Peptide auf einer Oberfläche („Peptidarrays“), wurde im Laufe der Jahre zunehmend miniaturisiert. Die klassische SPOT-Methode von *Ronald Frank* liefert eine Peptid-Spotdichte bei etwa 5 Peptiden/cm². Die Nano3D-Drucktechnologie von *Löffler et al.* ermöglicht die Herstellung des Peptidarrays mit einer Peptid-Spotdichte von bis zu 17.000 Peptide/cm² und die Verwendung des Peptidlaserdruckers von *Stadler et al.* erhöht die Peptid-Spotdichte auf ca. 40.000 Peptide/cm². Die Peptidspotdichte kann mit lithographischen Verfahren auf 100.000 Peptide/cm² erhöht werden, diese sind jedoch von schlechter Qualität, da diese Verfahren (zu) viele Kupplungszyklen erfordern.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode entwickelt. Die Idee der Methode besteht darin, Peptide mit monodispersen „Aminosäurepartikeln“ in allen 2,79 Mio. Kavitäten eines Objektträgers zu synthetisieren. Die verwendeten Partikel sind jeweils mit einer der 20 proteinogenen Aminosäuren beladen und in jeder Kavität ist nur Platz für ein Partikel. Die Erkennung der 20 Aminosäurepartikel erfolgt mit Fluoreszenzfarbstoffen, sodass mit dem Fluoreszenzscan die Position der Aminosäure in den jeweiligen Kavitäten ausgelesen werden kann. Nach dem alle (2,79 Mio.) Kavitäten eines Glasobjektträgers mit dem Partikelgemisch befüllt sind und ein Kupplungszyklus durchgeführt wurde, werden die Peptide in den Kavitäten gleichzeitig um eine Aminosäureeinheit verlängert. Mit dieser Methode lassen sich schnell und einfach bis zu 248.000 Peptide/cm² in guter Qualität synthetisieren.

Die in der Arbeit gelösten technischen Herausforderungen waren: (I) die Herstellung von monodispersen Aminosäurepartikeln mittels Mikrofluidiktechnologie, (II) die möglichst vollständige Befüllung der (2,79 Mio.) Kavitäten mit Aminosäurepartikeln, (III) die verlässliche Fluoreszenzmarkierung der unterschiedlichen Aminosäurepartikeln, (IV) die Stabilität der eingebetteten aktivierten Aminosäure-Bausteine und (VI) die Synthese von Peptidarrays.

Die hergestellten Peptidarrays mit 2,79 Mio. Zufallspeptiden pro Glasobjektträger sollen zukünftig in Hochdurchsatzverfahren eingesetzt werden, denn dadurch können in kürzester Zeit eine enorme Anzahl unterschiedlicher Proben auf biologisch relevante Bindungen untersucht werden. Beispielsweise könnte damit überprüft werden, ob bei einer Autoimmunkrankheit posttranslational veränderte Peptide von gegebenenfalls vorliegenden Autoantikörpern gebunden werden, ohne dass die Autoantigene dafür bekannt sein müssen. Eine andere Anwendung wäre die Suche nach antibiotisch wirkenden Peptiden, wobei die für

die Synthese verwendeten Kavitäten als extrem miniaturierte Kulturgefäße für Bakterien verwendet werden können.

Abstract

The synthesis of different spatially separated peptides on one surface (“peptide arrays”), has been increasingly miniaturized over the years. The classical SPOT method of *Ronald Frank* delivers a peptide spot density at about 5 peptides/cm². The Nano3D printing technology of *Löffler et al.* enables the peptide array to be produced with a peptide spot density of up to 17,000 peptides/cm², and the use of the peptide laser printer from *Stadler et al.* increases the peptide spot density to about 40,000 peptides/cm². The peptide spot density can be increased to 100,000 peptides/cm² using lithographic processes, but these are of poor quality since these processes require (too) many coupling cycles.

In the present work, the microfluidics-based “one-cavity-one-peptide-method” was developed. The idea of the method is to synthesize peptides using monodisperse “amino acid particles” in all 2.79 million wells of a slide. The particles used are each loaded with one of the 20 proteinogenic amino acids and there is only space for one particle in each cavity. Fluorescent dyes are used to recognize the 20 amino acid particles, so the fluorescence scan can be used to read out the position of the amino acid in each cavity. After all (2.79 million) cavities of a glass slide have been filled with the particle mixture and a coupling cycle has been carried out, the peptides in the cavities are lengthened simultaneously by one amino acid unit. Using this method, up to 248,000 peptides/cm² can be synthesized quickly and easily with good quality.

The technical challenges solved in the thesis were: (I) the preparation of monodisperse amino acid particles using microfluidic technology, (II) the filling of the (2.79 million) cavities with amino acid particles as completely as possible, (III) the reliable fluorescent labeling of the different amino acid particles, (IV) the stability of the embedded activated amino acid building blocks, and (VI) the synthesis of peptide arrays.

The peptide arrays produced, with 2.79 million random peptides per glass slide are to be used in future in high-throughput processes, as they enable an enormous number of different samples to be examined for biologically relevant bindings in a very short time. For example, it could be used to test whether post-translationally modified peptides are bound by any autoantibodies that may be present in an autoimmune disease, without the autoantigens having to be known. Another application would be the search for antibiotic active peptides, whereby the cavities used for synthesis can be used as extremely miniaturized culture vessels for bacteria.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Theoretischer Hintergrund	4
1.1.1 Aminosäure, Peptide und Proteine	4
1.1.2 Chemische Peptidsynthese: Festphasensynthese	6
1.1.3 Orthogonale Schutzgruppen	8
1.1.4 Aktivierung der Aminosäure	11
1.2 Peptidarrays	13
1.3 Herstellung von Mikropartikeln	16
1.4 Fluoreszenzmarkierung	19
2 Ziel der Arbeit	21
3 Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode	23
3.1 Synthesestrategie: Aufbau des Mikrofluidik-basierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode	25
3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln	27
3.3 Herstellung der Aminosäurepartikel	36
3.3.1 Partikelgrößenanpassung	45
3.3.2 Aminosäurebeladung	53
3.3.3 Partikelcodierung	57
3.4 Partikel-Platzierung	78
3.5 Qualitätskontrolle der PEGMA/MMA-Funktionalisierung des Kavitätenträgers	86
3.6 Hydrophobisierung der Stege des Kavitätenträgers	91
3.7 HA- und FLAG-Färbung	95
4 Zusammenfassung und Ausblick	111

5 Experimenteller Teil	116
5.1 Materialien	116
5.2 Chemikalien	119
5.3 Methoden	120
5.3.1 Methode nach <i>Popov</i>	120
5.3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode	121
5.3.3 Oberflächefunktionalisierung mit PEGMA/MMA	124
5.3.4 Hydrophobisierung der Stege des Kavitäträgers	126
5.3.5 Verdünnungsreihe der Fluorophoren	127
5.3.6 Partikelherstellung	128
5.3.6.1 Herstellung der dispersen Phase	128
5.3.6.2 Herstellung der kontinuierlichen Phase	129
5.3.6.3 Partikelherstellungsparameter	129
6 Abkürzung	130
7 Literaturverzeichnis	135
8. Danksagung	140

1 Einleitung

Proteine gehören zu den Hauptbestandteilen einer Zelle und spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen dieser Zelle.^[1] Beispielsweise sind die Protein-Protein-Interaktionen (PPI) nicht nur für die meisten Prozesse (Signaltransduktion, Zellzyklus, Metabolismus usw.) innerhalb einer Zelle verantwortlich, sondern sorgen auch für die Homöostase des Organismus. Eine Störung dieser Interaktion in der Zelle kann Krankheiten auslösen.^[2] Beispielsweise sind in Krebszellen PPIs oft gestört, was zu unkontrolliertem Zellwachstum und einer erhöhten Durchdringungsfähigkeit des umliegenden Gewebes führt.^[3]

Die Forschung im Bereich der PPI ermöglicht den Zugang zu diesen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene. Die Proteinfragmente, wie die niedermolekularen Peptide, die den PPI im Verlauf einer Krankheit beeinflussen, können ein gutes Werkzeug sein, um den Krankheitsprozess besser zu verstehen. Die daraus resultierenden Erkenntnisse bilden eine Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente, die PPIs beeinflussen (z.B. eine Signaltransduktionskaskade modifizieren).^[4]

Eine weitere interessante Eigenschaft von Proteinen besteht darin, dass einige kurzkettige Proteine (hier als Peptide bezeichnet) antibiotische Wirkungen haben. Diese antimikrobiellen Peptide (AMP) kommen in fast allen mehrzelligen Organismen als Teil des angeborenen Immunsystems vor.^[5-6] Die AMP bestehen im Allgemeinen aus 15-45 Aminosäuren und sind zytotoxisch für eine breite Palette von Pathogenen.^[7] Der übermäßige Einsatz von Antibiotika, vor allem in Krankenhäusern, in der Landwirtschaft und der Tierhaltung, ist ein Problem: Zunehmende Resistenzen gegen alle gängigen Antibiotika gefährden den Fortschritt der Medizin und die Suche nach neuen Antibiotika ist zeitaufwändig.^[8-11]

Interessanter Weise zeigen kationische AMP (cAMP) eine gute antibiotische Wirksamkeit gegen multiresistente Bakterien. Die cAMP können initial über *Coulomb*-Wechselwirkung mit anionischen Bakterienmembranen interagieren, worauf sich anschließend als ein hydrophober Bestandteil in die Membran einlagert. Diese Wechselwirkung stört die Membranintegrität und führt somit zur Zellyse.^[12-14] Dieser Wirkmechanismus ist von großer Bedeutung, da die Bakterien gegen diese grundlegende Wechselwirkung nur schwer eine Resistenz entwickeln.^[5]

Um unerforschte PPIs zu identifizieren und zu charakterisieren oder nach neuen antibiotischen Peptiden zu suchen, werden Peptidarrays verwendet. Der Vorteil von Peptidarrays besteht darin, dass eine minimale Probenmenge erforderlich ist, um biologische Wechselwirkungen wie die Kartierung von Epitopen und Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[15-17] In der Wissenschaft wurden Peptidarrays bereits von *Schreiber et al.*^[17] und *Snyder et al.*^[18] erfolgreich eingesetzt, um PPI zu untersuchen, Enzymaktivitäten auf bestimmten Substraten zu analysieren und kleine Peptid-basierte Bindemoleküle für Protein-Targets zu finden.^[15, 17-18] *Hilpert et al* haben viele lineare Varianten des zyklischen 12meren antibiotischen Peptids Bactenecin hergestellt, um so neue antibiotische Peptide zu finden.^[19-20] Darüber hinaus können Peptidarrays als Breitbandnachweis für unbekannte Bakterienproben verwendet zu werden.^[20-21]

Zur Herstellung von Peptidarrays stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung.^[22-24] Je höher die Spotdichte auf dem Träger ist, desto mehr Peptide stehen für die Untersuchung der Probe zur Verfügung und umso weniger Probe wird für die Untersuchungen benötigt. Die klassische SPOT-Methode verwendet chemisch aktivierte Aminosäurebausteine zum Aufbau von Peptidarrays, wobei die Peptide auf dem Array schichtweise mit einer Spotdichte von bis zu 5 Spots/cm² durch manuelles Pipettieren erreicht werden.^[15, 25] Bei der automatisierten SPOT-Methode, z.B. Tropfen auf Anforderung (Drop-On-Demand: DOD) Tintenstrahldrucken, steigt die Spotdichte auf 4.000 Spots/cm².^[15, 26] Das partikel-basierte kombinatorische *peptide microarray* steigert die Spotdichte auf 40.000 Spots/cm².^[25] Nano3D-Drucktechnologie von *Löffler et al.* ermöglicht die Herstellung des Peptidarrays mit einer Peptid-Spotdichte von bis zu 17.000 Peptide/cm² und die Verwendung des Peptidlaser-druckers von *Stadler et al.* erhöht die Peptid-Spotdichte auf ca. 40.000 Peptide/cm².^[27-28]

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode (Abbildung 1) zur Herstellung eines hochdichten Peptidarrays auf Basis der bisherigen Methode optimiert und weiterentwickelt.^[29-30]

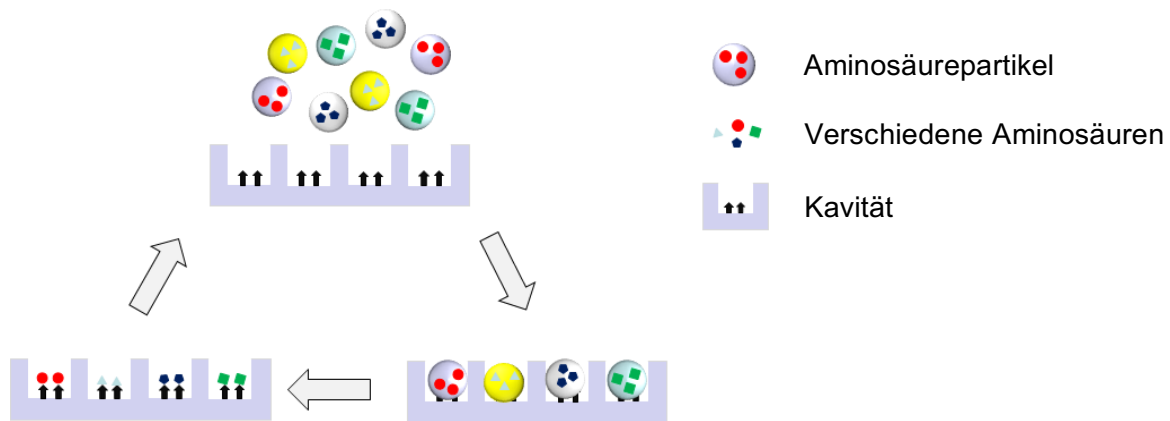


Abbildung 1: schematische Darstellung der Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode

Die bisherige Methode mit den trockenen Aminosäurepartikeln brachte unüberwindbare technische Hürden mit sich: (I) die Aminosäurebelastung am Partikel war gering und die Aminosäure wurde am Partikel adsorbiert. (II) Die trockenen Aminosäurepartikel wurden durch Einreiben in die Kavitäten starken mechanischen Belastungen ausgesetzt. (III) Dies führte zu einem Materialaustausch (Aminosäure und Fluoreszenzfarbstoff) zwischen verschiedenen Aminosäurepartikeln. (IV) die Fluoreszenzmarkierung der unterschiedlichen Aminosäurepartikel waren inhomogen und (V) die Partikel haften am Rand der Kavitäten, sodass die Aminosäure nach der Mobilisierung an die Syntheseoberfläche kuppeln kann.^[29-30]

Mit der neu entwickelten Mikrofluidik-basierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode konnten die aufgezählten technischen Hürden umgangen werden, sodass erstmals qualitativ hochwertig hochdichte Peptidarrays mit 248.000 Spots/cm² hergestellt werden konnten.

1.1 Theoretischer Hintergrund

1.1.1 Aminosäure, Peptide und Proteine

Aminosäuren gehören zu den wichtigen Biomolekülen und sind Grundbausteine für Peptide und Proteine und erfüllen lebenswichtige Aufgaben in jeder Zelle.^[31] Nach derzeitigem Kenntnisstand wurden in der Natur mehr als 500 Aminosäuren entdeckt, von denen nur 20 proteinogen sind.^[32] Die Grundstruktur der Aminosäure (Abbildung 2) besteht aus einer Carboxylgruppe (C-Terminus), einer Aminogruppe (N-Terminus) und einer individuellen Seitenkette (R).^[33] Die Seitenkette gibt die chemische Eigenschaft der Aminosäure vor. Die Aminosäuren sind die Grundbausteine des Peptids. Proteine sind Verbindungen, die aus einer oder mehreren Peptidketten bestehen.^[34]

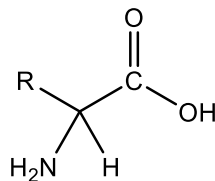


Abbildung 2: Allgemeine Strukturformel der Aminosäure

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass Peptide und Proteine durch die Verknüpfung von Aminosäuren über eine Peptidbindung hergestellt werden können (Abbildung 3).^[34-35] Die Carboxylgruppe reagiert mit der Aminogruppe, unter Abspaltung von Wasser **1** wird ein Peptid hergestellt.

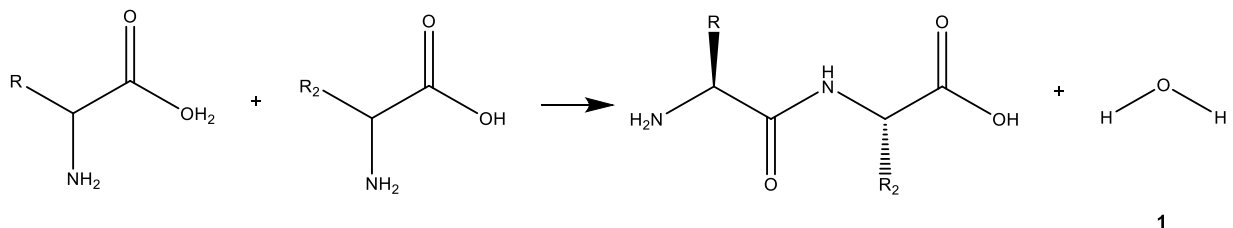


Abbildung 3: schematische Darstellung der Bildung einer Peptidbindung unter Abspaltung von **1**

1.1.1 Aminosäure, Peptide und Proteine

Die Proteinbiosynthese findet in der Zelle unter Verwendung von Enzymen statt. Bis auf Glycin (Gly) besitzen alle proteinogenen Aminosäuren ein chirales Zentrum und nur L-Aminosäuren werden für die biologische Proteinsynthese verwendet.^[36]

In der Natur werden die Proteine stets vom N- zum C-Terminus in den Ribosomen aufgebaut. Jedes Protein wird aus einer spezifischen Sequenzen aus Aminosäure aufgebaut. Diese Kettensequenz eines Proteins wird als Primärstruktur bezeichnet (Abbildung 4). Bis zu 10 Aminosäuren in einer Kette werden als Oligopeptide bezeichnet. Enthalten die Aminosäureeinheiten bis zu 50 in einer Kette, dann sind Polypeptide entstanden und eine noch längere Kette sind Proteine. Die räumliche Anordnung und die gegenseitige Wechselwirkung von Aminosäuren innerhalb derselben Kette führt zur Faltung der Kette zu einer dreidimensionalen Struktur („Tertiärstruktur“), wobei α -Helices und β -Faltblätter die wichtigsten Sekundärstrukturen innerhalb dieser Tertiärstruktur sind. Die dreidimensionale Anordnung mehrerer Proteine wird als Quartärstruktur bezeichnet.^[34, 36]

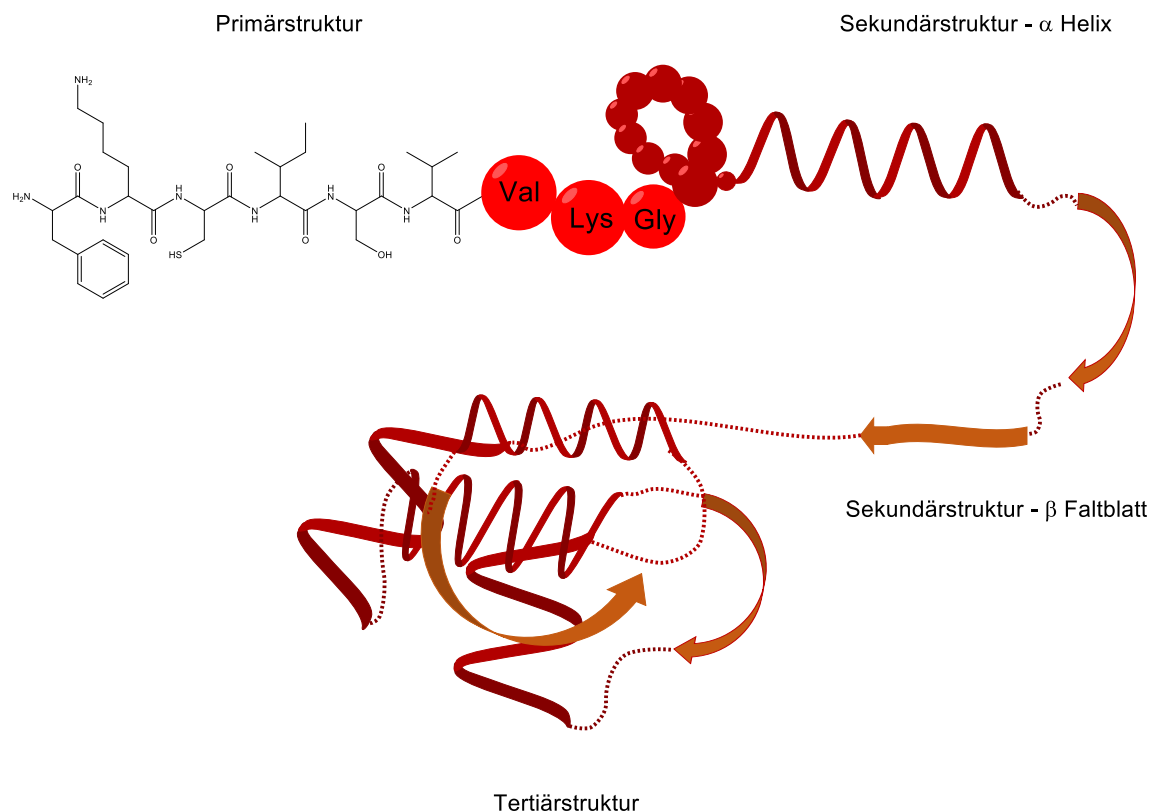


Abbildung 4: schematische Darstellung von Proteinstrukturen ^{modifiziert nach [37]}

1.1.2 Chemische Peptidsynthese: Festphasensynthese

Seitdem Peptide in der Medizin zur Behandlung eingesetzt werden, haben die Peptide in der Wissenschaft immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das erste chemisch synthetisierte Peptid, Glycylglycin, ein Meilenstein in der Peptidchemie, wurde 1901 von *Fischer* und *Fourneau* hergestellt.^[38] 1963 revolutionierte *Merrifield* die Peptidsynthese mit der Festphasensynthese und wurde 1984 dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.^{[39] [40]} Der Einsatz der neuen Methode vereinfacht die Syntheseprozesse, minimiert den zeitlichen Aufwand und erhöht die Ausbeute an Peptiden.^[41]

Dabei wird als Festphase zumeist ein Polystyrolharz verwendet.^[42] Auf diesem Harz befindet sich ein Linker, der die spätere Peptidsequenz mit der Festphase kovalent verbindet. Nachdem die Peptidsequenz vollständig synthetisiert ist, kann die kovalente Bindung des Linkers und dem fertigen Peptid gespalten und so das Zielmolekül freigesetzt werden.^[42] Um eine bessere Lösungsmittelkompatibilität zu erreichen, kann am Harz ein Abstandshalter (*Spacer*) angebracht werden, um den Abstandshalter zwischen Harz und Peptid weiter zu erhöhen.^[42]

Die Aminosäure wird kovalent an den Linker oder Abstandshalter des Harzes gebunden und die Peptidkette wird durch eine Reihe von Additionszyklen verlängert (Abbildung 5). Im Gegensatz zur Biosynthese werden die Peptide vom C- zum N-Terminus mit Aminosäuren aufgebaut. Die Nutzung von orthogonalen Schutzgruppen ist zwingend notwendig, um die unerwünschte Nebenreaktion auszuschließen. Nach der Entschützung werden die Aminosäure-Harz-Komplexe mit einer anderen Aminosäure in Lösung umgesetzt. Der Entschützungs- und Aminosäureadditionsvorgang wird wiederholt, bis die gewünschte Kettenlänge erreicht ist. Zum Schluss wird das fertige Peptid vom Träger freigesetzt.^[43]

1.1.2 Chemische Peptidsynthese: Festphasensynthese

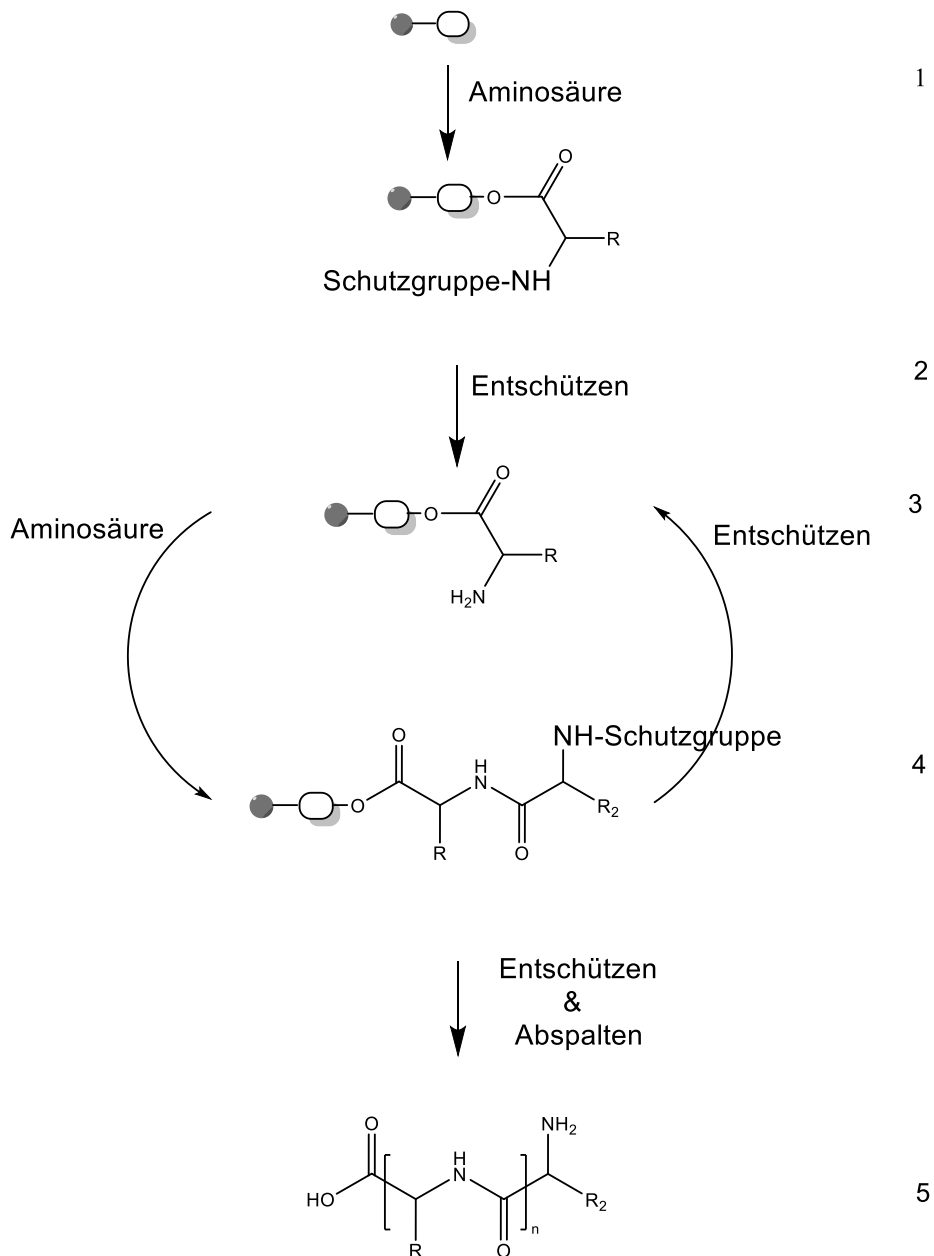


Abbildung 5: schematische Darstellung der Festphasensynthese^[43-44] 1. Anknüpfung der Aminosäure an das Harz; 2. Entfernung der Schutzgruppe von; 3. Verknüpfung einer weiteren Aminosäure über eine Peptidbindung; 4. Der Zyklus aus Entfernung der Schutzgruppe und Verknüpfung einer weiteren Aminosäure wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Kettenlänge erreicht ist; 5. Entschützen der Schutzgruppe an der Peptidkette und die Abspaltung des Produkts vom Harz

1.1.3 Orthogonale Schutzgruppen

Bei der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese spielte der Einsatz der Schutzgruppenchemie eine wichtige Rolle. Um Nebenreaktionen zu verhindern, müssen die funktionellen Gruppen der Aminosäure blockiert werden. Seit *Bergmann* und *Zervas* die erste Nutzung der reversiblen Schutzgruppe für den N-Terminus der Aminosäure, die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Cbz), in der Peptidsynthese veröffentlicht haben, ist die Nutzung von Schutzgruppen in der chemischen Peptidsynthesen unverzichtbar (Abbildung 6).^[45] Der N-Terminus von Glycin **2** wurde in diesem ersten Verfahren mit Benzyloxycarbonylchlorid **3** unter Abspaltung von Salzsäure (HCl) geschützt, um N-Benzyloxycarbonylglycin **4** zu bilden. Die Entschützung erfolgt durch ein Gemisch aus Bromwasserstoff (HBr) und Essigsäure (HOAc), wobei Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Benzylbromid **5** abgespalten werden.

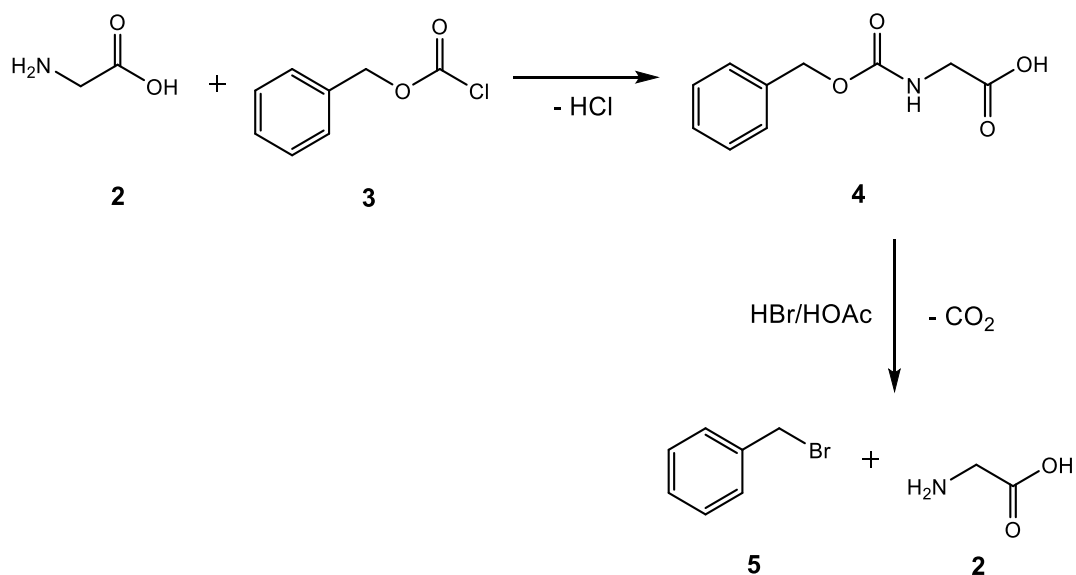


Abbildung 6: schematische Darstellung vom Schützen und Entschützen des N-Terminus der Aminosäure **2**

Die Schutzgruppe der Seitenkette sollte nicht unter den gleichen Bedingungen wie die der α -Aminoschutzgruppe abspaltbar sein. Deshalb ist die Einführung der basenlabilen Schutzgruppe 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) ein Meilenstein in der Peptidsynthese. Damit können die Seitenkette und die α -Aminogruppe der Aminosäure separat („orthogonal“) geschützt und entschützt werden.^[46]

1.1.3 Orthogonale Schutzgruppen

Die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe wird oft verwendet, um die α -Aminogruppe der Aminosäure zu schützen. Bei der Entschützung wird das Fmoc-geschützte Glycin **6** mit Piperidin **7** entschützt, unter Abspaltung von Dibenzofulven **8**, Kohlenstoffdioxid **9** und **2** (Abbildung 7).^[47] Das resultierende **8** reagiert mit **7** zum Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **10**. Dieses Addukt kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 301 nm detektiert und per *Lambert-Beer-Gesetzes* quantifiziert werden.^[48]

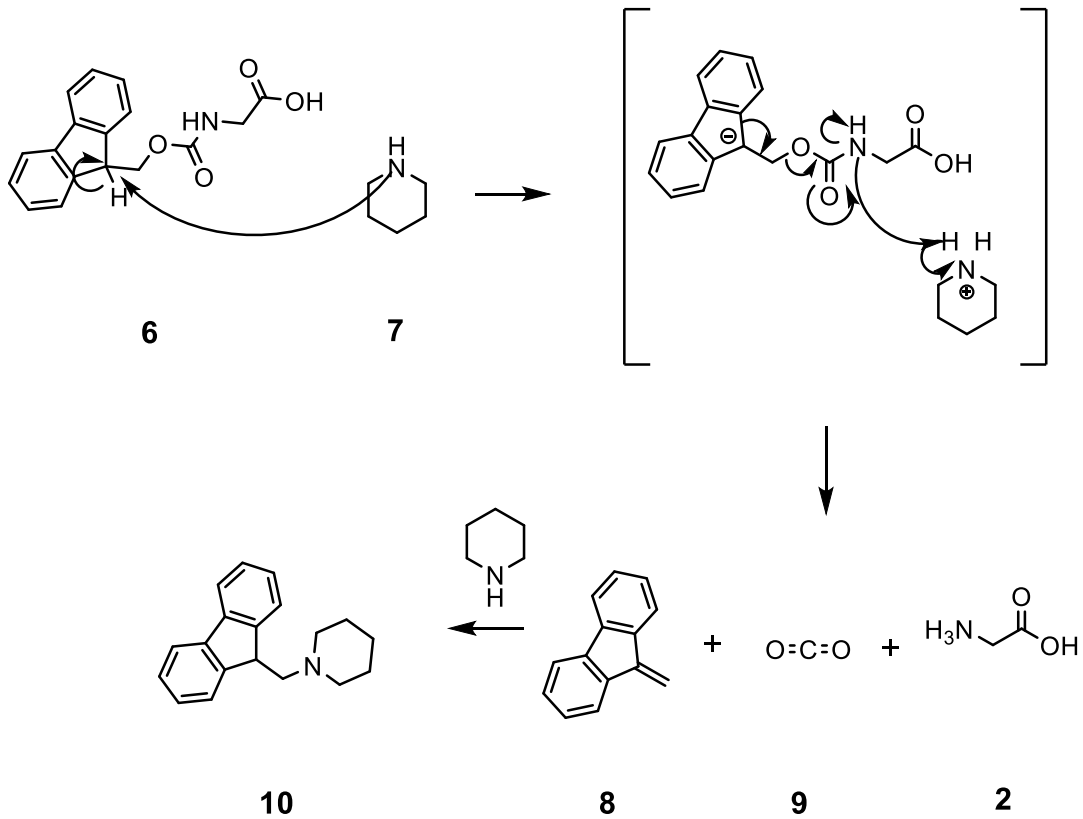
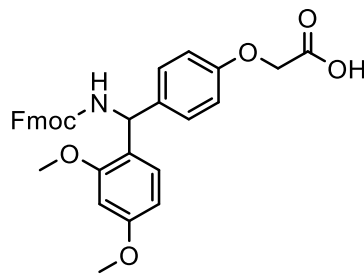


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus von der Fmoc-Entschützung mit Piperidin

1.1.3 Orthogonale Schutzgruppen

Unter Verwendung der Fmoc-Gruppe für das Kettenwachstum steht die säurelabilen Schutzgruppen wie *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) für die Seitenketten zur Verfügung.^[49] Diese unabhängige Entschützung der Schutzgruppen wird als orthogonale Schutzgruppenstrategie bezeichnet. Die Verwendung von säurelabilen „Linkern“, wie „*Rink*-Linker“ **11** (Abbildung 8), in der Festphasensynthese bringt weiteren Vorteilen. Am Ende der Synthese kann im sauren Medium gleichzeitig mit der Entschützung der Seitenkette auch die Freisetzung des Peptids erfolgen.^[34, 50-52]



11

Abbildung 8: Strukturformel des „*Rink*-Linkers“ **11**^[52]

1.1.4 Aktivierung der Aminosäure

Die einfache Verknüpfung zweier Aminosäuren über eine Peptidbindung ohne zusätzliche Aktivierung ist zwar bei einer Temperatur knapp unter 200°C unter Wasserabspaltung möglich, solche harschen Reaktionsbedingungen sind für den Aufbau von Proteinen nicht geeignet.^[53] Nebenreaktionen könnten auftreten und die hergestellten Proteinen werden denaturiert.^[54] Um milde Reaktionsbedingungen für die Synthese zu ermöglichen, wurden speziell hierfür Kupplungsreagenzien entwickelt. Abbildung 9 zeigt Beispiele von Kupplungsreagenzien für die Peptidbindung: *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) **12** oder *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) **13** und Pentafluorphenyl-Ester (OPfp) **14**.^[55-56]

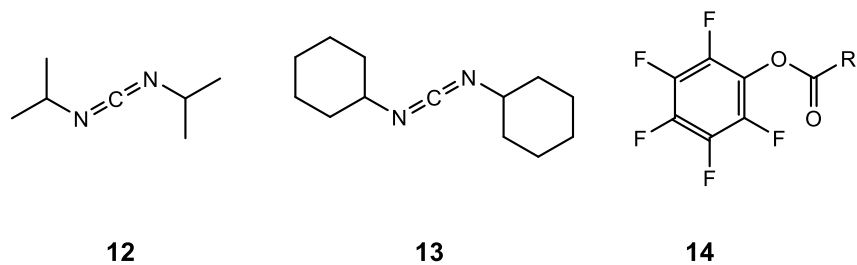


Abbildung 9: Strukturformel von **12**, **13** und **14**

Im Allgemeinen erfolgt die Aktivierung der Aminosäure mit **12** oder **13** (Abbildung 10) unter Bildung von *O*-Acylisoharnstoff **15**. Der reaktive **15** kann nun mit einer weiteren Aminosäure **2** eine Peptidbindung **16**, unter Abspaltung von *N*-Acylisoharnstoff **17** (welche durch Hydrolyse zu Harnstoff **18** reagiert), eingehen.^[57]

1.1.4 Aktivierung der Aminosäure

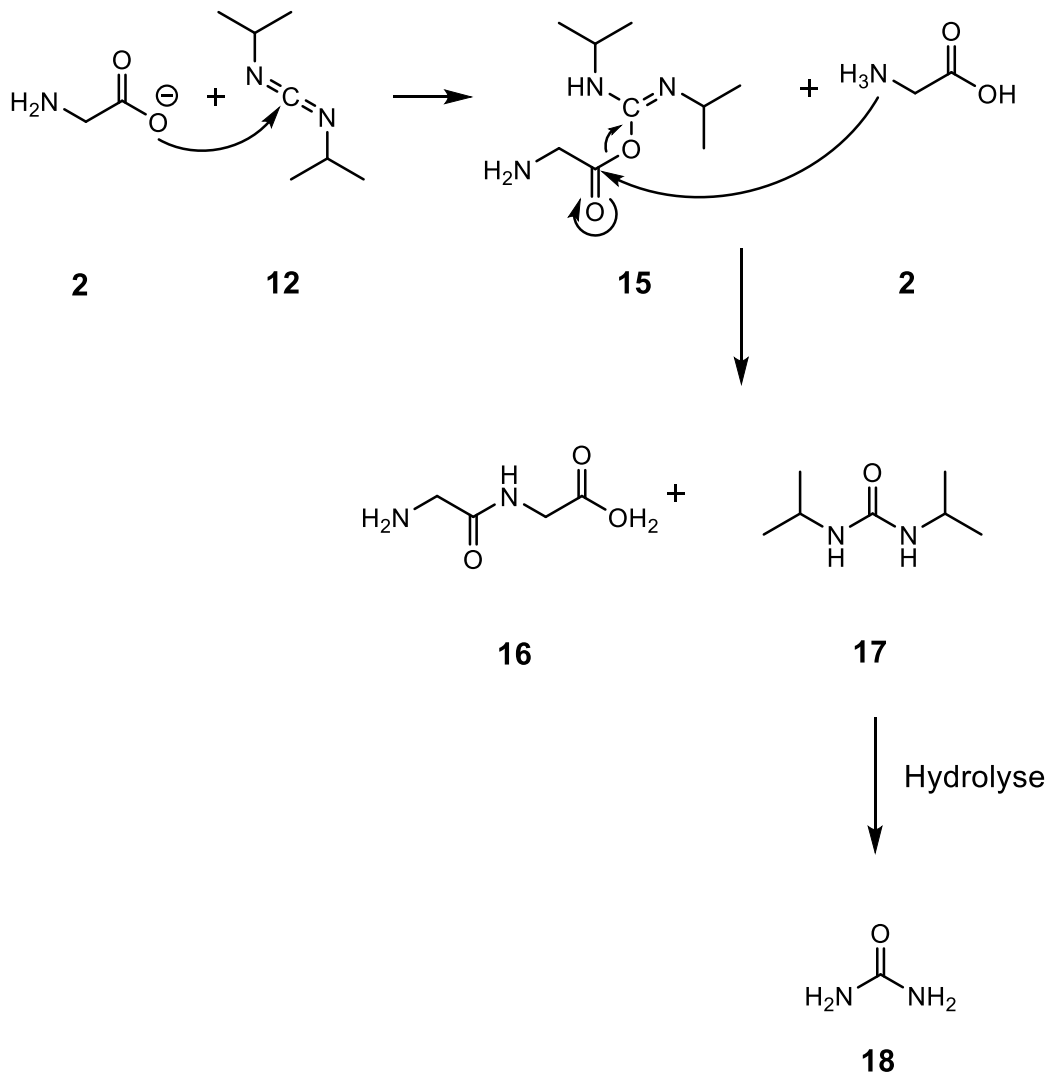


Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Bildung der Peptidbindung mittels **12**

Eine der anderen Methoden zur Aktivierung der Aminosäure ist die Verwendung eines Aktivesters. Diese Methode hat den Vorteil, dass der Aktivester an die Aminosäure verknüpft ist. Diese aktivierte Aminosäure kann direkt mit der Aminogruppe der nächsten Aminosäure reagieren.^[58] Ein bekanntes Beispiel ist die Aktivierung mit dem OPfp-Ester. Die so aktivierten Aminosäuren weisen eine hohe Reaktivität auf und sind in der Lage, schnell eine Peptidbindung mit hoher Ausbeute herzustellen.^[58]

1.2 Peptidarrays

Merrifield's Festphasensynthese ist die bekannteste Methode, um Peptide chemisch aufzubauen.^[15] Die Peptide nach *Merrifield* sind qualitativ hochwertig und weisen wenig Verunreinigungen auf.^[15] Für die Herstellung von Peptiden mit einer großen Vielfalt von Sequenzen ist diese Methode wegen des hohen Kosten- und Zeitaufwandes aber nicht wirtschaftlich.^[15]

Peptidbibliotheken wurden erstmals mit der von *Ronald Frank* entwickelten SPOT-Methode hergestellt.^[59-60] Dabei wird die von *Merrifield* erfundene Festphasensynthese parallelisiert, indem die 20 verschiedenen, chemisch aktivierten Aminosäure-Bausteine kombinatorisch auf eine Cellulosemembran aufgespottet werden („*in situ*-Synthese“).^[59-60] Mit dieser Methode werden auf einem Träger gleichzeitig viele verschiedene Peptide in den jeweiligen Spots mit minimalen Mengen an Reagenzien hergestellt, dadurch sinkt der Zeit- und Arbeitsaufwand für die Synthese.^[15, 61-62] Diese bahnbrechende Erfindung von *Ronald Frank* ermöglichte die Entwicklung vieler Varianten dieses parallelisierten Syntheseverfahrens.^[16]

Bei der SPOT-Synthese werden Reagenzlösungen tropfenweise auf eine Membran pipettiert (Abbildung 11), so dass örtlich voneinander abgegrenzte „Reaktionsräume“ entstehen.^[16] Das jeweilige Tröpfchen enthält die Reagenzien, die für eine Peptidkettenverlängerung notwendig sind. Durch gezieltes Aufbringen von Reagenzlösungen auf die Membran können Peptide in unterschiedlichen Längen und Sequenzen hergestellt werden.

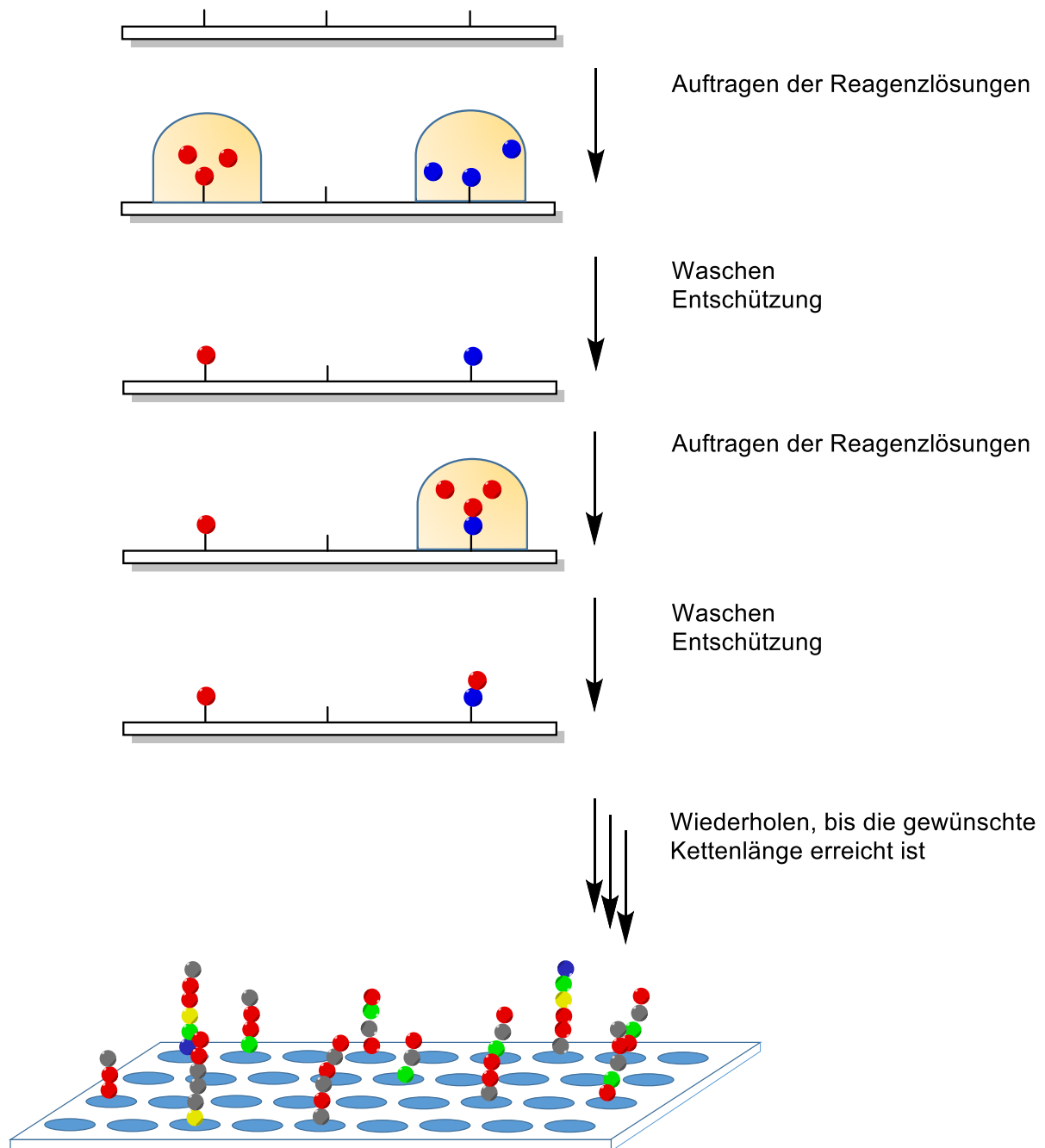


Abbildung 11: schematische Darstellung der SPOT-Methode; Reagenzlösungen werden tropfenweise auf die Membran pipettiert.

Eine weitere Methode zum Aufbau des Peptidarrays ist die feststoffbasierte Synthesemethode, die in der Gruppe Breitling entwickelt wurde.^[27] Die Aminosäurebausteine werden nicht als Tröpfchen auf den Träger aufgebracht, sondern in ein bei Raumtemperatur festes Material („festes Lösungsmittel“) eingebettet. Dieses „feste Lösungsmittel“ wird mit dem Laser strukturiert, sodass auf der Oberfläche des Trägers Spots im Mikrometerbereich erzeugt werden. Beim Erhitzen des Trägers wird das feste Lösungsmittel flüssig und die darin

enthaltenen Aminosäure-Bausteine können an die Oberfläche des Trägers diffundieren und dort mit freien Aminogruppen reagieren. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die empfindlichen Chemikalien weitgehend vor Umwelteinflüssen geschützt sind und die Größe der Peptidspots Mikrometer beträgt. Weitere Methoden wie das Druck des Peptidarrays mit einem Laser Drucker oder mit einem 2D Laser-Scanning-System wurde ebenfalls in diesem Arbeitskreis entwickelt.^{[27][28]}

1.3 Herstellung von Mikropartikeln

Um die Effizienz der Wirkstoffe zu maximieren, müssen die Wirkstoffe geschützt und gezielt an den Zielort gebracht werden. Der Verwendung von Partikeln als Träger für solche Wirkstoffe wird zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt.^[63-64] Partikel in Mikrometerdimension haben sich als hervorragende Materialien für viele praktische Anwendungen wie das partikelbasierte Peptidarray, Arzneimittelabgabe (*drug delivery*) und Katalyse erwiesen.^[65-67] Um die Qualität der oben genannten Anwendungen zu gewährleisten, müssen die verwendeten Partikel die gleichen physikalischen und geologischen Eigenschaften aufweisen. Dies bedeutet, dass die hergestellten Mikropartikel monodispers sein sollten. Die konventionellen Synthesemethoden wie Emulsionspolymerisation, Dispersionspolymerisation und Sprühtrocknung können Partikel in großen Mengen herstellen, jedoch mit einer großen Polydispersität.^[68-69] Der moderne Mikrotröpfchengenerator, bei dem Partikel in Form von Mikrotröpfchen erzeugt und dann in feste Partikel überführt, ist die Methode der Wahl, um monosphärische Partikel herzustellen.^[70-71]

Abbildung 12 zeigt die schematische Darstellung von drei gängigen Tropfengeneratoren. Dabei wird eine Emulsion aus zwei Phasen, einer kontinuierlich fließenden Phase und einer dispersen Phase hergestellt.^[69, 72] In Abbildung 12a. ist der T-Übergang (auch *T-Junction*) zu sehen. Die disperse Phase wird im rechten Winkel zu der kontinuierlichen Phase hinzugefügt. Abbildung 12b. zeigt die Struktur eines alternativen Tropfengenerators für den gemeinsamen Fluss (*Co-Flow*). Die disperse Phase fließt parallel und mittig in der kontinuierlichen Phase. Die Tröpfchenbildung erfolgt wegen dem Druckunterschied der beiden Phasen direkt am Kanalende der dispersen Phase. Die Strömungsfokussierung (*Flow-Focusing*) ist die dritte Möglichkeit um Tröpfchen zu formen (Abbildung 12c). Am Schnittpunkt des Kanals treffen die kontinuierliche Phase und die disperse Phase aufeinander, wobei die Druckbedingungen der beiden Phasen die disperse Phase zu Tröpfchen formen.^[73]

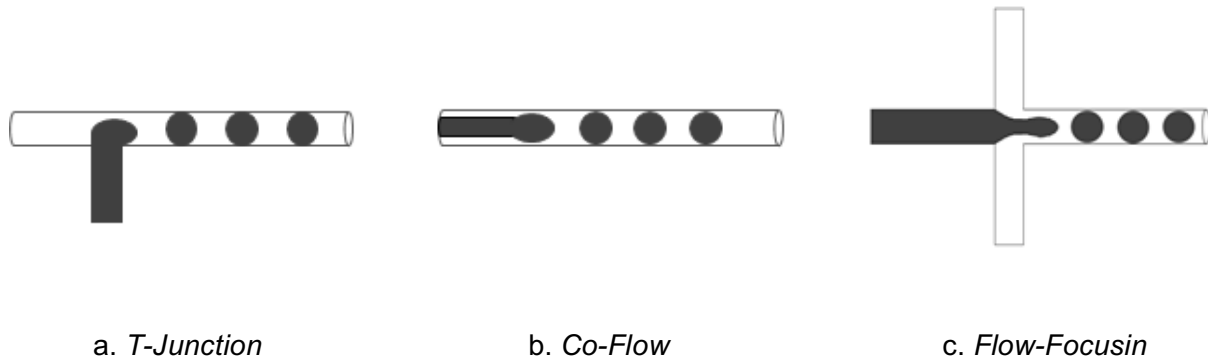


Abbildung 12: schematische Darstellung von drei gängigen Strukturierungen der Tropfengeneratoren: a. *T-Junction*, b. *Co-Flow*, c. *Flow-Focusing*; Die disperse Phase wird in der kontinuierlichen Phase dispergiert (schwarz), um Tröpfchen zu bilden

In all diesen Mikrotröpfchengeneratoren werden zwei nichtmischbare Flüssigkeiten verwendet, um eine Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-Emulsion herzustellen. Hierbei repräsentieren Öl und Wasser die Polarität der jeweiligen Phasen (Öl für unpolares/schwach polares Lösungsmittel, Wasser für polares Lösungsmittel). Das Öl-in-Wasser (O/W)-System liegt vor, wenn die Ölphase in einer kontinuierlichen wässrigen Phase dispergiert ist und umgekehrt.^[74] Nach der Bildung des Mikrotröpfchens muss das Lösungsmittel entfernt werden, damit sich die gewünschten Mikropartikel bilden. Dabei spielt die Diffusion des Lösungsmittels in der dispersen Phase eine wichtige Rolle. In einem O/W-System muss das organische Lösungsmittel aus den Tröpfchen in die wässrige Phase diffundieren, um die Bildung von Partikeln zu ermöglichen (Abbildung 13).^[75-76]

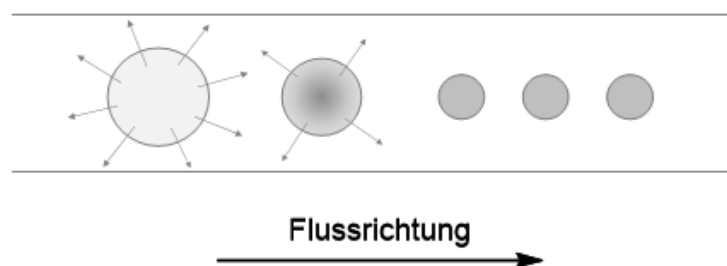
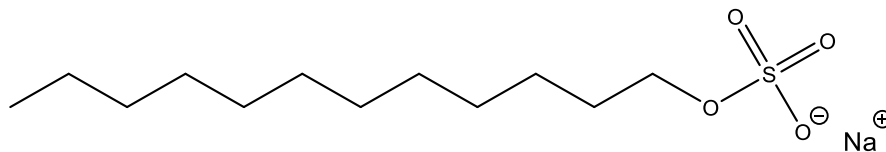


Abbildung 13: schematische Darstellung des Lösungsmitteldiffusionsprozesses

Die hergestellten Tröpfchen schrumpfen mit der Zeit, bis sie ihre endgültige Größe erreichen. Während dieses Schrumpprozesses können die Tröpfchen miteinander fusionieren. Nach der *Ostwald-Reifung* haben die kleinen Tröpfchen einen höheren *Laplace-Druck* als die größeren

Tröpfchen, sodass die kleinen Tröpfchen dazu neigen, mit den größeren Tröpfchen zu fusionieren.^[77-78] Um der Fusionierungsneigung der hergestellten Tröpfchen entgegenzuwirken, werden Emulgatoren, also Tenside, dem System hinzugefügt. Tenside sind amphiphile Substanzen, die sowohl eine hydrophile als auch eine hydrophobe Eigenschaft haben. Ein Beispiel dafür ist Natriumdodecylsulfat (SDS) **19**. Das ist ein Molekül (Abbildung 14), das aus einer polaren Sulfatgruppe (Kopfteil) und einer langen unpolaren Kohlenwasserstoffkette (Schwanzteil) besteht.^[79] Da die Sulfatgruppe des SDS eine Ladung trägt, stoßen sich die mit SDS ummantelt Mikropartikel gegenseitig ab, was eine Aggregation der gebildeten Partikel weitgehend verhindert.



19

Abbildung 14: Strukturformel von **19**

An der Grenzfläche zwischen der Ölphase und der wässrigen Phase werden Tenside adsorbiert, wodurch die freie Energie der Phasengrenze und der Oberflächenspannung verringert werden.^[80-81] Abbildung 15 zeigt die schematische Darstellung von mit Tensid stabilisierten Tröpfchen. Der hydrophile Bereich des Tensids ist immer zum polaren Medium gerichtet, der hydrophobe Teil verbleibt auf der Seite des unpolaren Mediums.^[80-81]

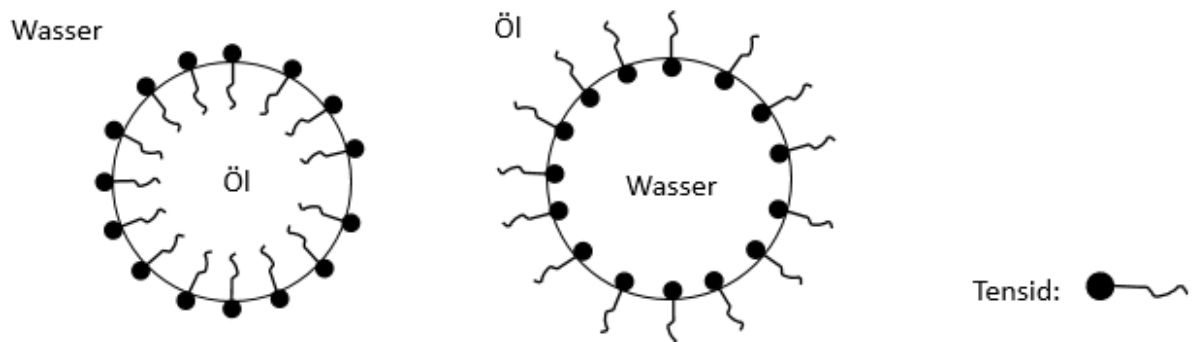


Abbildung 15: schematische Darstellung von der Adsorption von Tensid an der Grenzfläche zwischen der Öl- und Wasserphase^{modifiziert nach [81]}

1.4 Fluoreszenzmarkierung

Die Verwendung von Fluorophoren zur Visualisierung von Proben findet in verschiedenen Bereichen zunehmend Anwendung. In der Biologie können Fluorophore zur Färbung der Zelle verwendet werden, um beispielsweise Enzymaktivitäten nachzuweisen und neue Erkenntnisse über zelluläre Prozesse zu gewinnen.^[82-84] Die Methode der Fluoreszenzmarkierung wird für die Färbung von Arrays verwendet, um die Proben zu analysieren und zu charakterisieren.^[85-86] Bei der Färbung von Peptidarrays mit Patientenserum werden z.B. mit Fluorophoren markierte Antikörper benutzt, um die Anwesenheit des (Peptid)Antigenspots auf dem Array sichtbar zu machen.^[87] In der Chemie verwendet *Kodadek et al* die Fluoreszenzmarkierung zur Qualitätskontrolle der chemische Synthese.^[88] In der Geologie konnte mit den Fluorophoren die Versickerung von Donau nachzuweisen.^[89-90]

Das Fluoreszenzphänomen tritt auf, wenn das Molekül durch Absorption eines Photons in einen Singulett angeregten Zustand S_1 übergeht und dann durch spontane Emission eines Photons mit geringerer Energiedichte bzw. größerer Wellenlänge in dessen Singulett Grundzustand S_0 zurückkehrt (Abbildung 16).^[91] Eine typische Fluoreszenzemissionsrate beträgt 10^8 s^{-1} , bei einer Lebensdauer von ca. 10 ns.^[92] Die Emissionsphotonen können mit Fluoreszenz-mikroskopen nachgewiesen werden.

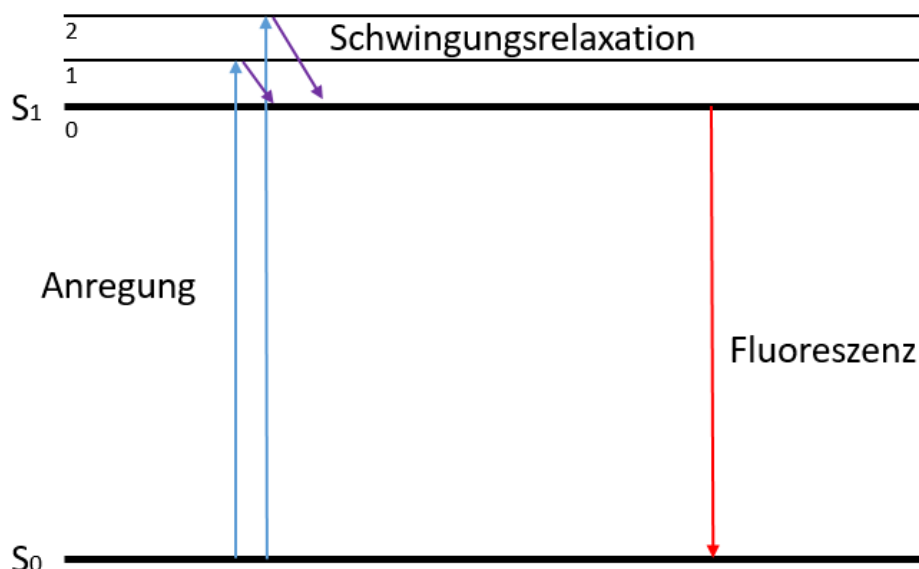


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Energiezustands eines Fluorophors in einem vereinfachten *Jablonski*-Diagramm

Der Energieverlust durch die Relaxation wird in diesem Fall als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet.^[91] Abbildung 17 zeigt eine allgemeine Darstellung der *Stokes-Verschiebung*, der Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaxima.^[93]

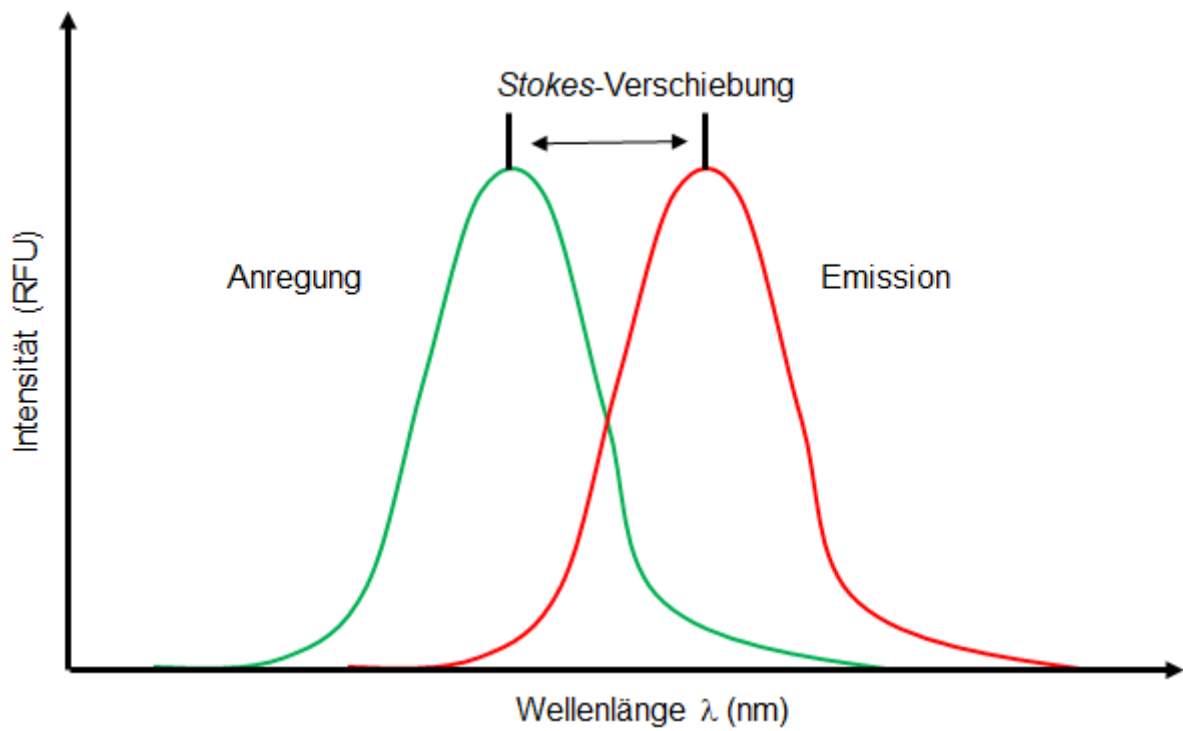


Abbildung 17: schematische Darstellung der *Stokes-Verschiebung*

2 Ziel der Arbeit

Die Forschung im Bereich AMP und PPI ist für Wissenschaft und Pharmaindustrie von großem Interesse. Je mehr Wissen über die Interaktion und die Wirkungsweise von Proteinen auf molekularer Ebene vorhanden ist, desto leichter lassen sich Krankheiten gezielter diagnostizieren und effektiver bekämpfen. Um der Forschung diesen Bereich voran zu treiben, ist der Einsatz von Peptidarrays besonders sinnvoll, da die Synthese von Peptiden im Vergleich zu Proteinen einfach durchzuführen ist und die Peptide keine komplexe dreidimensionale Faltung wie Proteine aufweisen müssen. Die Peptidarrays sind in der Lage eine enorme Anzahl von Peptiden mit einer Vielzahl von Sequenzdiversitäten auf einer kleinen Fläche zur Verfügung zu stellen. Die Untersuchungen mit hochdichten Peptidarrays ermöglichen den Einsatz minimaler Probenmengen, um die Zielpeptide einfach und zuverlässig zu finden.

Bei der Suche nach potentiell AMP haben Peptidarray, insbesondere Mikrofluidik-basierte Peptidarrays, großes Potenzial. Bei der hier beschriebenen Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode (Abbildung 1, S. 3) werden die Peptide am Boden der Kavität synthetisiert. Diese Kavitäten können als separate Testbereich für die Bakterien-Antibiotika-Wirkung genutzt werden. Über die Wirksamkeit des potentiellen AMP kann eine genaue Aussage getroffen werden, da sich in jeder Kavität nur eine Peptidsorte befindet und die Bakterien in den Kavitäten gegeneinander abgeschirmt sind. Eine gegenseitige Beeinflussung der Probe kann ausgeschlossen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Mikrofluidikbasierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode. Mit der neu entwickelten Methode können die technischen Nachteile der bisherigen Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln vermieden werden.^[29-30] Dazu mussten völlig neue Prozessstrategien und Vorgehensweisen optimiert und entwickelt.

Zunächst wurde versucht, ein Peptidarray nach der bisherigen Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln aufzubauen. Großes Optimierungspotenzial konnten in verschiedenen Schritten im Herstellungsprozess identifiziert werden. Ausgemachte Bereiche erstreckten sich von der Aminosäureabsorption im Partikel über die Codierung der Partikel bis hin zum Einbringen von Partikeln in die Kavitäten.

Begonnen wurde mit der Optimierung der Aminosäureabsorption im Partikel. Erstmals wurde eine Methode entwickelt, um Aminosäureträger (Partikel) herzustellen. Die Partikel mussten eine Größenverteilung von $9 \pm 2 \mu\text{m}$ aufweisen, damit in jeder $12 \mu\text{m}$ Kavität nur ein Partikel Platz hatte. Dies garantierte, dass keine Mischpeptide in der Kavität synthetisiert wurden. Als

Partikelmaterial wurde hierfür das Matrixpolymer SLEC-P LT 7552 Firma *Sekisui Chemical Co. Ltd.* (Osaka/Japan) verwendet. Partikel aus diesem Polymer konnten deutlich mehr Aminosäuren aufnehmen als bei bisheriger Methode.^[29-30] Dieses Polymer hat eine niedrigere Glasübergangstemperatur und kann bei 90 °C geschmolzen werden. Die Verwendung von schmelzbarem Polymer hat den Vorteil, dass dieser direkt die Syntheseoberfläche (den Kavitätenboden) kontaktiert. Während der Synthese diente die Partikelschmelze als Lösungsmittel und erhöhte die Diffusion der Aminosäure (Bei der bisherigen Methode müssen zunächst die eingelagerten Aminosäure-Bausteinen aus den trockenen PMMA-Partikeln extrahiert werden, dann erfolgt die Aminosäurediffusion in der Festphase).^[29-30] Diese Verbesserungen führten zu einer deutlich besseren Peptidausbeute bei gleichen Reaktionsbedingungen.

Im nächsten Schritt wurden die mit Aminosäuren beladenen Partikel individuell markiert, um die Partikel untereinander differenzierbar zu machen. Die Markierung erfolgte mit organischen Fluorophoren (statt mit Quantum Dots (QD) wie die bisherige Methode).^[29-30] Hierzu wurden drei verschiedene Fluorophore BODIPY[®] (BDP)-FL-Amin, Tetramethylrhodamin (TAMRA)-Amin und Cyanin-5-Amin) die mit geeigneten Filtern für den Blau-, Grün- und Rotkanal im Fluoreszenzscanner nachgewiesen wurden. Die Fluorophorcodierung bietet den Vorteil, dass das Auslesen von Codes vereinfacht wurde und die Verwendung von gesundheitsschädigenden QD durch Fluorophore ersetzt werden konnte.

Im dritten Schritt wurden die hergestellten Partikel in die Mikrokavitäten eingebracht. Das mechanisch belastende Partikelplatzierungsverfahren durch Einreiben der trockenen Partikel (bisherige Methode)^[29-30] wurde durch einen schonenden Templat-unterstützten selbstorganisierten Partikelplatzierungsprozess ersetzt. Die mechanische Belastung der Partikel konnte dadurch minimiert werden. Hierzu wurde eine Platzierungskammer gebaut. Zum Platzieren von Partikeln wurde die Partikelsuspension in die Platzierungskammer überführt und die Partikel mittels sich fortbewegenden Meniskus in die Kavitäten gebracht,

Um die entwickelte Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode zu überprüfen, wurden zwei bekannte Peptidsequenzen, HA- und FLAG-Tags nachgebaut und die hergestellten Peptidsequenzen mittels Antikörperfärbung nachgewiesen.

3. Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode

Bei der Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode (Abbildung 1, S. 3) werden die Peptide im Unterschied zu den klassischen Synthesemethoden in den Kavitäten eines mikrostrukturierten Glasobjektträgers (Firma *AMO*) aufgebaut. Aufgrund der hohen Transparenz im sichtbaren Wellenlängenbereich und hinsichtlich der Analysemethode wurde als Glasträger Borosilikatglas verwendet. Diese Glasträger haben die Größe eines herkömmlichen Objektträgers. Auf dieser Glasoberfläche befinden sich 2,79 Mio. Mikrostrukturen (Kavitäten) die alle gleichmäßig im Array-Format verteilt sind. Abbildung 18 zeigt das Kavitätenfeld auf der Oberfläche des Glasträgers unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskops (REM). Diese Mikrostrukturen, also die Kavitäten, haben einen Durchmesser von 12 μm , eine Tiefe von 10 μm und einen Pitch von 20 μm . Der Boden der Kavität dient bei der Synthese als Reaktionsfläche und in jeder Kavität wird nur ein Peptidtyp hergestellt. Um eine Peptidsynthese auf der Oberfläche des Glasträgers zu ermöglichen, muss diese Oberfläche funktionalisiert werden.^[94]

Dabei wird die Oberfläche des Glasträgers mit einer Polymerschicht aus mit Fmoc- β -Alanin-verestertem 10:90 Polyethylenglykoldimethacrylat (PEGMA)-co-Methylmethacrylat (MMA) funktionalisiert (Im folgenden Text wird diese Polymerschicht als „PEGMA/MMA“ abgekürzt und der mikrostrukturierte Glasträger mit dieser Polymerschicht als „Kavitätenträger“ benannt).^[94] Mit dieser Methode können in 2,79 Mio. Kavitäten bis zu 2,79 Mio. verschiedene Peptide auf einmal hergestellt werden.

3. Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode

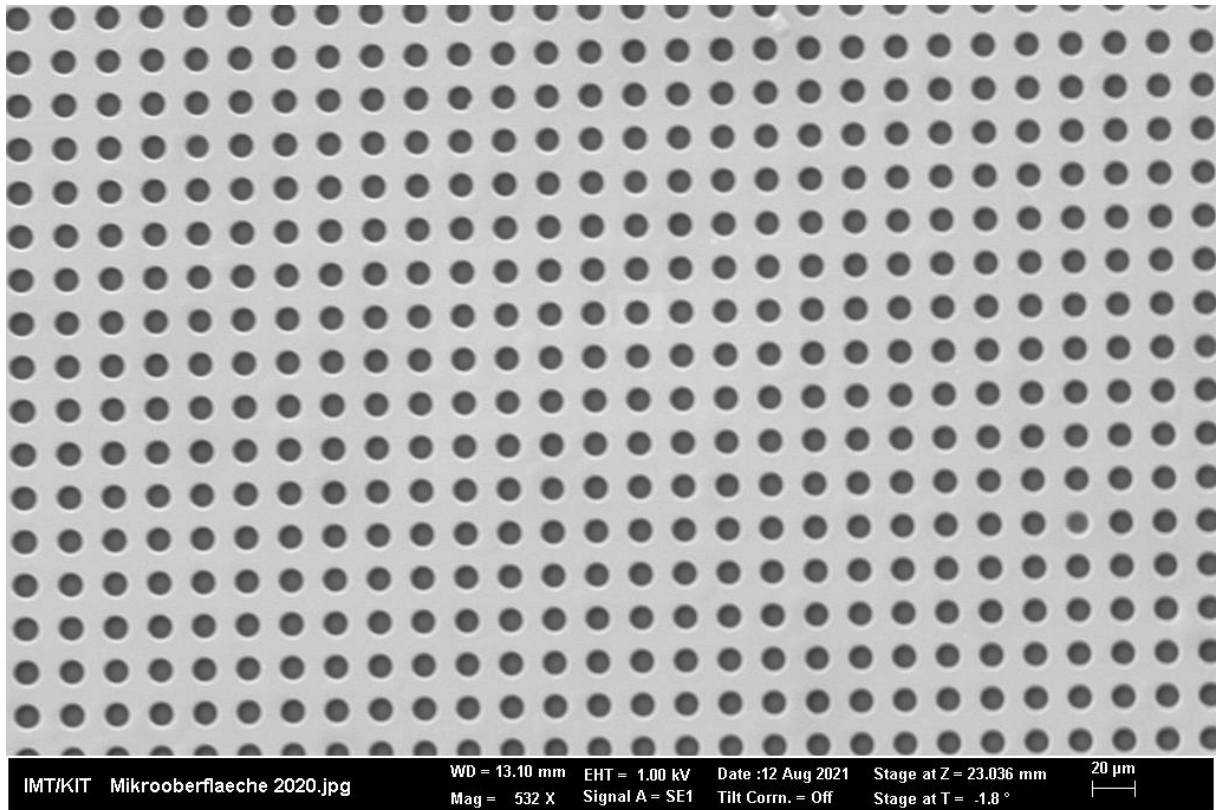


Abbildung 18: REM-Aufnahme der Kavitäten des Kavitätenträgers

3.1 Synthesestrategie: Aufbau des Mikrofluidik-basierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode

Ähnlich wie bei der klassischen SPOT-Methode müssen bei der Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode die unterschiedlichen Aminosäure-Bausteine sortenrein an die jeweiligen Synthesestellen (Kavitäten) gebracht werden. Die dafür benötigten Reagenzien werden in Partikel beladen, die anschließend durch Selbstorganisation in die Kavitäten platziert werden. Anschließend werden Peptide in den jeweiligen Kavitäten synthetisiert.

Um die Peptide auf dem Glasträger herstellen zu können, muss der Träger vorher funktionalisiert werden, damit freie Reaktionspartner für die Aminosäure-Bausteine, in diesem Fall die freien Aminogruppen, auf der Oberfläche des Trägers zur Verfügung stehen. Die chemische Peptidsynthese erfolgt von C-Terminus zum N-Terminus. Um eine Peptidbindung zwischen der zu verknüpfenden Aminosäure und der freien Aminogruppe der Oberfläche herzustellen und unerwünschte Aminosäure-Aminosäure-Bindung zu vermeiden, werden am C-Terminus voraktivierte (OPfp-Ester) und orthogonal geschützte Aminosäuren (Abbildung 19) zur Synthese verwendet.

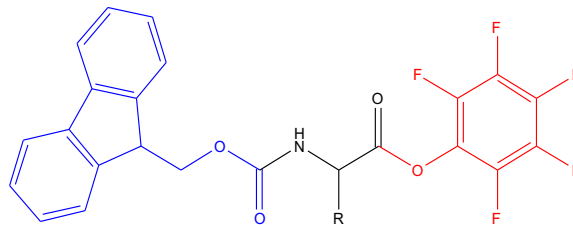


Abbildung 19: Strukturform des Fmoc-geschützten (blau) und mit OPfp-aktivierten (rot) Aminosäurederivats

Die Abbildung 20 stellt die schematische Darstellung des Synthesesyklus dar.^[29-30]

(1) Um die Aminosäure in die Kavität zu bringen, muss die Aminosäure zu nächst in ein Partikel aufgenommen werden. Diese Partikel müssen so groß sein, dass in jeder Kavität nur ein Partikel Platz hat. (Auf diese Weise kann eine unkontrollierte Verlängerung der Peptidkette mit den „falschen“ Aminosäuren vermieden werden). Um erkennen zu können, welche Aminosäure in welcher Kavität ist, müssen die unterschiedlichen Aminosäurepartikel voneinander unterscheidbar gemacht werden. Dies geschieht mit fluoreszierenden

3.1 Synthesestrategie: Aufbau des Mikrofluidik-basierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode

Substanzen, die bei der Partikelherstellung in die Partikel aufgenommen werden. Dadurch erhält jedes Aminosäurepartikel einen individuellen Fluoreszenzcode.

(2) Das Einbringen der Partikel in die Kavitäten.

(3) Auslesen von Partikelcodes mit dem Fluoreszenzscanner der Firma *Innopsys* (Frankreich).

(4) Die Ergebnisse des Codelesens werden zum Aufbau der Peptidbibliothek verwendet. (Z.B. Nach 15 Kupplungszyklen liefern die Fluoreszenzbilder der platzierten Partikel die Peptidsequenzen des resultierenden Arrays (mit 15-mer Peptiden)).

(5) Kupplung der Aminosäure mit dem Polymerfilm auf dem Kavitätenträger.

(6) Entfernung von Partikeln aus den Kavitäten, Deaktivierung der nicht umgesetzten Stellen und Entschützung der Fmoc-Schutzgruppen von den an die Oberfläche gebundenen Aminosäuren. Die Syntheseschritte werden so lange wiederholt.

(7) bis die gewünschte Peptidlänge erreicht ist.

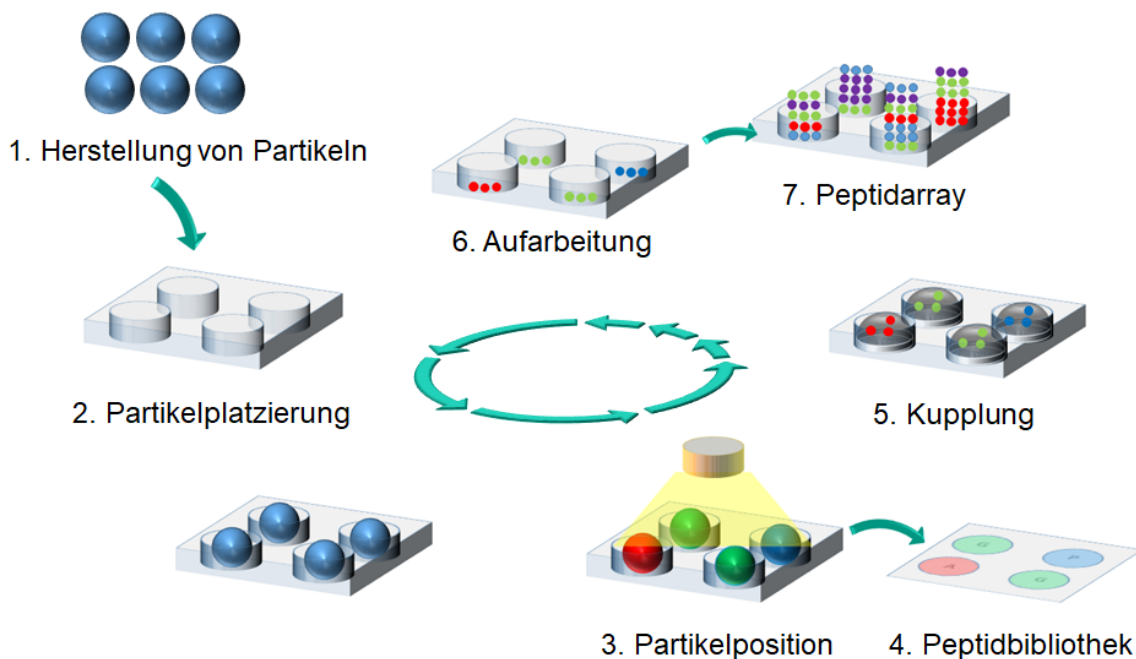


Abbildung 20: schematische Darstellung des Synthesesyklus,^{modifiziert nach[29-30]} 1. Herstellung von Partikeln (Aminosäure- und Codeabsorption am Partikel); 2. Platzierung der Partikel in die Kavitäten; 3. Bestimmung der Partikelposition via Fluoreszenzscanner; 4. Aufbau einer Peptidbibliothek; 5. Kupplungsreaktion der Aminosäure mit dem Polymerfilm des Kavitätenträgers; 6. Aufarbeitung; 7. Der Synthesesyklus wird wiederholt, bis die gewünschte Sequenzlänge erreicht ist

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

Die Qualität des Peptidarrays, das nach der publizierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln hergestellt wurde, war unzureichend, da weniger als 4,8 % aller Kavitäten Peptide mit der richtigen Kettenlänge enthielten.^[29-30] Um Schwachstellen dieser Methode herauszufinden, wurde ein Vorversuch nach dieser Methode durchgeführt.

Zunächst wurden zwei Partikelsorten (nach Popov^[29-30]) mit hydrophoben QDs codiert und anschließend mit Aminosäuren adsorbiert. Hierzu wurden Aminosäure Fmoc-Lysin(Boc)-OPfp (Lysin) mit QD 500 und Fmoc-Glycin-OPfp (Glycin) mit QD 580 jeweils sortenrein an kommerziell erhältliche monodisperse Polymethacrylat (PMMA) -partikel adsorbiert (Abbildung 21).

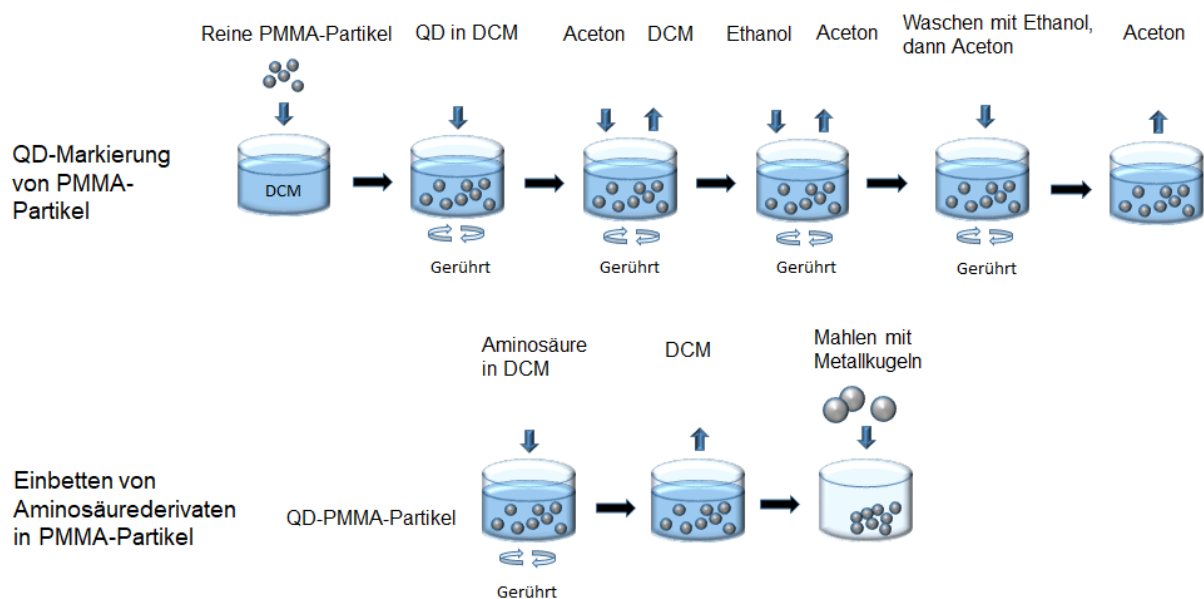


Abbildung 21: schematische Darstellung der Codierung und Aminosäureadsorption an PMMA-Partikeln von Popov^{modifiziert nach[29-30]}

Um zu verhindern, dass die zur Codierung verwendeten QDs aus den PMMA-Partikeln wieder herausgelöst werden, wurden die QDs als erstes an die PMMA-Partikel adsorbiert. Nach dem Waschen wurden die codierten Partikel mit den entsprechenden Mengen an Aminosäuren (Tabelle 1) in Dichlormethan (DCM) suspendiert. Nach der Verdampfung von DCM blieb ein Aminosäure-Partikel-Aggregat zurück. Dieses Aggregat musste mit zwei Metallkugel gemahlt

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

werden, um Partikel zu erhalten. Die so hergestellten Aminosäurepartikel wurden für die Peptidsynthese verwendet.

Tabelle 1: optimaler Massenanteil von Aminosäurederivaten in PMMA-Partikel^[29-30]

Aminosäure	Massenanteil	Aminosäure	Massenanteil
Alanin	2 %	Leucin	2 %
Arginin	2 %	Lysin	3 %
Asparagin	2 %	Methionin	3 %
Asparaginsäure	3 %	Phenylalanin	3 %
Cystein	2 %	Prolin	3 %
Glutaminsäure	2 %	Serin	3 %
Glutamin	2 %	Threonin	3 %
Glycin	3 %	Tryptophan	3 %
Histidin	2 %	Tyrosin	3 %
Isoleucin	2 %	Valin	3 %

Nach dem Codierungs- und Aminosäureadsorptionsprozess wurden die Partikel gemischt und dann auf die Oberfläche eines mit PEGMA/MMA funktionalisierten hydrophoben Kavitäträgers aufgebracht. Die Partikel wurden mit einem fusselfreien Tuch in die Kavitäten platziert und die überschüssigen Partikel mit Druckluft entfernt. Anschließend wurde der Füllgrad der Partikelplatzierung mit einer Anregungswellenlänge von 635 nm und einem optischen Dichtefilter (OD-Filter) mittels Fluoreszenzscanner bestimmt (Abbildung 22). Der Füllgrad in diesem Experiment betrug ca. 70 % (Abbildung 22a). Grund für den relativen geringen Füllgrad lag darin, dass beim Entfernen der überschüssigen Partikel mit Druckluft Partikel aus den Kavitäten (Abbildung 22b und 22c) entfernt wurden.

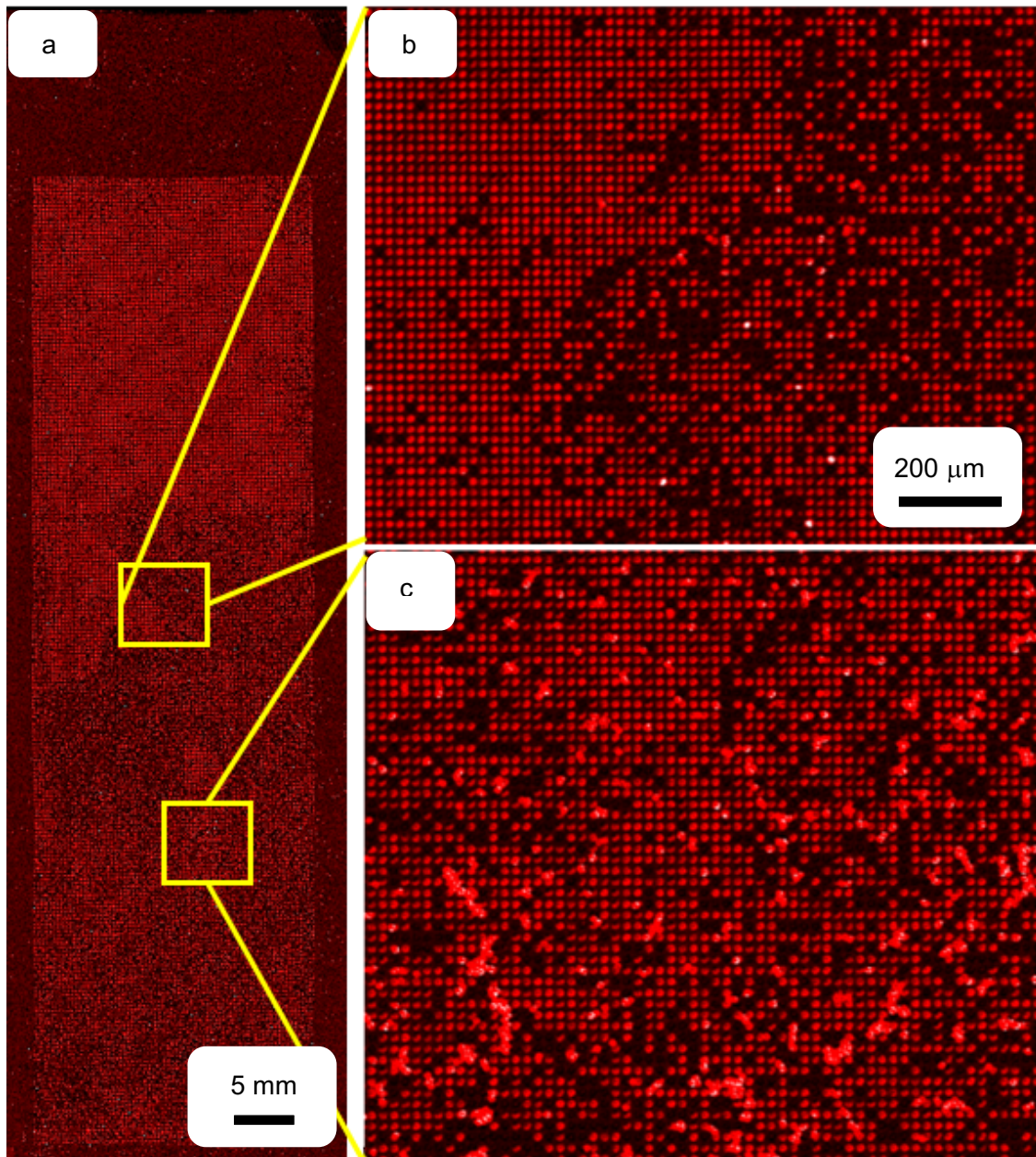


Abbildung 22: Fluoreszenzaufnahme mit dem OD-Filter eines mit PMMA-Partikeln befüllten Kavitäträgers; a. Aufnahme über die gesamte Oberfläche, b. vergrößerte Aufnahme von ungefüllten und gefüllten Kavitäten, c. vergrößerte Aufnahme von ungefüllten, gefüllten Kavitäten und Partikel auf dem Steg; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 635 nm, Filter: OD-Filter; Auflösung: 1 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

Nach der Bestimmung des Füllgrades wurde die Positionen der jeweils abgelagerten Aminosäurepartikel anhand des QD-Signals identifiziert. Mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden die mit der Aminosäure Lysin und QD 500 beladenen Partikel im blauen Kanal detektiert und mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm wurden die mit der Aminosäure Glycin und QD 580 beladenen Partikel im grünen Kanal nachgewiesen. Die Analyseergebnisse zur Folge wurden drei Partikelcodes detektiert. Der grüne Code, der blaue Code und eine Mischung aus grünen und blauen Codes (Abbildung 23). Da die hierfür verwendeten Partikel jeweils nur mit einem QD-Typ codiert wurden und QDs schmale Emissionsspektren aufweisen, zeigt dieses Mischsignal auf eine Kreuzkontamination von QDs in Partikeln hin. Eine Hypothese legte nahe, dass diese Kreuzkontamination während des Platzierungsprozesses passierte. Durch das Aneinanderreiben werden die trockenen Partikel hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt, so dass ein QD-Austausch zwischen den Partikeln stattfinden könnte. Die gemischten Signale erschwerten die Zuordnung von Codes beziehungsweise (bzw.) die Aminosäureidentifikation. Das Kreuzkontaminationsproblem muss behoben werden, weil der Codierungsplan nach (Tabelle 2) nicht nur farbreine Codierungen, sondern auch eine Codierung mit mehreren QDs in einem Partikel vorsieht.

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

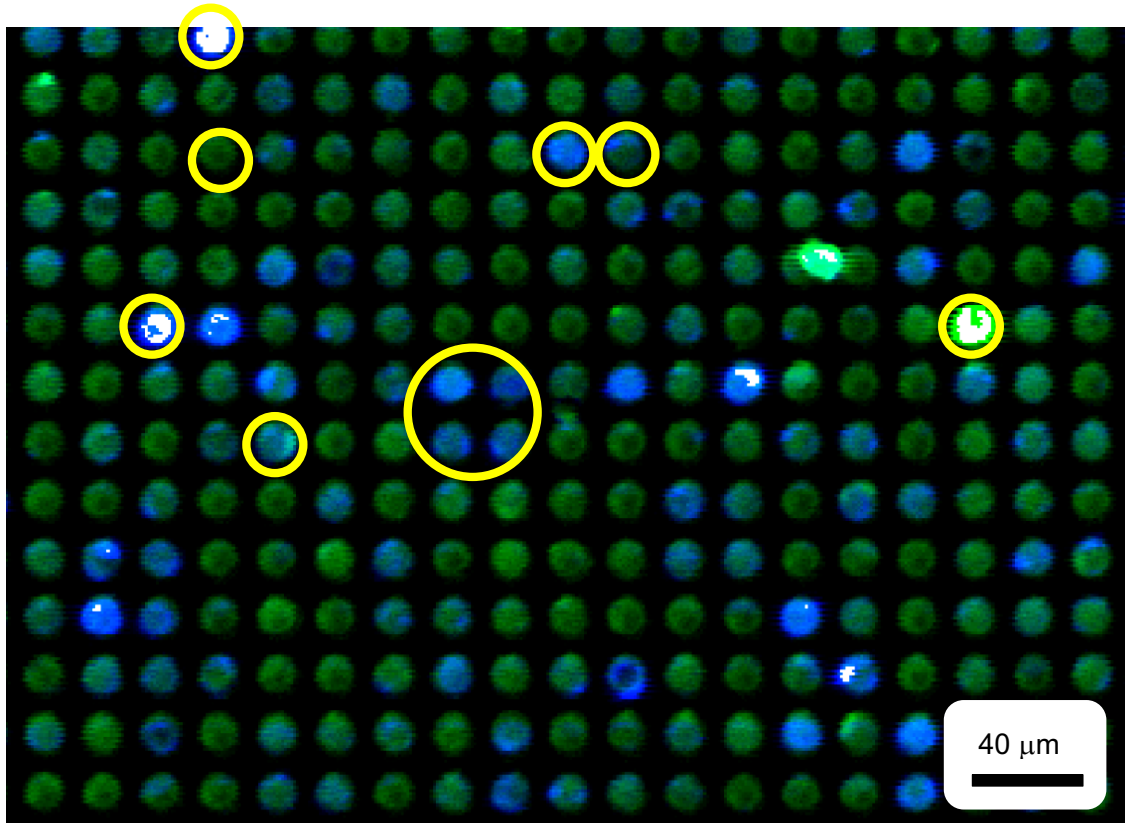


Abbildung 23: Fluoreszenzaufnahme der Partikelcodes von QDs 500 nm und 580 nm nach dem Platzierungsprozess (Methode von *Popov*);^[29-30] Aufnahmeparameter: im blauen Kanal Anregungswellenlänge: 488 nm, Filter: 520/5 nm; Im grünen Kanal Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 582/75 nm; Auflösung: 1 µm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Tabelle 2: mögliche Kombinationen von QDs zur Partikelcodierung^[29-30]

QD	QD-Kombinationen													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
500	x	-	-	-	x	x	x	-	-	-	x	x	-	x
550	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x	x	x
580	-	-	x	-	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x
610	-	-	-	x	-	-	x	-	x	x	-	x	x	x

Als weiteres Problem stellte sich die inhomogene Signalstärke des Partikelcodes heraus (Abbildung 24). Einige QD-Signale von Partikeln zeigen große Unterschiede in der Fluoreszenzintensität. Die Mehrzahl der QD-Signale zeigt ein Sichel- oder Punktmuster. Daher konnte hier keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die hier aufgezeichneten Signale von Partikeln oder von anderen Kontaminationen stammten.

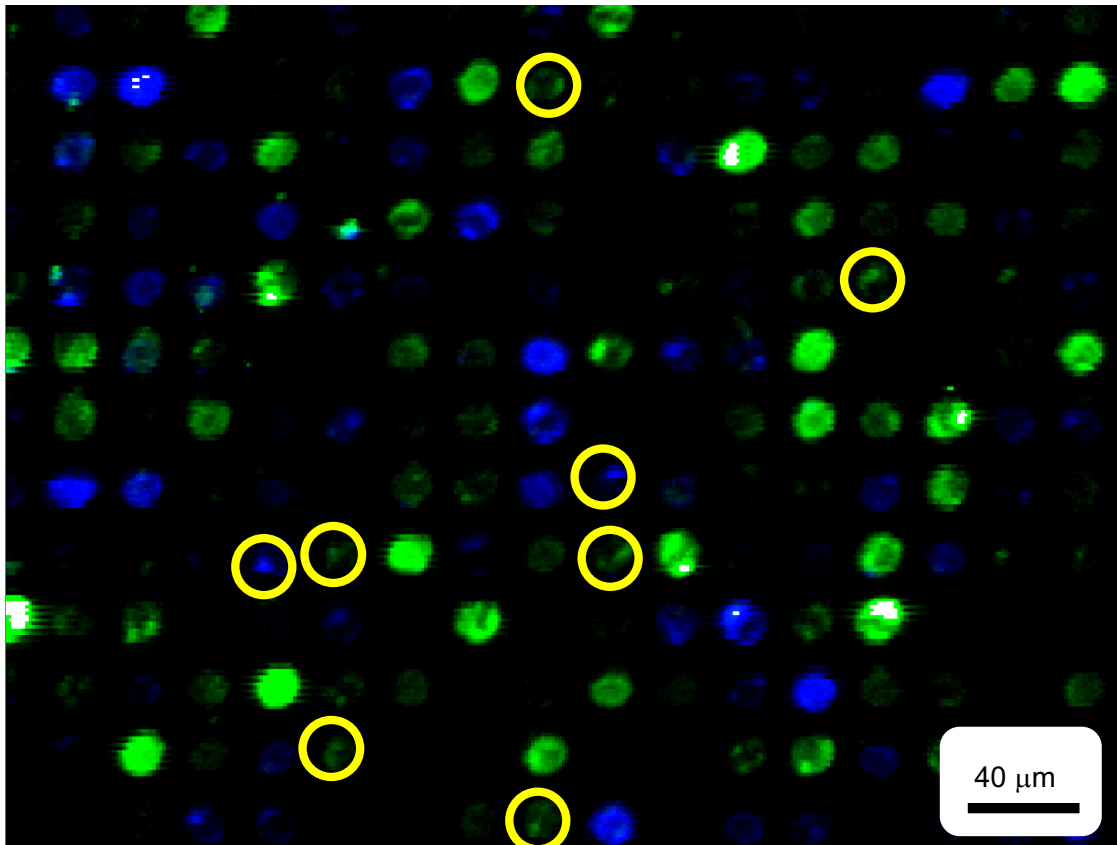


Abbildung 24: Fluoreszenzaufnahme der Partikelcodes von QDs 500 nm und 580 nm nach der Partikelplatzierung (Methode von Popov);^[29-30] Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge: 488 nm, Filter: 520/5 nm; Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 582/75 nm; Auflösung: 1 μm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Austausch von Aminosäure-Bausteinen zwischen den Partikeln möglich ist. Während der Aminosäureadsorption an die Partikeln wurden die codierten Partikel mit Aminosäuren beschichtet. Um QDs zwischen zwei Partikeln austauschen zu können, muss diese Aminosäureschicht auf dem Partikel aufgebrochen werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mit diesem Kavitäträger ein Kupplungszyklus einschließlich eine Fluorophorfärbung durchgeführt.

Nach dem Kupplungsschritt wurden die nicht umgesetzten Aminogruppen acetyliert, die an die Oberfläche des Kavitäträgers gebundenen Aminosäuren mit Piperidin entschützt und die freigesetzten Aminogruppen mit dem Fluorophor TAMRA-NHS sichtbar gemacht. Bei der Analyse wurde die Oberfläche des Kavitäträgers mit einer Wellenlänge von 532 nm, Filter 582/75 nm untersucht.

Die Fluoreszenzsignale der mit TAMRA-NHS markierten Aminosäure waren inhomogen und schwach (Abbildung 25). Ein deutliches Signal wurde jedoch nur in vereinzelt Kavitäten

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

beobachtet. Dies bedeutete, dass kaum Aminosäuren an die Oberfläche des Kavitätenträgers gebunden wurden. Bei einer so geringen Kupplungsausbeute kann ohne weitere Optimierung der Methode offensichtlich keine weitere Synthese durchgeführt werden.

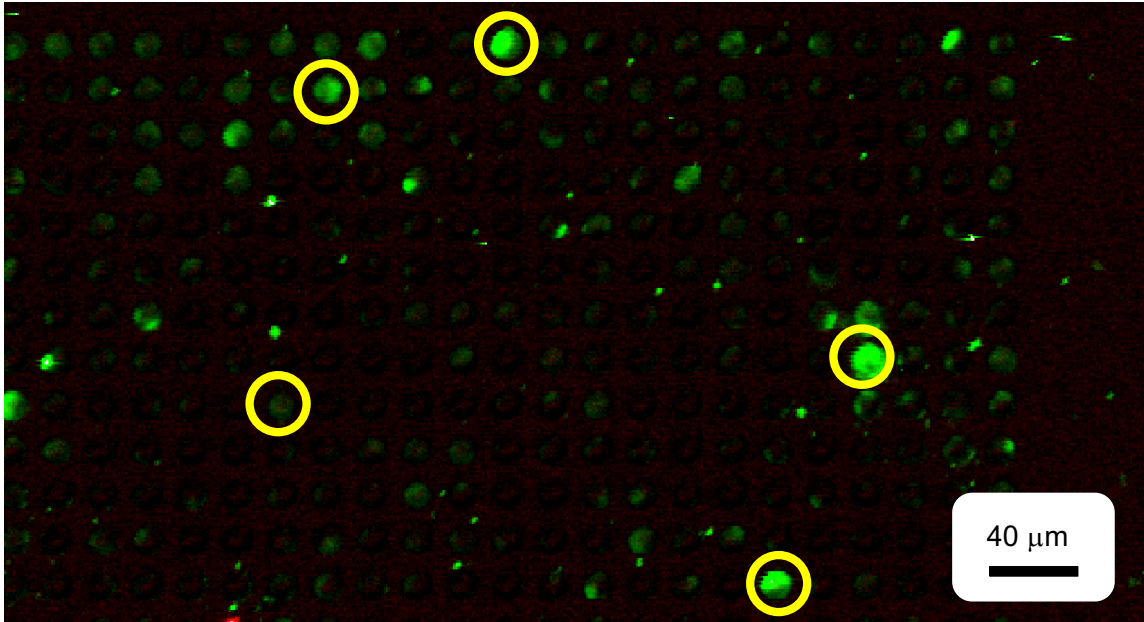


Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahme der Oberfläche des Kavitätenträgers nach der TAMRA-Färbung; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm; Auflösung: 1 µm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Bei der bisherigen Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln wurden also folgende Probleme festgestellt:

1. Problem: Verwendung von kommerziell erhältlichen vernetzten PMMA-Partikeln

Kommerziell erhältliche quervernetzte PMMA-Partikel haben den Vorteil, dass die Partikel nahezu monodisperse sind. Die Nachteile sind die eingeschränkte Aufnahme der Aminosäure-Bausteine und die Lösungsmittelbeständigkeit des Partikels. Mit PMMA-Partikeln wurde nach Popov^[29-30] eine maximale Aminosäureadsorption von bis zum 3 Gew.-% erzielt (siehe Tabelle 1, S. 28).

Die Lösungsmittelbeständigkeit des Partikels hat den Nachteil, dass diese Partikel nach der Synthese nicht immer restlos aus den Kavitäten entfernt werden können (Abbildung 26). Solche Partikel blockieren die Kavitäten und verhindern den weiteren Aufbau von Peptiden.

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

Die durch die blockierten Stellen hervorgerufenen Fehler reichern sich mit zunehmenden Syntheszyklen exponentiell an.

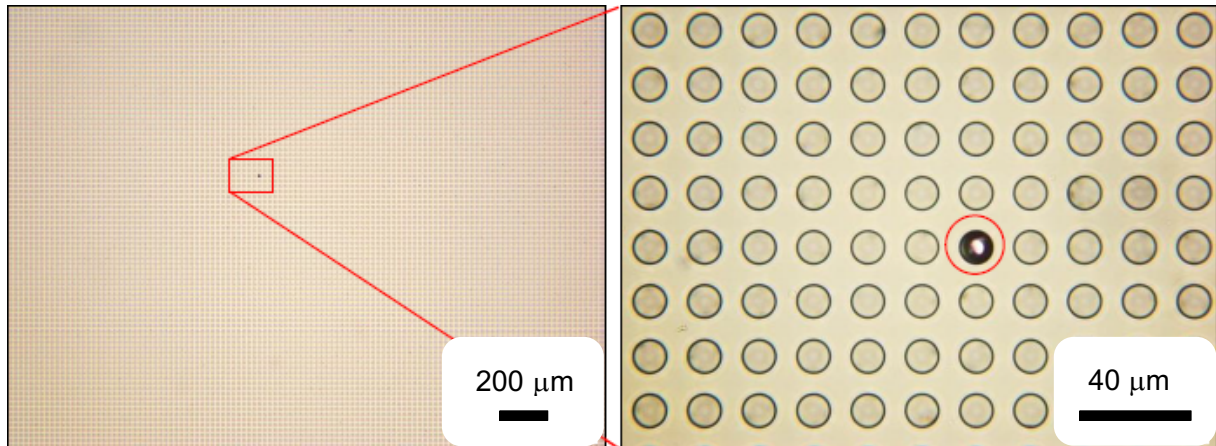


Abbildung 26: mikroskopische Aufnahmen;^[29-30] In Kavität festsetzendes Partikel nach dem Waschschrift

2. Problem: Methode zur Fluoreszenz-Codierung von Partikeln mit QDs

In der Publikation von *Popov* wurden insgesamt 14 Fluoreszenz-Codierungsmöglichkeiten mit 4 QD-Typen vorgeschlagen.^[29-30] Um alle 20 biogenen Aminosäuren zu kennzeichnen, sind 6 zusätzliche Codes erforderlich.

Die von *Popov*^[29-30] verwendete Codierungsmethode ermöglicht keine gleichmäßige Adsorption von QDs auf dem Partikel (siehe Abbildung 23, S. 31), was bedeutet, dass die Codesignale inhomogen und somit nicht eindeutig sind. Die mögliche Ursache könnte an dem Codierungsprozess liegen. Die verwendeten QDs und Partikel sind hydrophob. Beim Wechsel des Lösungsmittels von DCM auf das polare Aceton ziehen sich die hydrophoben Partikel und QDs trotz Rührens zusammen. Dies hat zur Folge, dass die Partikel im Zentrum des Partikelaggregats mit signifikant geringerer Wahrscheinlichkeit auf QDs treffen als Partikel am Rand des Aggregats, was zu Signalinhomogenität führen kann.

3. Problem: Beladung der PMMA-Partikel mit Aminosäure-Bausteinen

Die Aminosäureadsorption an die PMMA-Partikel nach *Popov*^[29-30] zeigt großes Optimierungspotential. Gemäß dem verwendeten Verfahren werden die Aminosäure-Bausteine auf der Partikeloberfläche adsorbiert. Das anschließende Mahlen mit zwei Metallkugeln, um Partikelaggregate aufzubrechen, könnte diese Aminosäureschicht beschädigen. Dies führt zu

3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode mit trockenen Aminosäurepartikeln

uneinheitlicher Beladung der Partikel mit den Aminosäure-Bausteinen und könnte die schlechte Kupplungsausbeute im oben beschriebenen Experiment erklären.

4. Problem: Einbringen der Aminosäurepartikel in die Kavitäten

Beim Einreiben der trockenen Aminosäurepartikel mit einem fusselfreien Tuch werden diese hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Die Misch-QD-Codes (Abbildung 23, S. 31) von Partikeln nach dem Platzierungsprozess bestätigten, dass die Partikel Materialien austauschen (QDs und Aminosäure). Die Kontamination mit zusätzlichen QDs von anderen Partikelarten erschwert das Auslesen von Partikelcodes und der Austausch der an der Partikeloberfläche absorbierten Aminosäure könnte zur Synthese von Peptiden mit undefinierbaren Sequenzen führen. Die Entfernung von überschüssigen Partikeln mit Druckluft ist ebenfalls kein geeigneter Verfahrensschritt, da dadurch Partikel aus den Kavitäten entfernt werden.

Aufgrund der oben aufgelisteten Probleme müssen Verfahrensschritte für die Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode im Grunde alle neu konzipiert, optimiert und verbessert werden, um mit dieser Methode den Aufbau eines hochdichten Peptidarrays zu ermöglichen.

In dieser Arbeit sollten die oben genannten Probleme mit den folgenden Änderungen in den einzelnen Schritten des Herstellungsprozesses behoben werden.

- 1) Herstellung von Partikeln aus nicht vernetzten Polymeren und Aminosäure-Bausteinen. Dies hat den Vorteil, dass die Aminosäuren von Anfang an ein Teil des Partikels geworden sind und somit die Menge an Aminosäuren im Partikel im Vergleich zur *Popov*^[29-30] Methode stark ansteigt. Dabei befinden sich die Aminosäure-Bausteine im Inneren des Partikels, sodass das Polymer als Schutzmantel für die Aminosäure gegen die Umwelt dient. Eine Herausforderung hierbei besteht darin, dass die hergestellten Partikel möglichst monodispers sein sollten.
- 2) Partikelcodierung mit Fluorophoren. Das neue Codierungsverfahren mit organischen Fluorophoren ermöglicht die eindeutige Codierung von 20 verschiedenen Partikelarten. Zusätzlich dazu werden die gesundheitsschädlichen QDs vermieden.
- 3) Die mechanische Platzierungsmethode wurde durch eine Templat-unterstützte-selbstorganisierte Partikel-Platzierung ersetzt. Die neue Methode ermöglicht das Einbringen von Partikeln in die Kavitäten nahezu ohne mechanische Belastung.

3.3 Herstellung der Aminosäurepartikel

Anstatt Partikel kommerziell zu erwerben, wurden für diese Arbeit selbst hergestellte Partikel verwendet. Mit dem Ziel, Partikel in den gewünschten Größen herzustellen, wurden verschiedene Herstellungsverfahren wie die Shirasu Porous Glass (SPG) Membranemulsion und der Mikrotröpfchen-Generator eingesetzt, um möglichst monosphärische, monodisperse Partikel herzustellen.

Bei der Partikelherstellung mittels SPG-Membranemulsion wurde eine hydrophobe SPG-Membran (Abbildung 27a) der Firma SPG Technology Co.,Ltd (Japan) verwendet. Die verwendeten Membranen waren zylinderförmig und hatten eine Porengröße von ca. 3 μm .

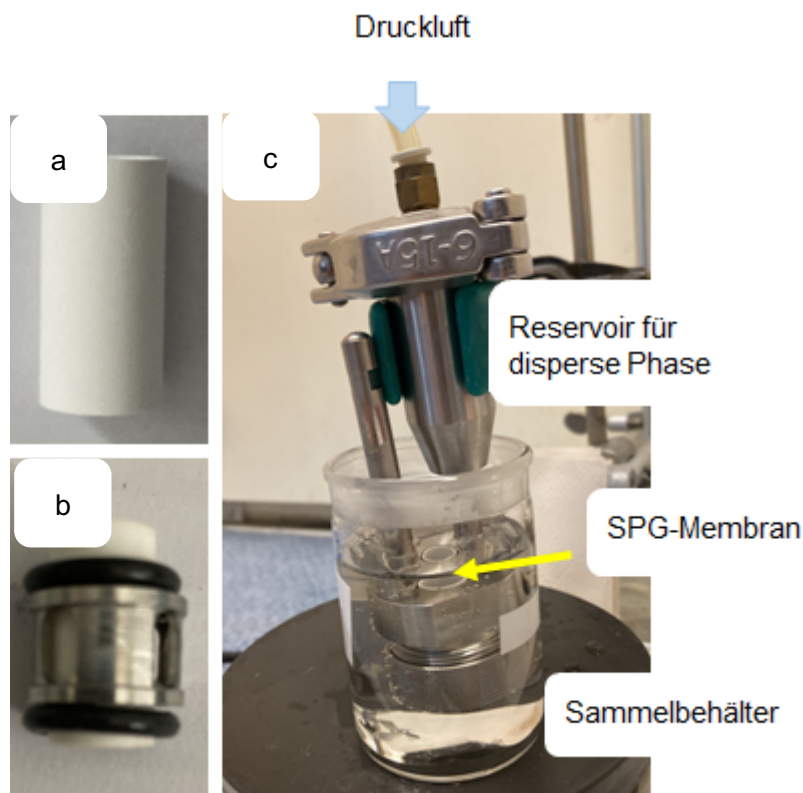


Abbildung 27: Fotoaufnahme von a. SPG-Membran; b. SPG-Membran in der Halterung; c. der vollständige Aufbau der SPG-Anlage

Beim Zusammenbau der Anlage musste die SPG-Membran zuerst in der Halterung befestigt (Abbildung 27b) und dann in die SPG-Anlage eingebaut werden. Anschließend wurde die SPG-Membran mit Wasser bedeckt (Abbildung 27c). Nachdem das Matrixpolymer SLEC 7552 im DCM gelöst und in den Metalltank der SPG-Anlage überführt worden war, wurde Flüssigkeit der dispersen Phase mit eingestellter Druckluft durch die SPG-Membran (von außen nach

innen) in den Sammelbehälter durchströmt. Die Geschwindigkeit der Strömung wurde indirekt mit einem Druckregler eingestellt. An der Grenzfläche zwischen Membran und das Wasser wurden die Mikrotröpfchen gebildet.

Die hergestellten Partikel hatten eine breite Größenverteilung und deckten den Bereich von ca. 9 bis 25 μm ab (Abbildung 28). Die mittlere Partikelgröße (d_{50}) betrug 13,5 μm . Die Größen aller 90% Partikel (d_{90}) lag unter 18,2 μm .

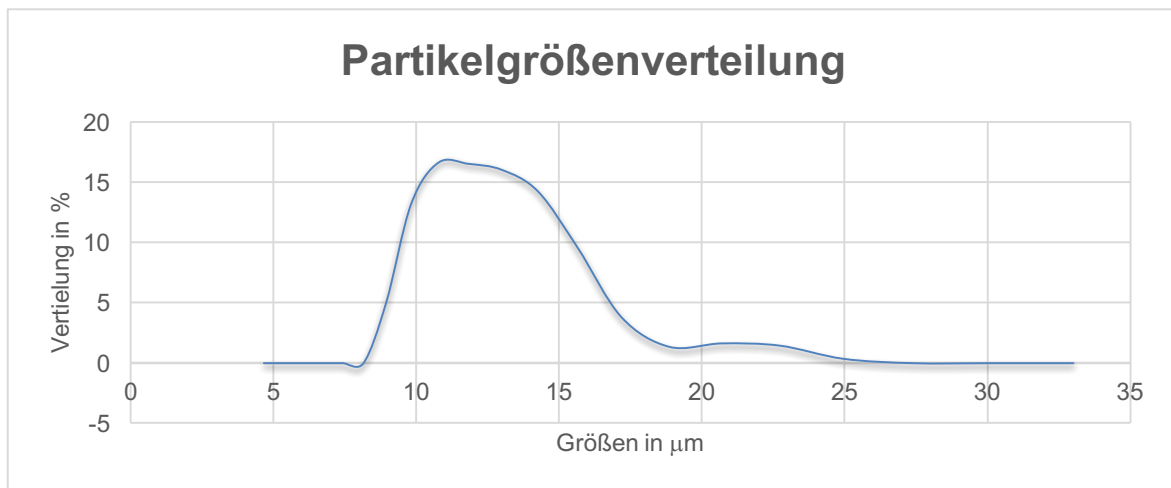


Abbildung 28: Analyse der Partikelgrößenverteilung

Obwohl mit dieser Herstellungsmethode grammweise Mikropartikel an einem Tag hergestellt werden konnten, war diese Methode aufgrund der breiten Partikelgrößenverteilung für diese Arbeit ungeeignet. Trotz weiterer Optimierungen des Systems konnten keine Partikel mit engerer Größenverteilung hergestellt werden. Außerdem war die Methode sehr kostspielig, denn um die Partikelqualität zu gewährleisten, muss bei jeder Herstellung eine neue Membran eingesetzt werden. Da die Poren der Glasmembran während des Gebrauchs mit Verunreinigungen und Polymeren verstopft werden, nimmt die Porengröße mit der Zeit ab. Dies wirkt sich negativ auf die Partikelgrößenverteilung aus. Die Regeneration der Membran durch Erhitzen auf 400 $^{\circ}\text{C}$ (Herstellerangaben) brachte keine erkennbare Verbesserung.

Ein weiteres Problem bestand darin, dass wiederholter Kontakt mit DCM die Gummidichtungen der Anlage korrodierte, wodurch die Lösung der dispersen Phase unkontrolliert in das wässrige Medium, in dem Mikrotröpfchen erzeugte, entweichen konnte. Diese konnte mit den hergestellten Tröpfchen fusionieren und verbreitete so die Größenverteilung der erzeugten Partikel.

3.3 Herstellung der Aminosäurepartikel

Aus den obengenannten Gründen war der Einsatz der SPG-Anlage für diese Arbeit ungeeignet. Daher musste ein alternatives System gefunden werden, das in der Lage ist, Partikel mit einer engen Größenverteilung zu erzeugen. Außerdem sollte das System korrosionsbeständig und einfach zu bedienen sein.

Deshalb wurde als nächstes ein Tröpfchengenerator angeschafft, der die genannten Anforderungen erfüllte. Dieser Tröpfchengenerator wurde für die weiteren Experimente in dieser Arbeit zur Herstellung von Partikeln verwendet.

Um die Partikelherstellung im O/W-System zu ermöglichen, wurde für den Tropfengenerator ein hydrophiler Mikrofluidikchip aus Boranglas der Firma *Micronit* (Niederlande) mit einer Düsendröße von 50 μm verwendet (Abbildung 29).

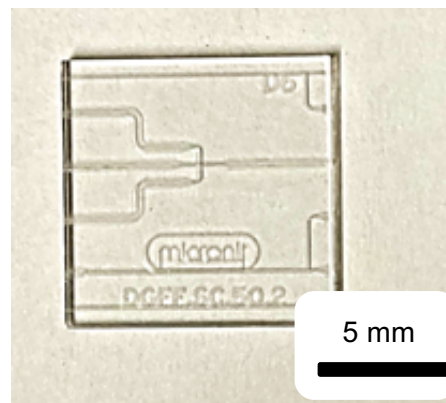


Abbildung 29: Fotoaufnahme des Mikrotröpfchengenerators; Düsendurchmesser 50 μm

Der verwendete Mikrofluidikchip besitzt drei Eingänge auf einer Seite und einen Ausgang auf der gegenüberliegenden Seite. Der mittlere Eingang ist für die disperse Phase und die anderen beiden Eingänge für die kontinuierliche Phase vorgesehen. In diesem Chip ist das *flow focusing*-System (siehe Abbildung 12c, S. 17) eingebaut, um eine O/W-Emulsion zu erzeugen. In der dispersen Phase wird das Partikelmaterial in DCM gelöst und in der kontinuierlichen Phase befindet sich entionisiertes Wasser mit Tensid. Um diese beiden Phasen in den Mikrofluidikchip hineinzubefördern, wird für jede Phase eine Druckpumpe (Abbildung 30a) verwendet. Eine stabile Flussrate ist die wichtigste Voraussetzung für die Herstellung monosphärischer und monodisperser Partikel. Damit die Flussraten der beiden Phasen kontrollierbar bleiben, wird für jede Phase ein Durchflusssensor (Abbildung 30b) eingesetzt.

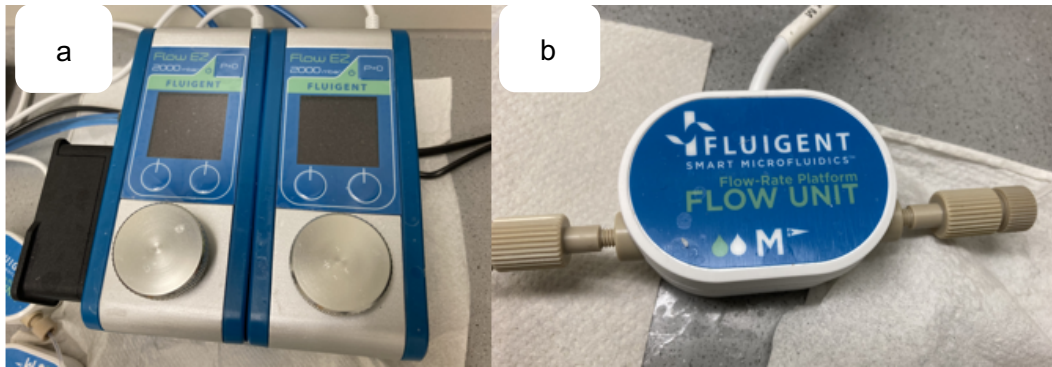


Abbildung 30: Fotoaufnahmen von a. Druckpumpen und b. Durchflusssensor

Abbildung 31 zeigt den vollständigen Aufbau des Partikelgenerators. Die Pumpen erzeugen unter festgelegten Bedingungen einen Überdruck an den jeweiligen Reservoirs der beiden Phasen. Die Flüssigkeiten werden aus den Reservoirs gedrückt und über die Durchflusssensoren zum Mikrofluidikchip transportiert. Die Durchflusssensoren messen die aktuellen Durchflussmengen und geben die ermittelten Daten an das Kontrollsystem weiter. Dieses vergleicht die gemessenen Durchflussmengen mit den Voreinstellungen und passt kontinuierlich die Durchflussmengen durch eine Änderung des Drucks an. Schließlich werden diese beiden Flüssigkeiten in den Mikrofluidikchip gepumpt, wo die Mikrotröpfchen geformt werden. Die Dispersion der dispersen Phase in vereinzelte Tröpfchen wird dabei mit einem Mikroskop beobachtet. Die hergestellten Tröpfchen werden im Sammelbehälter gesammelt. Nachdem das Lösungsmittel vollständig aus den Tröpfchen durch die wässrige Phase in die Gasphase diffundiert ist, bilden sich Partikel.

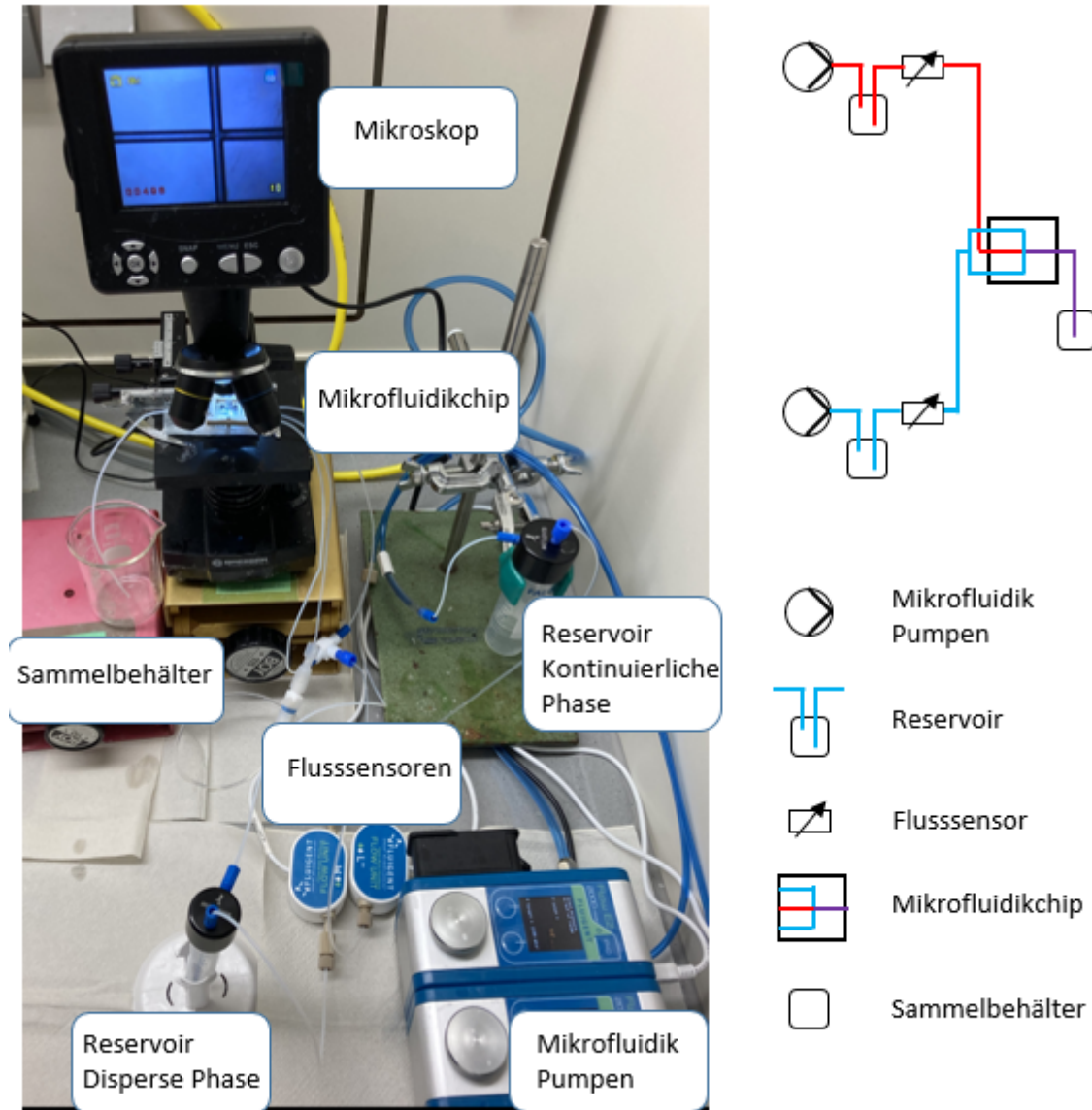


Abbildung 31: Fotoaufnahme und schematische Darstellung des Tröpfchengenerators

Während der Tröpfchenherstellung reagiert der Tröpfchengenerator empfindlich gegenüber externen Faktoren. Eine kurze, leichte Berührung am Aufbau genügt, um die Stabilität der Strömungen aus dem Gleichgewicht zu bringen. Staub und Luftblasen sind ein großes Problem für den Tröpfchengenerator. Der Staub verstopft die Düse und blockiert dadurch den Mikrofluidikchip. Die Luftblasen stören die Strömung und verbreitern so die Größenverteilung der hergestellten Partikel. Aus diesem Grund werden alle Flüssigkeiten immer vor der Verwendung abfiltriert (Abbildung 32) und entgast.

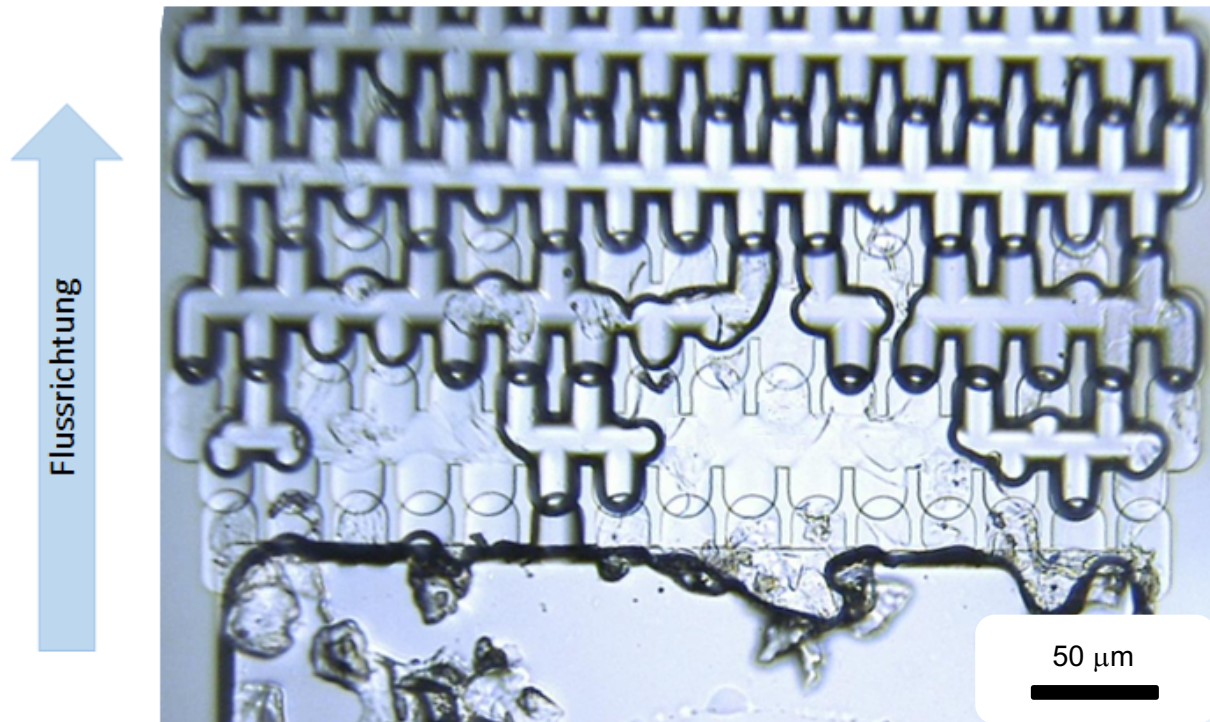


Abbildung 32: Mikroskopische Aufnahme; Kontamination am Filter

Die hergestellten Partikel dienen sowohl als Träger für die Aminosäuren, um diese dann in die Kavitäten zu platzieren, als auch als Lösungsmittel bei der Synthese der Peptidarrays. Dies bedeutet, dass die Diffusionsflexibilität der Aminosäure durch partikuläres Material unter bestimmten Bedingungen gewährleistet sein muss. Bei der Auswahl des Partikelmaterials wurde also darauf geachtet, dass die Aminosäure erst beim Aufschmelzen des Partikels diffundieren kann. Außerdem sollte das Partikelmaterial eine niedrigere Glasübergangstemperatur aufweisen, um die Kupplungsreaktion unter möglichst milden Bedingungen durchführen zu können.

Um das passende Polymer zu finden, wurden Aminosäurediffusionstests mit verschiedenen Polymeren durchgeführt. Die Testpolymere wurden jeweils mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren (50 μmol) in je 1 mL DCM gelöst. Als Kontrolle wurde eine weitere Probenreihe aus reinen Aminosäuren (50 μmol) in je 1 mL DCM hergestellt. Dann wurden diese Proben auf eine mit PEGMA/MMA funktionalisierte Oberfläche eines planaren Objektträgers pipettiert. Nach der Verdampfung von DCM wurden diese sogenannten Spots kurz mit Wasser gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation im Ofen bei 90 °C wurde die Oberfläche des Objektträgers mit Aceton gereinigt und die verbliebenen freien Aminogruppen acetyliert. Zum Schluss wurden die Fmoc-Schutzgruppen der an die Oberfläche gekuppelten Aminosäuren entfernt und die freigewordene Aminogruppe der Aminosäure mit TAMRA-NHS gefärbt. Nach

dem Waschen der überschüssigen Fluorophore wurde das Fluoreszenzsignal mit dem Fluoreszenzscanner analysiert.

Das Matrixpolymer SLEC-7552 hat sich dafür am besten bewährt. Mit diesem Polymer können alle 20 Aminosäuren an die Oberfläche des Objektträgers gekuppelt und diese mittels Fluorophorfärbung sichtbar gemacht werden. Abbildung 33a zeigt das Färberegebnis der Kontrollgruppe und Abbildung 33b stellt das Ergebnis der Aminosäure-Polymer-Mischung dar. Die Signalintensität beider Gruppen ist zum größten Teil deckungsgleich. Hierbei wurde beobachtet, dass im Vergleich mit den anderen Aminosäuren die Signale von Arginin (Arg) geringfügig schlechter detektiert wurden. Dies bedeutet, dass die Aminosäure Arginin entweder schwer an die Oberfläche zu koppeln ist, oder bei diesen Versuchsbedingungen zerfällt. Die Aminosäure Histidin (His) zeigt in beiden Fällen ein überbelichtetes Signal. Im Vergleich zu den anderen Aminosäuren bindet His am besten an die Oberfläche. Die Signale von Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu) und Serin (Ser) im Polymer sind im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer. Dies legt nahe, dass die Diffusion der Aminosäuren Asp, Glu und Ser im Polymer erschwert ist.

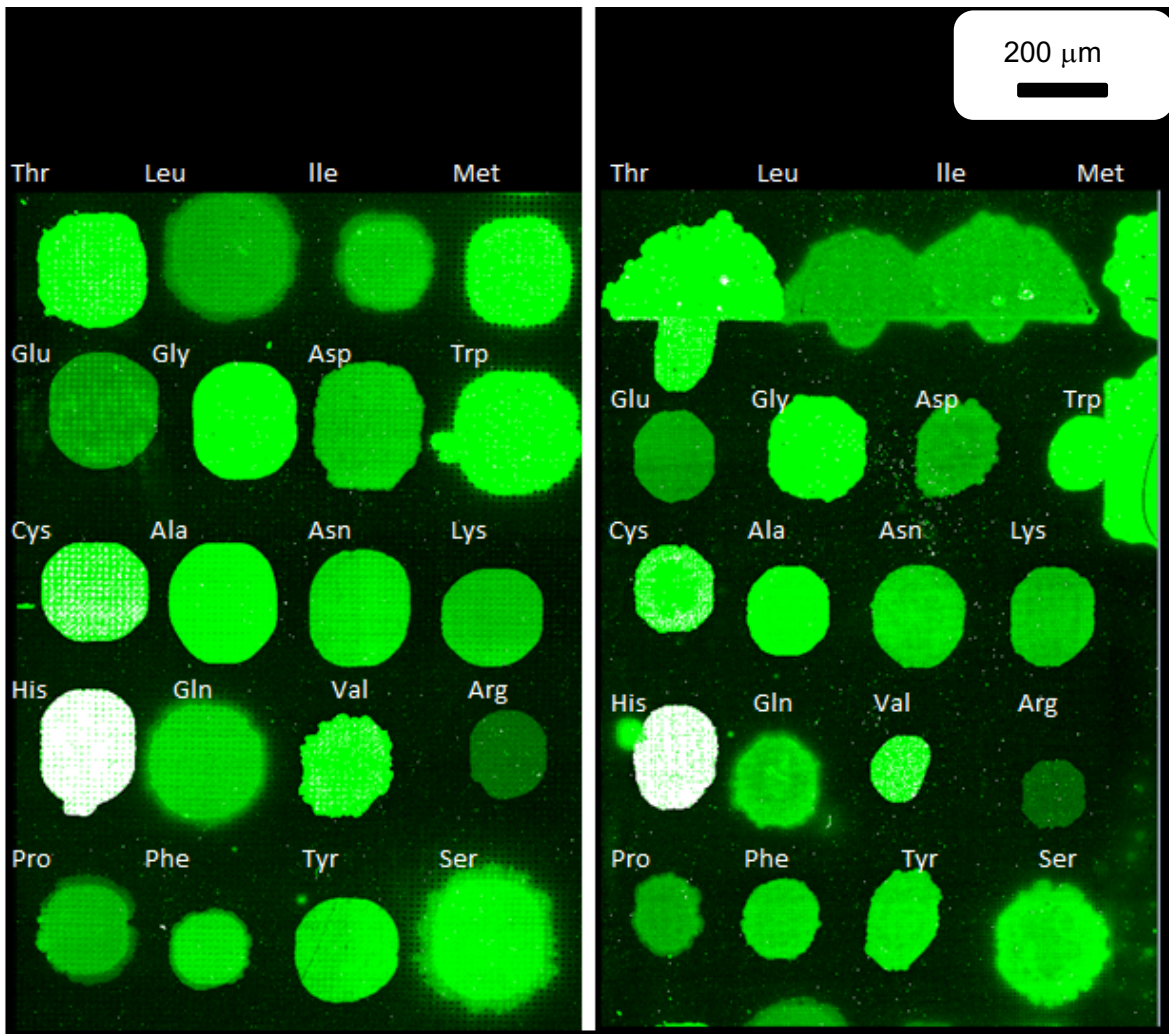


Abbildung 33: Fluoreszenzaufnahmen der TAMRA-Färbung; a. TAMRA-Färbung der reinen Aminosäuren. b. TAMRA-Färbung der Aminosäure im Matrixpolymer SLEC-7552; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 5 µm; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Nachdem das geeignete Polymer gefunden war, wurde die Oberflächenbeschaffenheit der hergestellten Partikel mit REM untersucht. Abbildung 34 zeigt die REM-Aufnahme der Glycin-Polymerpartikel. Die Partikel sind sphärisch und haben jeweils nahezu die gleiche Form und Größe. Außerdem weisen die Partikel eine glatte und geschlossene Oberfläche auf. Die Dellen auf der Oberfläche könnten durch mechanisches Aufbringen von Proben auf den Messtisch entstanden sein.

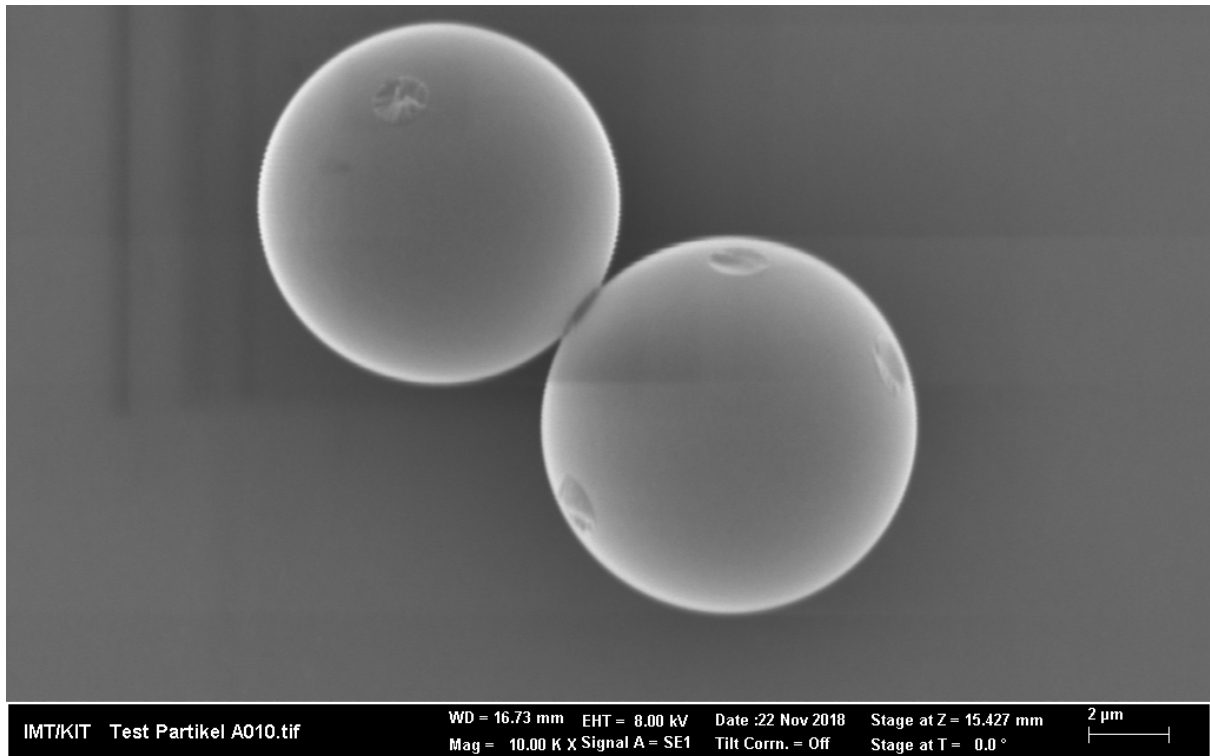


Abbildung 34: REM-Aufnahme von Glycin-Matrixpartikel

3.3.1 Partikelgrößenanpassung

Um sortenreine Peptide in den einzelnen Kavitäten aufbauen zu können, darf in einer 12 μm Kavität nur genau ein Partikel Platz finden. Daher muss bei der Synthese von Partikeln darauf geachtet werden, dass die Partikel einen Durchmesser von 9 ± 2 μm aufweisen. Zur Einstellung der Partikelgröße während der Partikelherstellung können verschiedene Parameter angepasst werden: Die wichtigsten sind die folgenden fünf Parameter.

- Art des Lösungsmittels
- Art des Tensids
- Die Konzentration des Partikelmaterials in der dispersen Phase
- Die Konzentration des Tensids in der kontinuierlichen Phase
- Das Flussratenverhältnis

Art des Lösungsmittels

Bei der Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels ist auf Löslichkeit für die Aminosäure-Bausteine, Löslichkeit im Wasser und Polarität zu achten. Als Lösungsmittel wurden Hexan, Toluol und DCM getestet und DCM wurde für diesen Verfahrensschritt als am besten geeignetes Lösungsmittel bewertet. DCM besitzt im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln eine größere Wasserlöslichkeit. Diese Eigenschaft führt zu einer schnelleren Aushärtung von im Wasser emulgierten Tröpfchen zu Partikeln (über Nacht). Bei Toluol und Hexan dauert dieser Prozess unter optimierten Synthesebedingungen bis zu drei Tage. Dies erhöht die Gefahr der Fusionierung von Tröpfchen. Weiterhin kann DCM alle 20 proteinogenen Aminosäuren restlos auflösen. Toluol und Hexan können dagegen keine polaren Aminosäuren in Lösung bringen. Darüber hinaus (Abbildung 35) führt die Verwendung von Hexan (Probe A) und Toluol (Probe B) als Lösungsmittel bei der Partikelherstellung zu einer vergleichsweise breiten Partikelgrößenverteilung. Die Größe von d_{50} betrug 12,1 μm für Probe A und 14,6 μm für Probe B. Die Größen von d_{90} lag unter 15,6 μm für Probe A und unter 26,7 μm für Probe B.

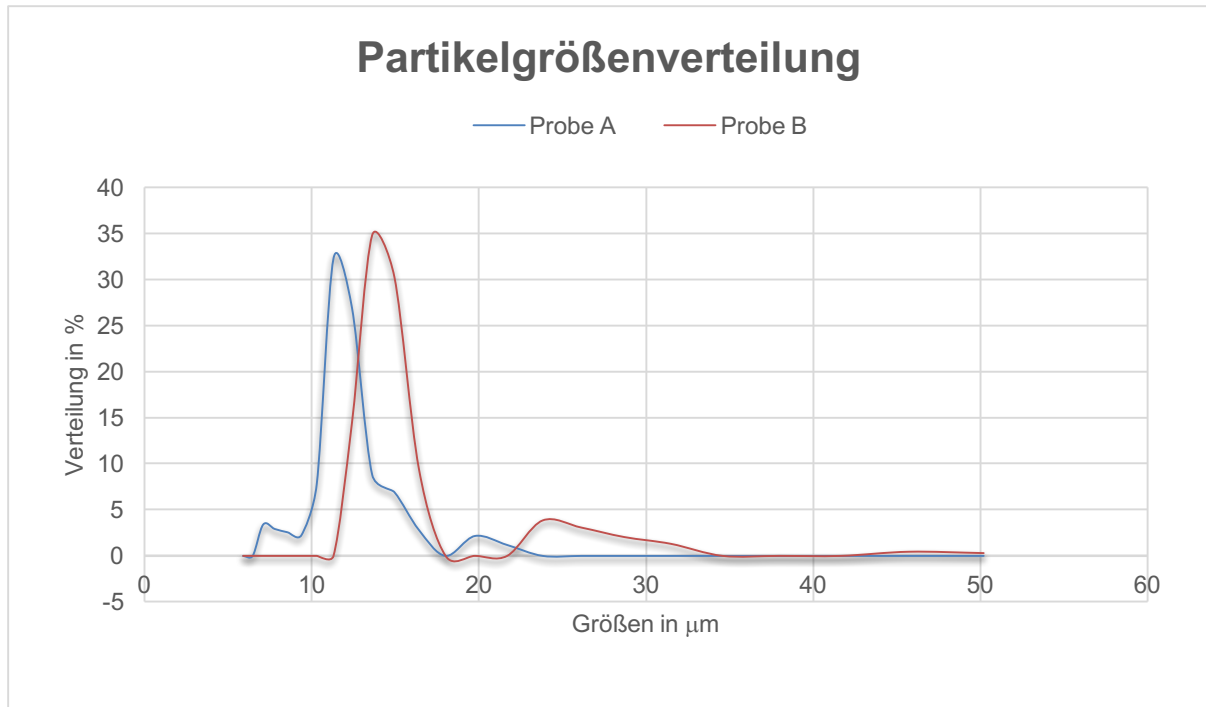


Abbildung 35: Analyse der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von Lösungsmitteln; Probe A: Hexan, Probe B: Toluol; Synthesebedingungen: Polymerkonzentration in DCM: 0,3 mg/mL; Flussrate der dispersen Phase: 0,2 mL/h; Flussrate der kontinuierlichen Phase: 5,0 mL/h; SDS-Konzentration: 1,0 Gew.-%.

Die Kurven der beiden Verteilungsfunktionen sind trimodal. Ein solcher Effekt tritt auf, wenn die erzeugten Tröpfchen nicht ausreichend durch Tensid stabilisiert wurden, wodurch die Tröpfchen miteinander fusionieren. Die längere Schrumpfzeit der Tröpfchen könnte diesen Fusionierungsprozess zusätzlich begünstigen. Die REM-Aufnahme (Abbildung 36) dieser Partikelproben bestätigt die Fusionierung von Tröpfchen. Die fusionierten Partikel haben eine breite Größenverteilung, sind nicht sphärisch und weisen die charakteristische Form eines *Janus*-Partikels auf. Diese Partikel sind nicht für die Mikrofluidik-basierte Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode geeignet.

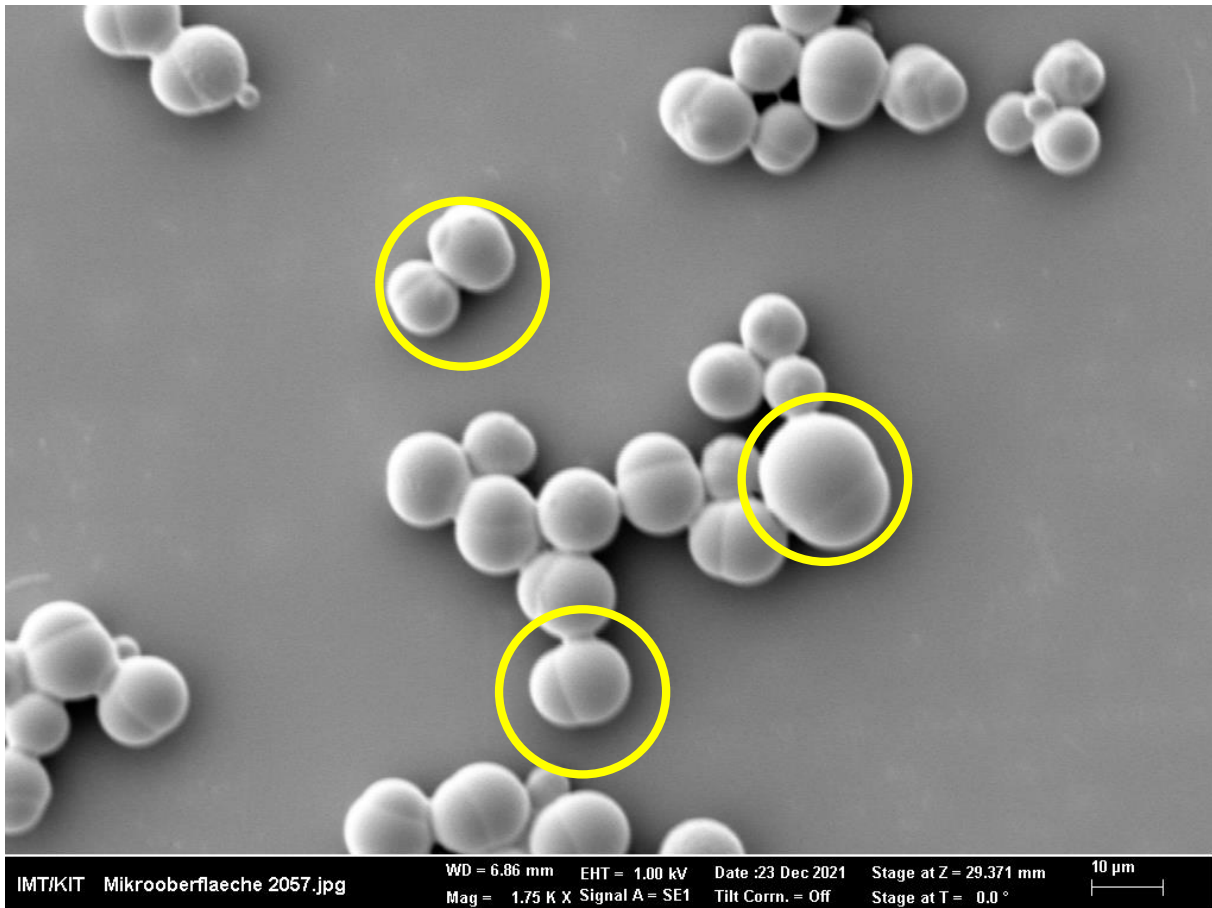


Abbildung 36: REM-Aufnahme der fusionierten Partikel

Art des Tensids

Die Verwendung von Tensid in der kontinuierlichen Phase stabilisiert die frisch erzeugten Tröpfchen im wässrigen Medium und verhindert aufgrund der elektrostatischen Abstoßung die Fusionierung der Tröpfchen. Um ein geeignetes Tensid für die Synthese zu finden, ist der Wert für das Hydrophil-Lipophil-Gleichgewicht (HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance) eine Orientierungshilfe. Demnach wurden Polyvinylalkohol (PVA), Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester (Twin 20™) und das Universaltensid Natrium-dodecylsulfat (SDS) getestet. Alle drei Tenside können zwar für die Herstellung der Partikel verwendet werden. Dennoch wurde das Tensid SDS als die vergleichsweise beste Wahl bewertet.

Der Vorteil von SDS als Tensid macht sich auch bei dem Partikelplatzierungsprozess bemerkbar. Bei der Partikelplatzierung wird die Partikelsuspension auf die Oberfläche des Kavitätenträgers aufgetragen. Beim Abziehen der Flüssigkeit bildet sich auf der Oberfläche ein dünner Tensidfilm. Dieser Film muss anschließend entfernt werden, sonst erschwert das Tensid sowohl das Lesen des Codes als auch die Kupplungsreaktion. Um PVA vollständig von der Oberfläche zu entfernen, muss kochendes Wasser verwendet werden. Da das verwendete Partikelpolymer eine niedrige Glasübergangstemperatur von 60°C aufweist, könnte der

Kontakt mit kochendem Wasser zu einem unerwünschten Aufschmelzen des Polymers und zur Zerstörung der Aminosäure-Bausteine führen. Außerdem fällt PVA bei Kontakt mit Aceton sofort aus, das führt beim Reinigen des Mikrofluidikchips häufig zu Verstopfung von Kanälen (Abbildung 37). Bei gleicher Konzentration von SDS und Twin 20™ stabilisiert Twin 20™ die Tröpfchen schlechter als SDS. Aus den obengenannten Gründen wurde deshalb das Tensid SDS für die Partikelherstellung gewählt.

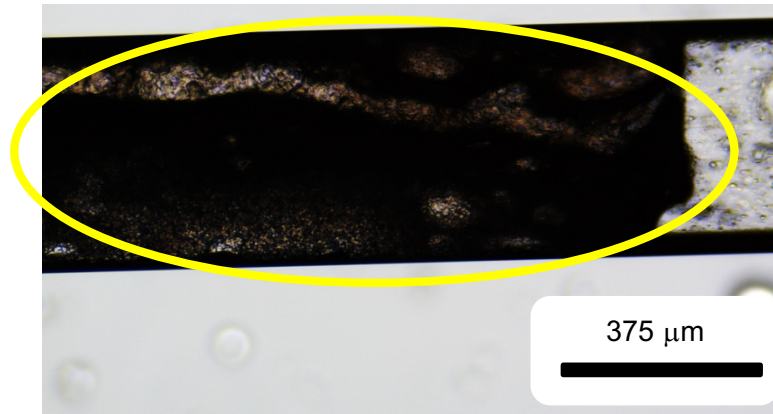


Abbildung 37: Mikroskopische Aufnahme. Verstopfung des Kanals durch ausgefallenes PVA

Die Konzentration des Partikelmaterials in der dispersen Phase

Die Konzentration des Partikelmaterials in der dispersen Phase hat einen direkten Einfluss auf die Partikelgröße. Bei konstanten Flussraten werden die Partikel umso größer, je konzentrierter die disperse Phase ist. Abbildung 38 zeigt die Analysedaten der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit der Polymerkonzentration in DCM. Hier wurde einmal eine Polymerkonzentration Probe A von 0,3 mg/mL und einmal Probe B 0,6 mg/mL in DCM gelöst. Die Flussrate der dispersen Phase betrug jeweils 0,1 mL/h. Die Größenverteilung von Partikeln lag bei Probe A zwischen ca. 5-14 μm und bei Probe B bei ca. 18-30 μm . Die Größe von d_{50} stieg von 8,3 μm (Probe A) auf 15,4 μm (Probe B) und die Größe von d_{90} stieg von 10,8 μm (Probe A) auf 19,7 μm (Probe B). Durch Erhöhung der Materialkonzentration wurde häufig beobachtet, dass in der dispersen Phase eine verstärkte Blasenbildung auftrat. Diese Blasen verstopfen den Mikrofluidik-Kanal und stören so die Stabilität der Flüssigkeiten der beiden Phasen. Dies führt zu einer vergleichsweise breiten Größenverteilung der Partikel. Nach mehrmaligen Anpassungen an die Synthesebedingungen zeigte sich, dass die Konzentration des partikulären Materials zwischen 0,2-0,3 mg/mL liegen sollte.

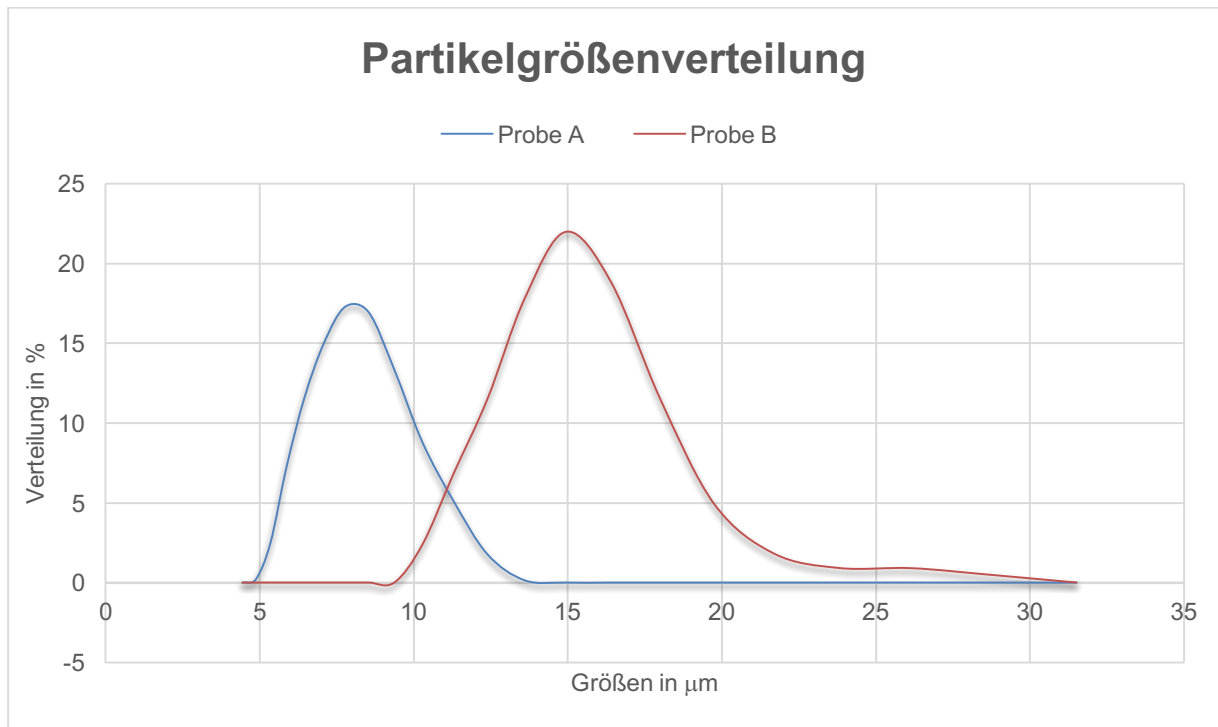


Abbildung 38: Analyse der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit der Polymerkonzentration in DCM; Probe A: 0,3 mg/mL, Probe B: 0,6 mg/mL. Synthesebedingungen: Flussrate der dispersen Phase: 0,1 mL/h; Flussrate der kontinuierlichen Phase: 5,0 mL/h. SDS-Konzentration: 1,0 Gew.-%

Während der Partikelsynthese wurden zunächst häufig geplatze Partikel beobachtet (Abbildung 39). Das Platzen von Partikeln könnte möglicherweise bei der Aushärtung von Tröpfchen zu Partikel passieren. Eine mögliche Ursache könnte an das gestörte Gleichgewicht des Härtings-/Schrumpfungsverhältnisses liegen. D.h. die Tröpfchen härten schneller aus als die Diffusion des DCM aus den Tröpfchen in das umgebende wässrige Medium erfolgt. Dadurch baut sich im Inneren des Partikels ein Druck auf, der schließlich die Partikel zum Platzen bringt, wenn überschüssiges DCM aus dem Inneren der Partikel herausdrängt.

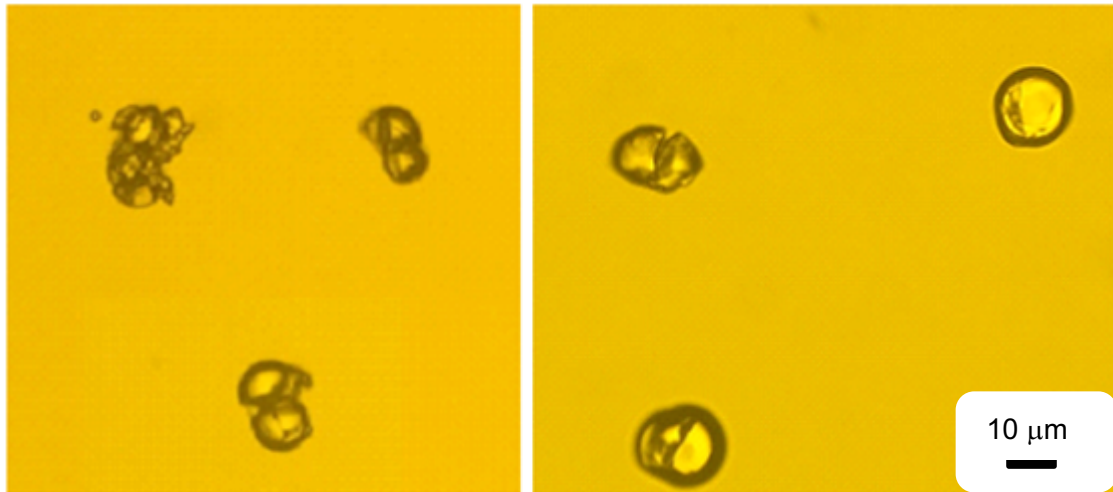


Abbildung 39: Mikroskopische Aufnahmen von geplatzten Partikeln. SDS Konzentration: 1,0 Gew.-%

Die Konzentration des Tensids in der kontinuierlichen Phase

Um das Platzen der Partikel zu vermeiden, müssen die Tröpfchen in Wasser durch das Tensid besser stabilisiert werden. Eine Erhöhung der Tensidkonzentration führt zur Bildung kleinerer Tröpfchen. Die kleineren Tröpfchen haben ein besseres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis als die großen Tröpfchen. Das bedeutet, dass das vorhandene DCM schneller aus den kleinen Tröpfchen in die wässrige Phase diffundieren kann als aus den großen Tröpfchen, was ein Platzen des Partikels verhindern könnte. In diesem Fall wurde die SDS-Konzentration in der kontinuierlichen Phase auf bis zu 5 Gew.-% erhöht. Nach der Anpassung der Tensidkonzentration wurden nicht nur keine geplatzte Partikel mehr gefunden, sondern die hergestellten Partikel waren homogener und kleiner (Abbildung 40). Die Größe von d_{50} ging von $11,5 \mu\text{m}$ (Probe A) auf $9,4 \mu\text{m}$ (Probe B) zurück und die Größe von d_{90} sankt von ca. $12,7 \mu\text{m}$ (Probe A) auf ca. $10,5 \mu\text{m}$ (Probe B). Ab 5 Gew.-% SDS erfolgte keine weitere Verbesserung hinsichtlich der Partikelgröße.

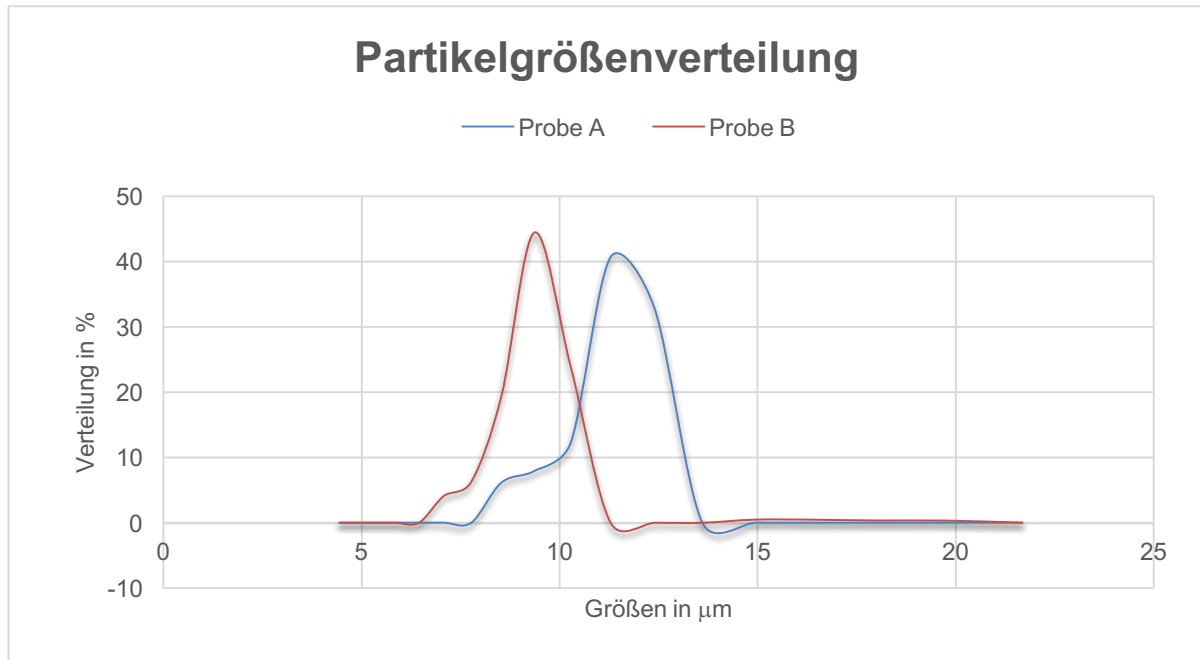


Abbildung 40: Analyse der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit der Tensidkonzentration; Probe A: 4,0 Gew.-% SDS, Probe B: 5,0 Gew.-% SDS; Polymerkonzentration in DCM: 0,2 mg/mL; Flussrate der dispersen Phase: 0,2 mL/h; Flussrate der kontinuierlichen Phase: 5,0 mL/h

Das Flussratenverhältnis

Die Anpassung des Flussratenverhältnisses der beiden Phasen hat direkten Einfluss auf die Größe der erzeugten Tröpfchen. Je schneller die disperse Phase bzw. je langsamer die kontinuierliche Phase ist, desto größer werden die Partikel und umgekehrt. Um einen Anhaltspunkt zu haben, wurde für die kontinuierliche Phase eine feste Flussrate von 5,0 mL/h gewählt. Durch Anpassung der Flussrate der dispersen Phase wurde die Partikelgröße angepasst.

Abbildung 41 zeigt die Analysedaten der Partikelgrößenverteilung. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Flussraten der dispersen Phase, Tröpfchen hergestellt. Durch die erhöhte Flussrate der dispersen Phase wurde die Größe von d_{50} von etwa 9,4 µm auf ca. 10,2 µm erhöht und die Größe von d_{90} -Wert stieg von ca. 10,5 µm auf ca. 11,7 µm an. Nach Optimierung und Anpassung der Synthesebedingungen und unter Berücksichtigung des Reservoirvolumens der kontinuierlichen Phase wurde eine Flussrate der dispersen Phase auf 0,2 mL/h eingestellt.

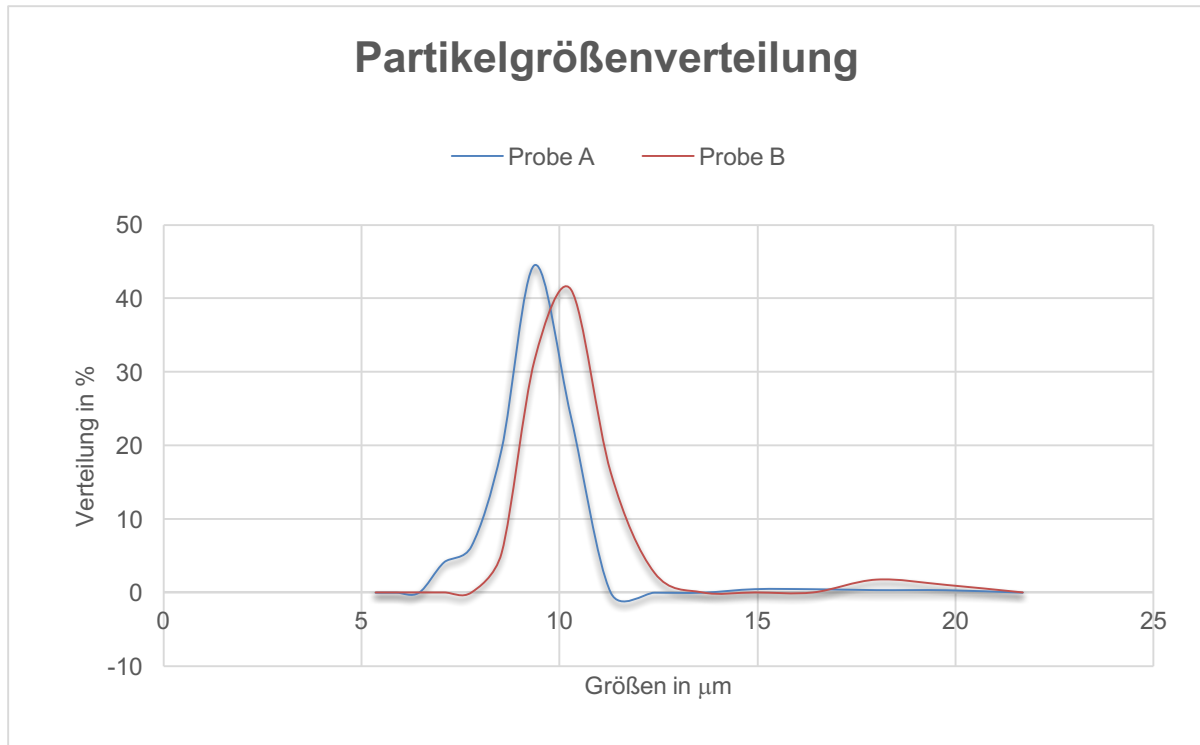


Abbildung 41: Analyse der Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit der Flussrate der dispersen Phase; Polymerkonzentration in DCM: 0,2 mg/mL; Probe A: Flussrate der dispersen Phase: 0,2 mL/h. Probe B: Flussrate der dispersen Phase: 0,3 mL/h. Flussrate der kontinuierlichen Phase: 5,0 mL/h; SDS-Konzentration: 5,0 Gew.-%

Um Partikel mit einer Größenverteilung von $9 \pm 2 \mu\text{m}$ herstellen zu können, müssen folgenden Parameter angehalten werden.

- | | |
|--|---------------|
| • Lösungsmittels | DCM |
| • Tensids | 5 Gew.-% SDS |
| • Polymerkonzentration | 0,2-0,3 mg/mL |
| • Flussrate der dispersen Phase | 0,2 mL/h |
| • Flussrate der kontinuierlichen Phase | 0,5 mL/h |

3.3.2 Aminosäurebeladung

Nachdem die Syntheseparameter der Partikel optimiert wurden, wurde mit der Beladung des Partikels mit Aminosäure-Bausteinen experimentiert. Da die Aminosäuren unterschiedliche molare Massen M aufweisen, wurden alle Aminosäuren mit den gleichen Stoffmengen n von $10 \mu\text{mol}$ verwendet, mit denen die Partikel dann beladen wurden. Tabelle 3 zeigt die Einwaage der verwendeten Aminosäuren (Hierzu wurden die mit OPfp-Ester aktivierten und mit den orthogonalen Schutzgruppen geschützten Aminosäure-Bausteine verwendet).

Tabelle 3: Einwaage von Aminosäuren.

Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile
4,7 mg	8,1 mg	7,6 mg	5,7 mg	7,5 mg	7,7 mg	5,9 mg	4,6 mg	7,8 mg	5,2 mg
Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
5,2 mg	6,3 mg	5,3 mg	5,5 mg	5,0 mg	5,5 mg	5,6 mg	6,9 mg	6,2 mg	5,0 mg

Bei kleinen Aminosäuren wie Glycin und Alanin wurden bei $n > 12 \mu\text{mol}$ die Kristallisation von Aminosäure in der Partikelsuspension nach der mikrofluidischen Herstellung der Aminosäurepartikel beobachtet (Abbildung 42). Diese Kristallisation muss vermieden werden, da diese Kristalle zur Kontamination der Peptidarrays mit unerwünschten Aminosäure-Bausteinen führen könnte. Aus diesem Grund muss die Menge an Aminosäure im Partikel unterhalb von $12 \mu\text{mol}$ gehalten werden.

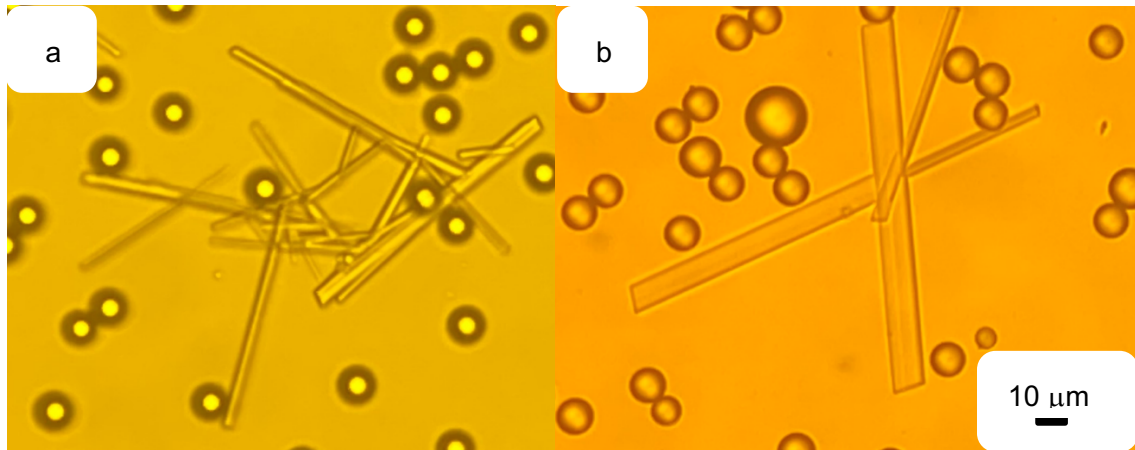


Abbildung 42: Mikroskopische Aufnahme von a Alaninkristall, b Glycinkristall in der Partikelsuspension.

Nach der Herstellung der Aminosäure-Partikel muss überprüft werden, ob die Aminosäuremoleküle im Partikel weiterhin intakt sind. Diese Prüfung ist notwendig, da der OPfp-Ester der Aminosäure wasserempfindlich ist und sowohl die Herstellung als auch die Lagerung der Partikel im Wasser erfolgt.

Die Prüfung wurde auf einer Fmoc-entschützten mit PEGMA/MMA funktionalisierten planaren Oberfläche eines Objektträgers durchgeführt.^[94] Die 20 unterschiedlichen Aminosäurepartikel wurden mit einem Peptidreaktor (Abbildung 43) der Firma *Supelco* (USA) frei von SDS gewaschen und anschließend jeweils auf zwei Objektträger aufgebracht. Ein Objektträger wurde danach direkt im Ofen umgesetzt. Der andere wurde zuerst 5 Minuten in Acetondampf inkubiert und dann im Ofen zur Reaktion gebracht. Nach Acetylierung und Entschützung der Fmoc-Gruppe von den gekuppelten Aminosäuren wurden diese Aminosäuren mit dem Fluorophor TAMRA-NHS gefärbt.



Abbildung 43: Fotoaufnahme des Peptidreaktors

Entsprechend den Färbeergebnissen (Abbildung 44) führt die zusätzliche Inkubation der Probe in Acetondampf zu besseren Kupplungsergebnissen. Mittels TAMRA-Färbung konnten fast alle Aminosäuren sichtbar gemacht werden. Das bedeutet, dass die Aminosäuren im Partikel weiterhin intakt sind. Allerdings zeigt die Aminosäure Glutaminsäure (Glu) ein schwaches Signal, die Asparaginsäure (Asp) auf beiden Oberflächen (Abbildung 44a und 44b) kaum Signale und Arginin (Arg) gar kein Signal. Ein Vergleich mit dem Kupplungsexperiment (siehe Abbildung 33, S. 43) der Aminosäure-Matrix-Mischung zeigt, dass die Aminosäure im Partikel generell schlechter an die Oberfläche kuppelt. Mögliche Ursachen könnten sein, dass die Konzentration der Aminosäure im Partikel deutlich niedriger war als die der Aminosäure im Aminosäure-Matrix-Gemisch. Außerdem könnte ein Teil der Aminosäure während der Partikelherstellung und -lagerung zerfallen.

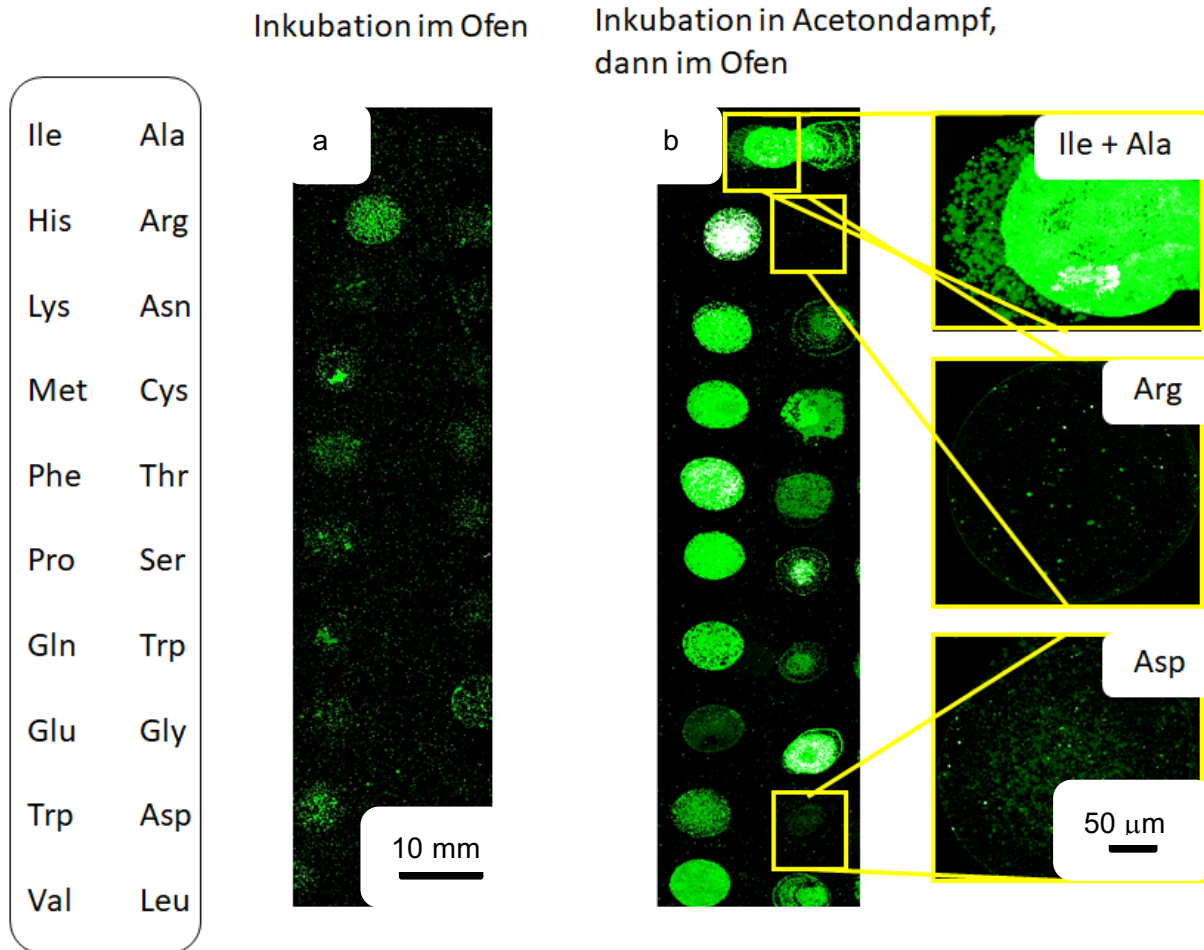


Abbildung 44: Fluoreszenzaufnahme der TAMRA-Färbung; a. nur Ofeninkubation, b. Inkubation in Acetondampf und im Ofen; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μ m; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

3.3.3 Partikelcodierung

Die Herstellung von hochdichten Peptidarrays mit der Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode soll in der Zukunft kombinatorisch erfolgen. Demzufolge muss jedes Aminosäurepartikel eindeutig nachweisbar sein. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen diese 20 Aminosäurepartikel eindeutig codiert werden. Die Codierung ist notwendig, um die in den jeweiligen Kavitäten hergestellten Aminosäuresequenzen des Peptids nach der Herstellung des Peptidarrays anhand ihres jeweiligen Codierungssignals auslesen zu können. Die resultierenden Ergebnisse werden verwendet, um eine Peptidbibliothek aufzubauen.

Bei der Codierung von Partikeln stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl: Der Gebrauch von QDs oder Verwendung von organischen Fluorophoren. Als Erstes wurde die Codierung via QDs getestet. Die hydrophilen und hydrophoben QDs wurden jeweils mit dem Matrixpolymer SLEC-7552 in DCM aufgenommen und anschließend auf der Oberfläche eines Fmoc-entschützt, mit PEGMA/MMA funktionalisierten, planaren Objektträgers aufgetragen. Danach wurde dieser Objektträger im Ofen bei 90 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation im Ofen wurde der Objektträger jeweils vor (Abbildung 45a) und nach (Abbildung 45b) dem Waschen in Aceton mit einem Fluoreszenzscanner analysiert. Die in Aceton lösliche Matrixpolymer SLEC-7552 konnte vollständig von der Oberfläche des Objektträgers entfernt werden. Trotzdem wurden nach dem mehrfachen Waschen immer noch starke QD-Signale auf der Oberfläche dieses Objektträgers nachgewiesen. Dies bedeutet, dass die QDs sich im PEGMA/MMA-Polymerfilm des Objektträgers einlagern und durch Waschen nicht mehr entfernt werden können. Dies hätte zur Folge, dass immer einige der QDs nach jedem Kupplungszyklus im Polymerfilm des Objektträgers haften bleiben und somit zunehmend falsche Fluoreszenzsignale verursachen.

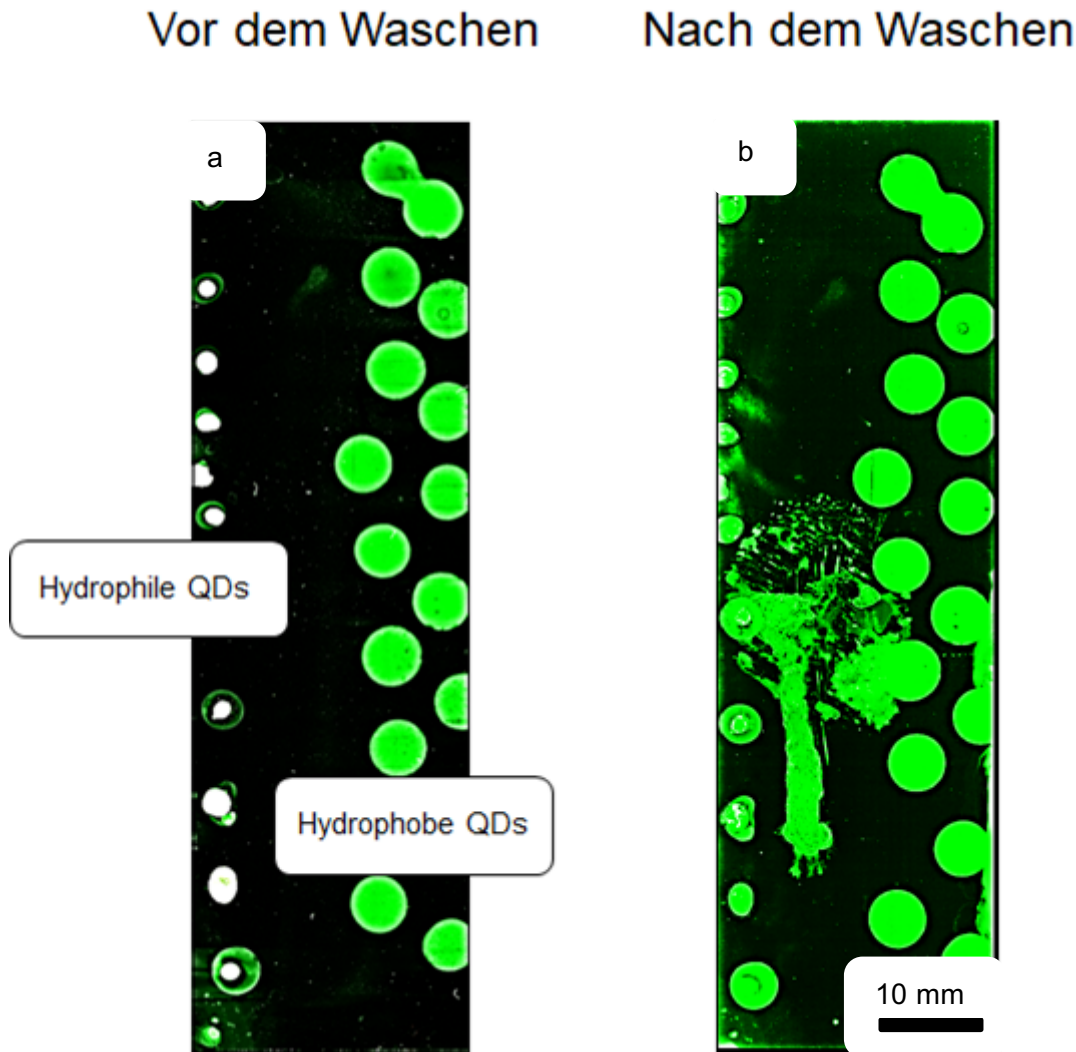


Abbildung 45: Fluoreszenzaufnahmen von QDs in der Matrix auf der Oberfläche eines Fmoc-etschützt, mit PEGMA/MMA funktionalisierten Objektträgers; Hydrophile und hydrophobe QDs in der Matrix a. vor dem Waschen und b. nach dem Waschen im Ultraschallbad mit Aceton; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 5 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Während der Partikelcodierung wurde außerdem die Sedimentation der QDs sowohl in der Leitung, als auch im Reservoir der dispersen Phase beobachtet. Dies führte zu einer inhomogenen Codierung der Partikel. Außerdem wurde eine verstärkte Blasenbildung in der dispersen Phase beobachtet (Abbildung 46). Dadurch wurde die Tröpfchenbildung stark gestört, wodurch die Größenverteilung der Partikel stark verbreitert.

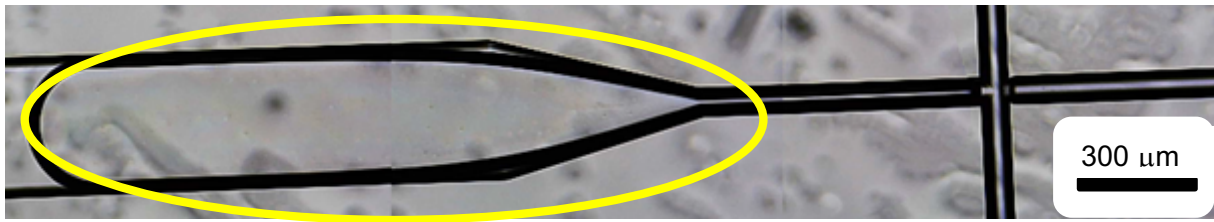


Abbildung 46: Mikroskopische Aufnahme von Luftblasen im Mikrofluidikchip; Die Luftblase blockiert den Kanal der dispersen Phase; Flussrichtung von links nach rechts

Um ein Verstopfen der Düse im Mikrofluidikchip mit Staub und Fasern zu vermeiden, müssen die Flüssigkeiten der beiden Phasen mit den Spritzenfiltern abfiltriert werden. Hierzu wurde ein Teil der QDs abfiltriert. Aus den oben genannten Beobachtungen heraus ist die Codierung von Partikeln mit QDs für die Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode nicht geeignet.

Als Nächstes wurde die Codierung mit organischen Fluorophoren getestet. Die Auswahl an Fluorophoren ist groß und muss auf das Analysegerät abgestimmt werden. Der verwendete Fluoreszenzscanner hat drei Anregungswellenlängen, nämlich bei 488 nm, 532 nm und 635 nm. Die organischen Fluorophoren haben einen breiten Absorptions- und Emissionsbereich. Signalüberlappung von verschiedenen Fluorophoren ist daher prinzipiell möglich. Dieses Problem kann aber durch die Verwendung geeigneter Filter gelöst werden. *Abbildung 47*^{modifiziert nach [95]} zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren der drei möglichen Codierungskandidaten. Die gestrichelten Linien sind die Anregungsspektren und die durchgezogenen Linien sind die Emissionsspektren. Die schmalen vertikalen Linien sind die Anregungswellenlängen des Scanners und die breiten vertikalen Linien sind die verwendeten Filter. Das grüne Spektrum stammt von BDP-FL-Amin, das gelbe Spektrum von TAMRA-Amin und das rote Spektrum von Cyanin-5-Amin.

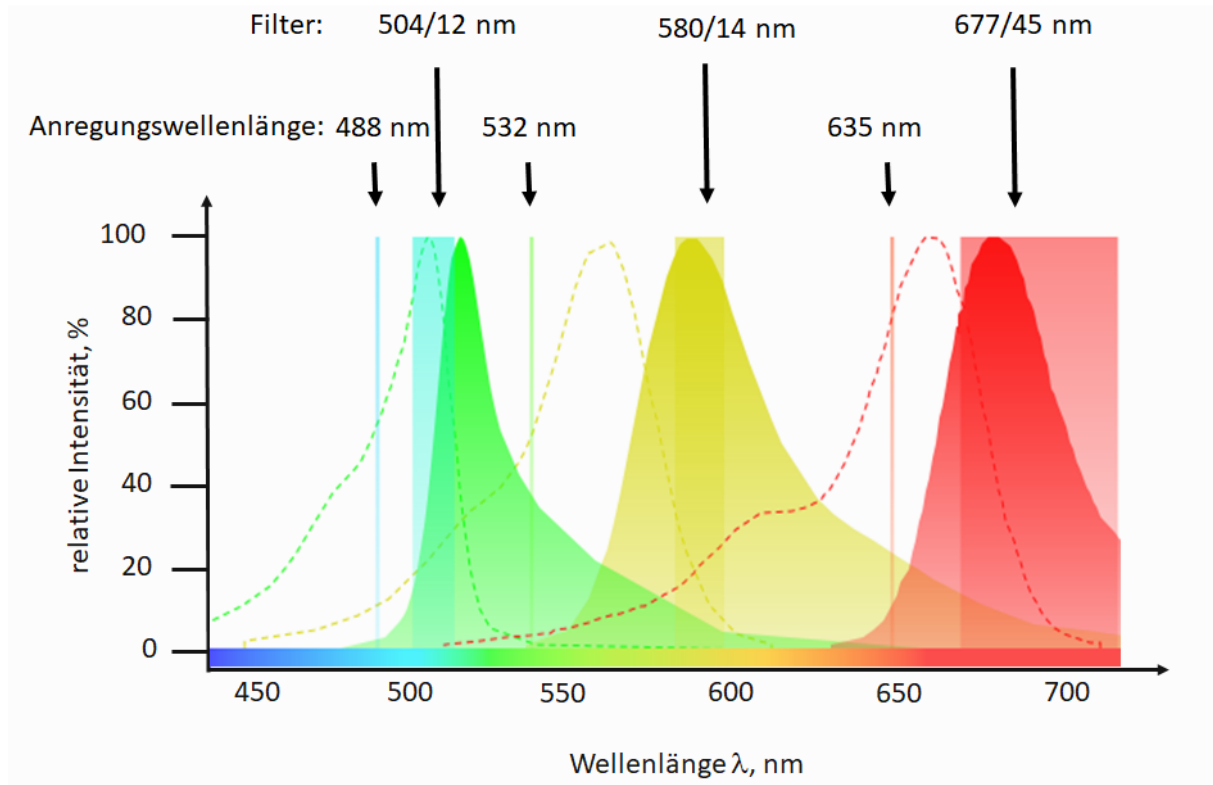


Abbildung 47: Fluoreszenzspektrale Überlappung von BDP-FL-Amin (hier Grün), TAMRA-Amin (Gelb) und Cyanin 5-Amin (Rot) ^{modifiziert nach [95]}

Die Emissionsspektren der Fluorophore überlappen sich. Bei der Kombination von geeigneten Filtern konnte dieses Signalüberlappungsproblem jedoch minimiert werden. Um die eindeutige Unterscheidbarkeit der drei Fluorophore voneinander zu überprüfen, wurden diese drei Fluorophore (je 0,1 mg) jeweils mit 100 mg Matrixpolymer SLEC-7552 in 1 mL DCM gelöst und anschließend wie bei dem Test mit den QDs auf eine Fmoc-entschützte mit PEGMA/MMA funktionalisierte planare Oberfläche eines Objektträgers pipettiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde mit dieser Oberfläche ein Kupplungszyklus durchgeführt. Jeweils vor und nach dem Waschen wurde die Oberfläche mit den in Tabelle 4 aufgeführten Parametern untersucht. Das Fluoreszenzbild der drei Fluorophore ist in Abbildung 48 dargestellt. Im Unterschied zu den QDs (Abbildung 45, S. 58) können die verwendeten organischen Fluorophoren auch nach der Kupplung im Ofen restlos von der Oberfläche entfernt werden.



Abbildung 48: Fluoreszenzaufnahme von drei Fluorophoren in allen drei Kanälen, Blau: DBP-FL-Amin, Grün: TAMRA-Amin und Rot: Cyanin 5-Amin; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge: 488 nm, Filter: 504/12 nm; Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 580/14 nm, Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: 677/45 nm; Auflösung: 5 μm

Tabelle 4: Scanparameter des jeweiligen Fluorophors

Fluorophor	Anregungswellenlänge (nm)	Filter (nm)
BDP-FL-Amin	488	504/12
TAMRA-Amin	532	580/14
Cyanin-5-Amin	635	677/45

Um eine mögliche Signalüberlappung zwischen den Fluorophoren zu überprüfen, wurden die Fluorophoren in jeweiligen Kanal mit allen drei Anregungslaser separat analysiert (Abbildung 49). Die Fluorophore TAMRA-Amin (Abbildung 49b) und Cyanin-5-Amin (Abbildung 49c) waren jeweils nur in einem Kanal nachweisbar. Das Fluorophor BDP-FL-Amin dagegen konnte sowohl im Blaukanal (Abbildung 49a) als auch im Grünkanal (Abbildung 49b) detektiert werden. Das Signal im Grünkanal von BDP-FL-Amin war jedoch sehr schwach. Der in Abbildung 49b sichtbare Rand entspricht dem überbelichteten Bereich im Blaukanal. Das deutet darauf hin, dass BDP-FL-Amin nur in überhöhter Konzentration im Grünkanal detektierbar ist. Demzufolge sind alle drei Fluorophore jeweils mit einem Anregungslaser eindeutig voneinander getrennt nachweisbar. Bei Verwendung von BDP-FL-Amin ist jedoch darauf zu achten, dass BDP-FL-Amin nur in geringer Konzentration mit dem Fluorophor TAMRA-Amin kombinierbar ist.

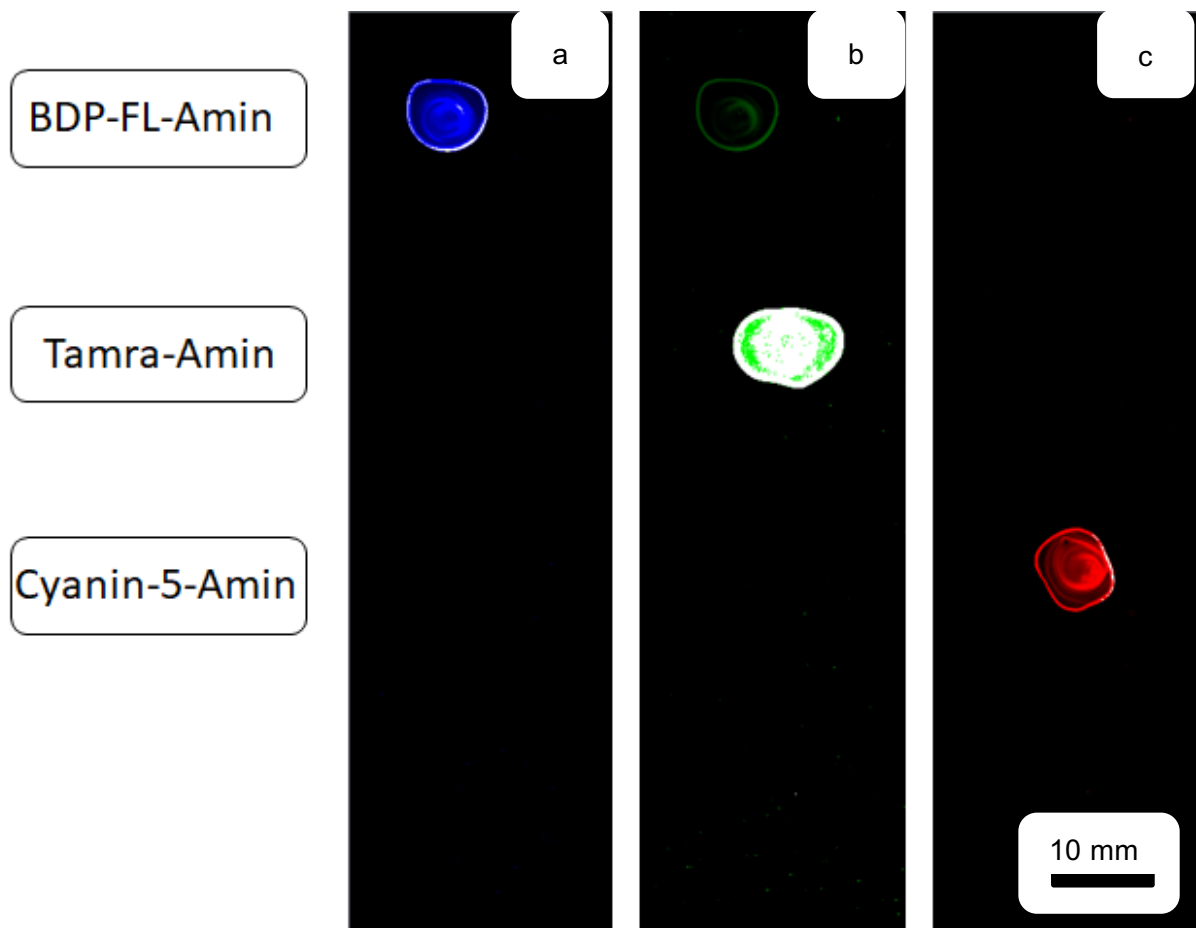


Abbildung 49: Fluoreszenzaufnahmen von drei Fluorophoren in jeden der Kanälen; a. im Blaukanal, b. im Grünkanal, c. im Rotkanal; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge: 488 nm, Filter: 504/12 nm; Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 580/14 nm, Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: 677/45 nm; Auflösung: 5 μm

Mit drei Fluorophoren können 7 Codekombinationen generiert werden. Um jedoch alle 20 Partikelsorten codieren zu können, werden mehr Codes benötigt. Da der Scanner nur über drei Anregungswellenlängen verfügt und Fluorophore ein breites Absorptions- und Emissionsspektrum aufweisen, können keine weiteren Fluorophore verwendet werden. Um dennoch 20 Aminosäure-Partikel mit drei Fluorophoren codieren zu können, können mit dem Konzentrationsunterschied von Fluorophoren diese zusätzlichen Codes bereitgestellt werden.

Die vorherige Abbildung zeigt, dass die Fluorophore TAMRA-Amin und Cyanin-5-Amin nur jeweils in einem Kanal nachweisbar sind, auch wenn einige der Signale überbelichtet sind. Nur das Fluorophor BDP-FL-Amin weist im überbelichteten Zustand im Grünkanal ein schwaches Signal auf. Dies bedeutet, dass für jeden Kanal das gleiche Fluorophor zumindest in zwei unterschiedlichen Konzentrationen verwendet werden kann. Bei einer niedrigen Fluorophor-Dosis werden die Signale der Fluorophoren beim Scannen als normal exponiert angezeigt, bei einer Überdosierung von Fluorophoren hingegen als Überbelichtet dargestellt. Diese beiden Signale können mit einem Scanner eindeutig voneinander unterschieden werden. Mit der Zwei-Konzentrations-Codierung können insgesamt 21 Code-Kombinationen generiert werden.

Die verwendeten organische Fluorophoren sind alle hydrophil. Da die Herstellung von Partikel in einem O/W-System stattfindet, müssen die Fluorophoren hydrophober gemacht werden, um eine Diffusion während der Partikelherstellung ins wässrige System zu verhindern.

Die verwendeten Aminosäuren werden alle jeweils mit einem OPfp-Ester aktiviert und mit unpolaren Schutzgruppen gegen unerwünschten Nebenreaktionen gesichert. Diese aktivierten Aminosäuren können direkt mit der Aminogruppe eines anderen Moleküls umgesetzt werden. Dadurch können Aminderivate der zur Partikelcodierung verwendeten Fluorophore eine kovalente Bindung mit den im großen Überschuss vorhandenen OPfp-Ester-aktivierten Aminosäuren eingehen. Die hydrophile Tendenz des Fluorophors kann mit den hydrophoben Resten der Aminosäure kompensiert werden. Dieser hydrophobe Bestandteil verankert die Fluorophore in dem hydrophoben Inneren der Partikel, während der hydrophile Teil der Fluorophore – ähnlich wie die verwendeten Tenside – in die wässrige Phase ragt. Dies hat den Vorteil, dass die Menge an eingelagertem Fluorophor nur mit der zweiten Potenz des Partikeldurchmessers skaliert, da sich die Fluorophore aufgrund ihrer amphipatischen Eigenschaften an die Partikeloberfläche anlagern. Diese Art der Fluoreszenz-Codierung ermöglicht die Verwendung von Partikeln mit einer etwas weniger stringenten Größenverteilung. Unter den gleichen Herstellungsbedingungen werden Fluorophore mit anderen Derivaten (Abbildung 50a) im Partikel weniger absorbiert als Fluorophore mit Aminderivaten (Abbildung 50b). Dieser Kenntnis nach werden für die Codierung von Partikeln nur Fluorophore mit der Aminfunktionalisierung verwendet.

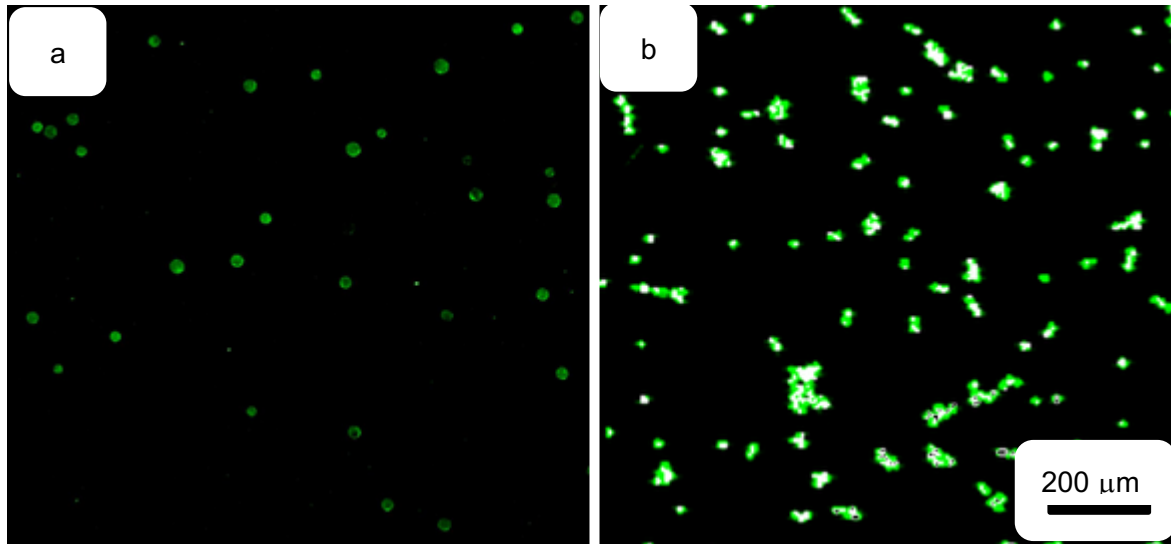


Abbildung 50: Fluoreszenzaufnahmen von Partikeln; a. Fluoreszenzbild des Partikels mit TAMRA-NHS; b. Fluoreszenzbild des Partikels mit TAMRA-Lysin-Komplex; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 580/14 nm, Auflösung: 2 μm ; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Um die Intensität des Fluoreszenzsignals von codierten Partikeln analysieren zu können, wurden die Partikel mittels Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence-activated cell scanning) *CytoFLEX S* von *Beckman* (USA) analysiert.

Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Analyse unter den gleichen Messbedingungen wie beim Fluoreszenzscanner durchgeführt wird (gleiche Anregungswellenlänge und Filter). Hierfür wurden 5 verschiedene Partikelsorten mit den Fluorophoren eindeutig markiert und für die FACS-Analyse vorbereitet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Partikelcodes für FACS-Analyse

Aminosäure in Partikel			Codes	
1	Lysin	schwaches Blau	-	-
2	Prolin	-	-	starkes Rot
3	Isoleucin	-	schwaches Grün	schwaches Rot
4	Valin	-	starkes Grün	schwaches Rot
5	Leucin	schwaches Blau	schwaches Grün	starkes Rot

Zunächst wurden nichtcodierte Partikel gemessen, um die Hintergrundsignale zu erfassen (Abbildung 51). Anhand dieses Ergebnisses konnte die Fluoreszenzintensität der Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU: Relative fluorescence units:) von codierten Partikeln mit den Hintergrundsignalen verglichen werden. Diese dienen als Referenzwert um festzustellen wie stark das Fluoreszenzsignal der einzelnen Partikel jeweils durch die Zugabe der Fluorophoren erhöht wird.

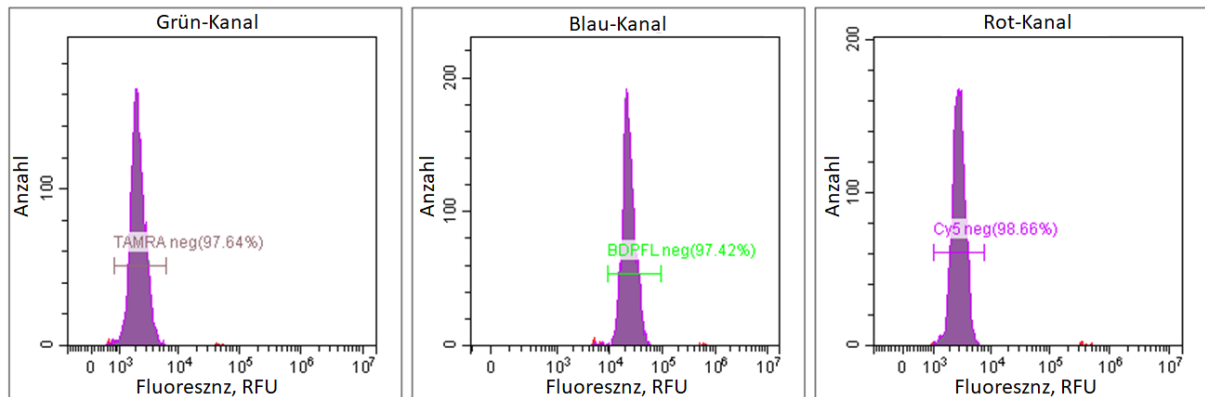


Abbildung 51: FACS-Analyse, Signale des Hintergrunds

Als Nächst wurden eine mit BDP-FL-Amin codierte Partikelsorte (siehe Tabelle 5; „Lysin“, Code: „schwaches Blau“) im FACS analysiert (Abbildung 52). Die Pink-markierte Zone (Abbildung 52a). zeigt die Partikelverteilung nach der Größe und der gelbe Bereich deutet auf das Hintergrundsignal hin, das wahrscheinlich durch Kontaminationen und Nanopartikel verursacht wird. Jeder Punkt in diesem Diagramm symbolisiert ein im FACS gemessenes Partikel. Abbildung 52b stellt die Fluoreszenzintensität der Partikel (in Blau) und das Hintergrundsignal (in Gelb) dar. Die Signalintensitäten der codierten Partikel weisen dabei eine *Gauß*'sche Funktion auf und deckt den Intensitätsbereich von 10⁵ bis 10⁶ RFU ab. Im Vergleich mit der Hintergrundmessung wird also ein Signalzuwachs um den Faktor 100 erzielt. Dies reicht aus, um die Partikelpopulation und die Kontamination eindeutig zu unterscheiden.

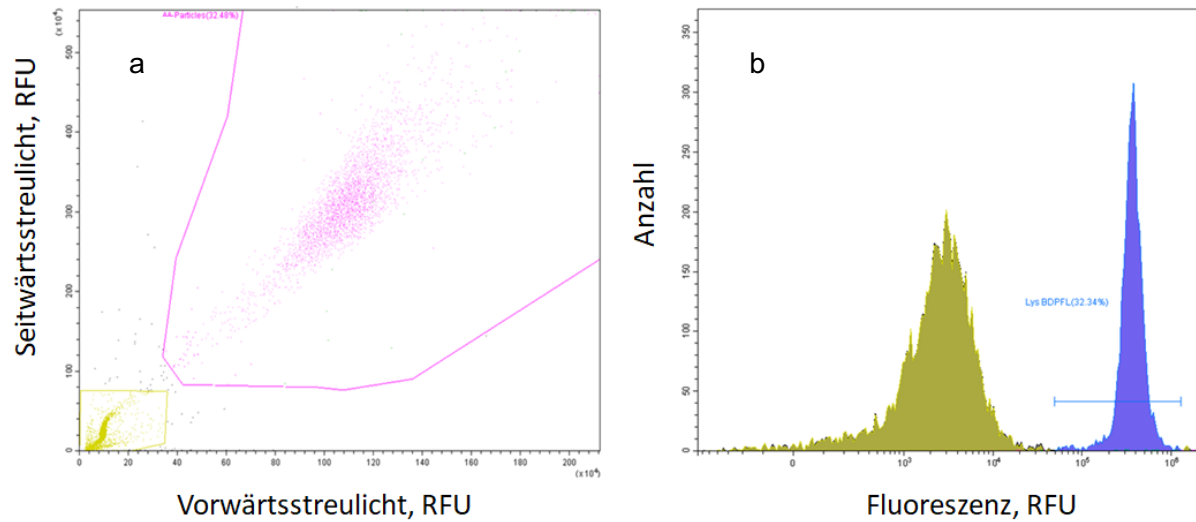


Abbildung 52: FACS-Analyse, Partikelcode „schwaches Blau“. a. Partikelverteilung (pink) in der Messung und Hintergrund (gelb). b. Fluoreszenzsignalverteilung (blau) mit Hintergrund (gelb)

Zum Vergleich wurden die Partikel der im FACS gemessenen Probe auch mit einem Fluoreszenzscanner analysiert. Abbildung 53 zeigt das Analyseergebnis. Die Partikel in den Kavitäten tragen alle den richtigen Code „schwaches Blau“.

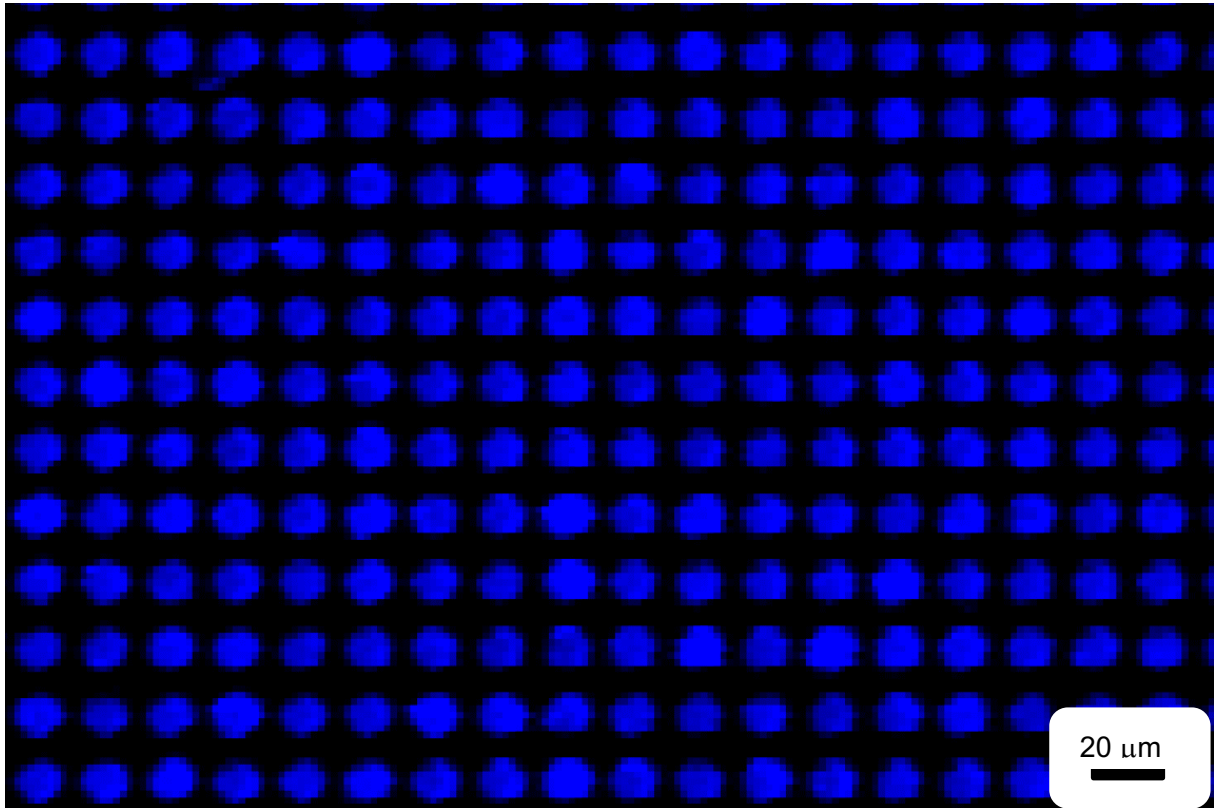


Abbildung 53: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln in den Kavitäten mit dem Code „schwaches Blau“; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge: 488 nm, Filter: 504/12 nm; Auflösung: 2 µm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Die nächste gemessene Probe (siehe Tabelle 5; „Prolin“, S. 64) wurde mit einer signifikant größeren Menge an Cyanin-5-Amin (Code: „starkes Rot“) codiert. Bei der Messung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 54) wurde das Codesignal im Intensitätsbereich von 10^5 bis 10^7 RFU aufgezeichnet, wobei hier eine bimodale Kurve (Abbildung 54b.) detektiert wurde. Diese bimodale Kurve könnte durch den Größenunterschied der Partikel verursacht werden, denn je größer die Partikel sind, desto mehr Fluorophor können die Partikel aufnehmen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die beiden Maxima in dem FACS Analysediagramm mit Farben hervorgehoben, das größere Maximum mit der schwächeren Fluoreszenzintensität mit blau und das andere mit der stärkeren Fluoreszenzintensität mit rot. Im Vorwärtsstreuungsbereich finden sich allerdings die mehrheitlich blauen Farbpunkte in dem Bereich, der kleinere Partikel anzeigt (Abbildung 54a) detektiert.

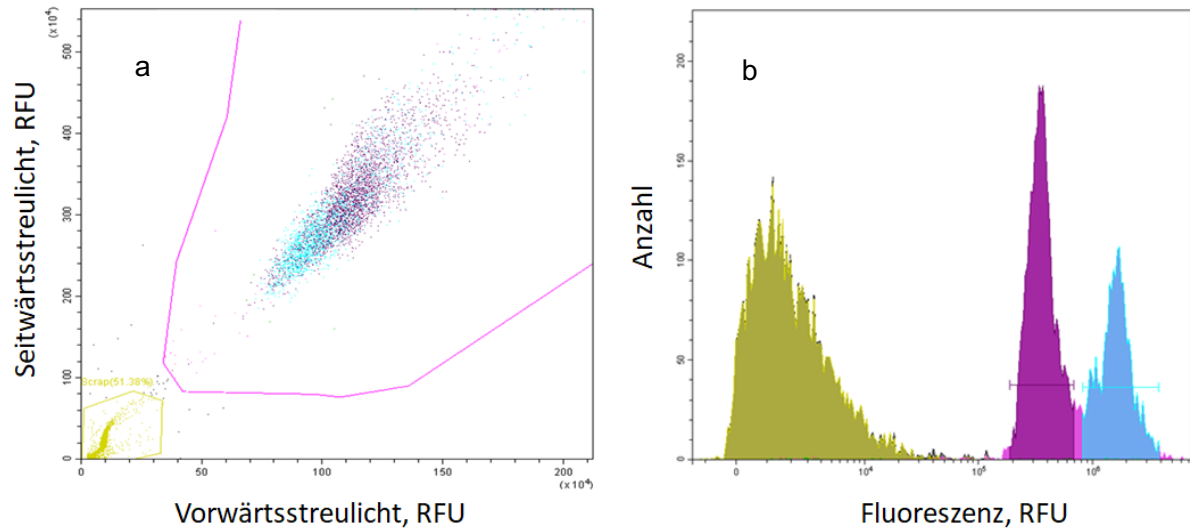


Abbildung 54: FACS-Analyse, Partikelcode „starkes Rot“; a. Partikelverteilung in der Messung und Hintergrund. b. Signalverteilung mit Hintergrund

Bei der Untersuchung der gemessenen Partikel mit einem Fluoreszenzscanner wurde jedoch eindeutig der richtige Signalcode „starkes Rot“ detektiert (Abbildung 55). Während der Analyse wurden aber auch einige Kontaminationssignale aufgezeichnet. Diese Signale waren entweder deutlich schwächer als die Signale des Partikelcodes oder hatten eine andere Form.

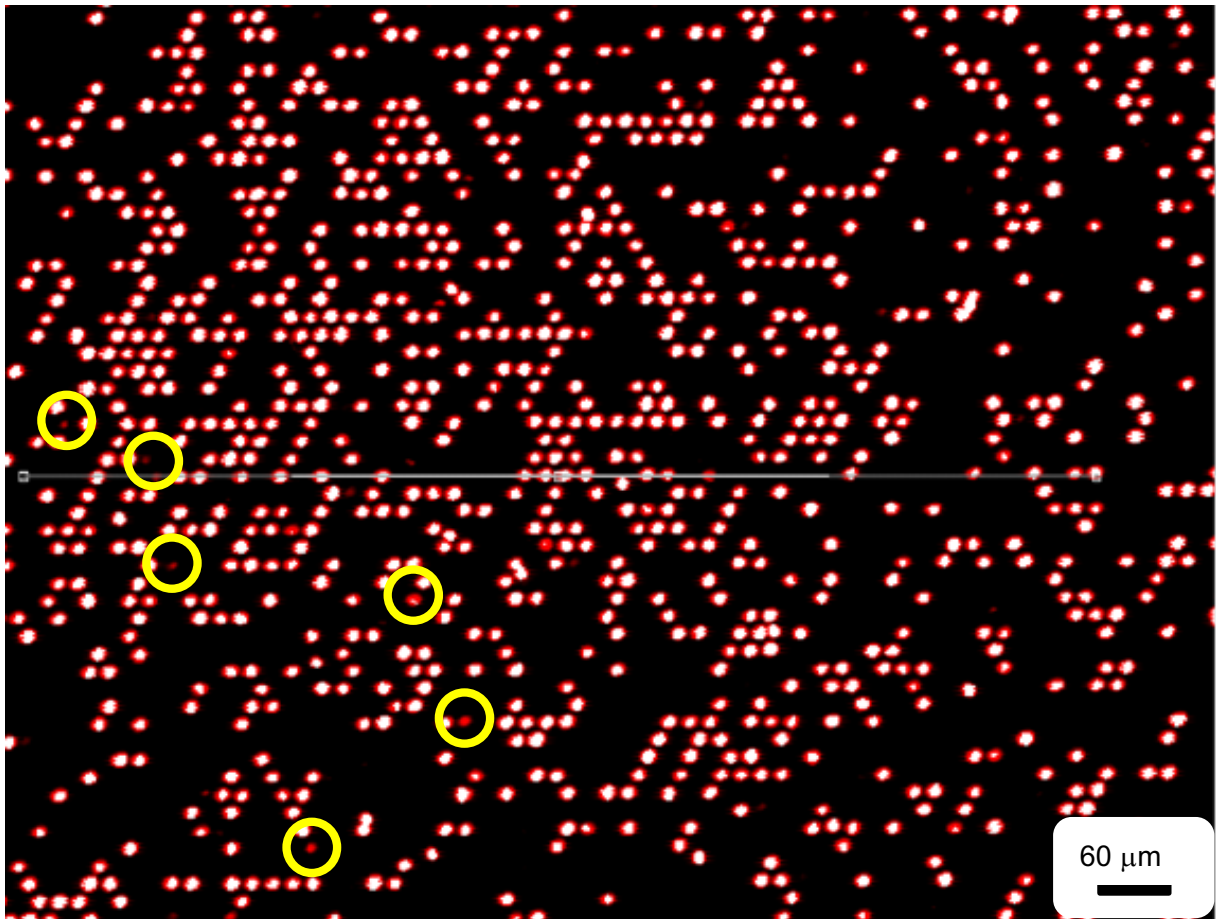


Abbildung 55: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln in den Kavitäten mit dem Code „starkes Rot“; Kontaminationen in den Kavitäten miterfasst; Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: 677/45 nm; Auflösung: 2 μm

Bei der nächsten Messung wurde eine Partikelsorte (siehe Tabelle 5; „Isoleucin“, S. 64) mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert: „schwaches Grün und schwaches Rot“ und anschließend im FACS analysiert. Im Vergleich zur Hintergrundmessung (Abbildung 56a) zeigten sowohl der grüne Kanal als auch der rote Kanal (Abbildung 56b) eine Signalerhöhung um den Faktor 10. Im blauen Kanal blieben die Signale der Hintergrundmessung und der gemessenen Partikelsort wie erwartet gleich.

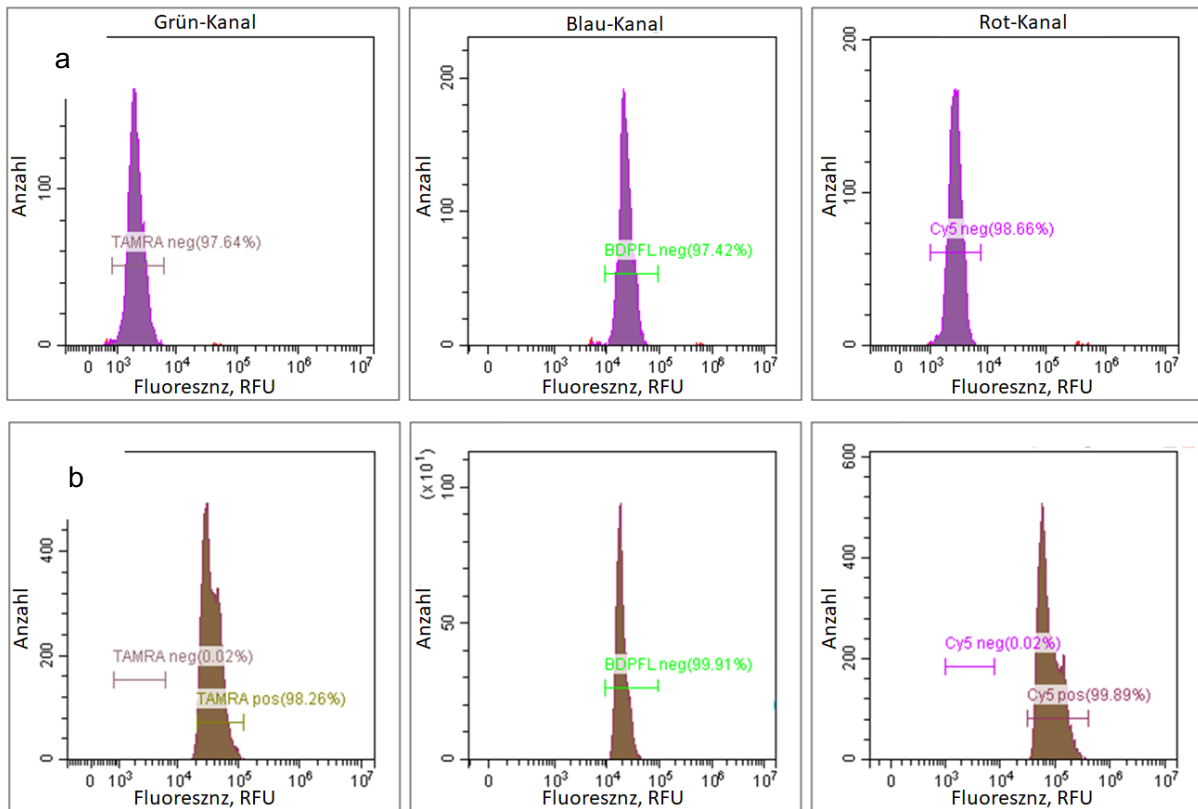


Abbildung 56: FACS-Analyse, Partikelcode „schwaches Rot und schwaches Grün“; a. Hintergrundmessung, b. Signalverteilung in den jeweiligen Kanälen

Die Analyseergebnisse des Fluoreszenzscanners (Abbildung 57) entsprachen der Messung der FACS-Analyse. Die codierten Partikel trugen jeweils den richtigen Farbcode, die Codes waren homogen und identifizierten eindeutig die Partikelsorte „Isoleucin“.

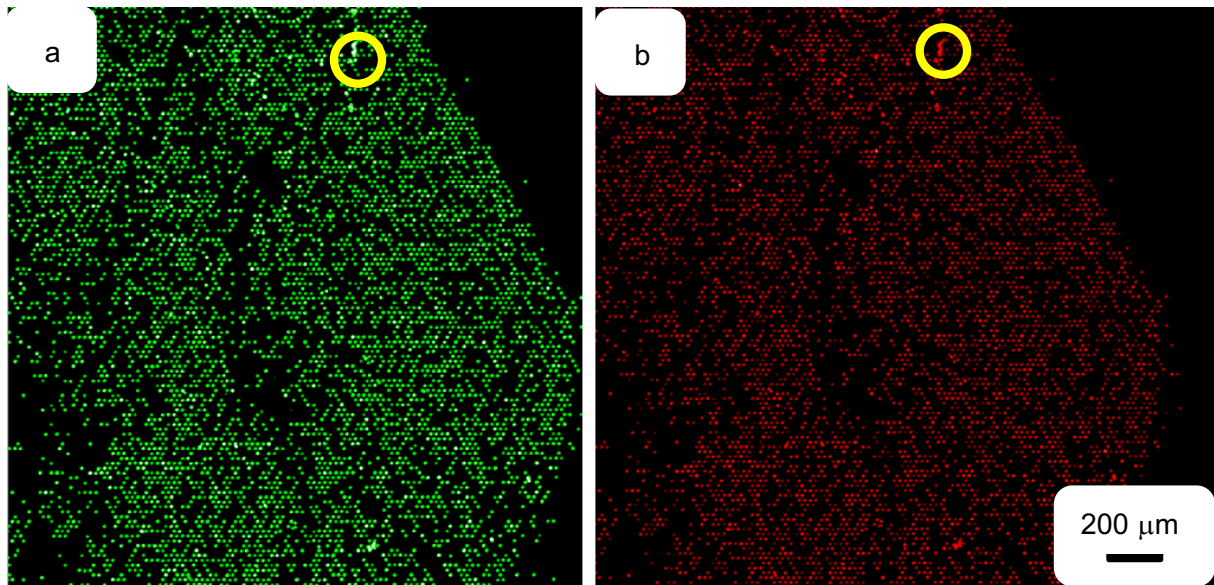


Abbildung 57: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln in den Kavitäten mit dem Code „a. schwaches Grün im grünen Kanal und b. schwaches Rot“ im roten Kanal; Kontaminationen auf dem Steg miterfasst; Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 580/14 nm, Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: 677/45 nm; Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Eine weitere Messung von Partikeln (siehe Tabelle 5; „Valin“ S. 64) mit dem Doppelcode „schwaches Rot und zugleich starkes Grün“ wurde im FACS analysiert. Im Vergleich zur Hintergrundmessung (Abbildung 58a) zeigte der rote Kanal (Abbildung 58b) eine Signalerhöhung um den Faktor 10, im grünen Kanal war die Signalintensität 100-mal stärker als das Hintergrundsignal. Im blauen Kanal wurde keine Signaländerung gefunden. Dieser Doppelcode ist also offensichtlich geeignet die Partikelsorte „Valin“ eindeutig zu markieren.

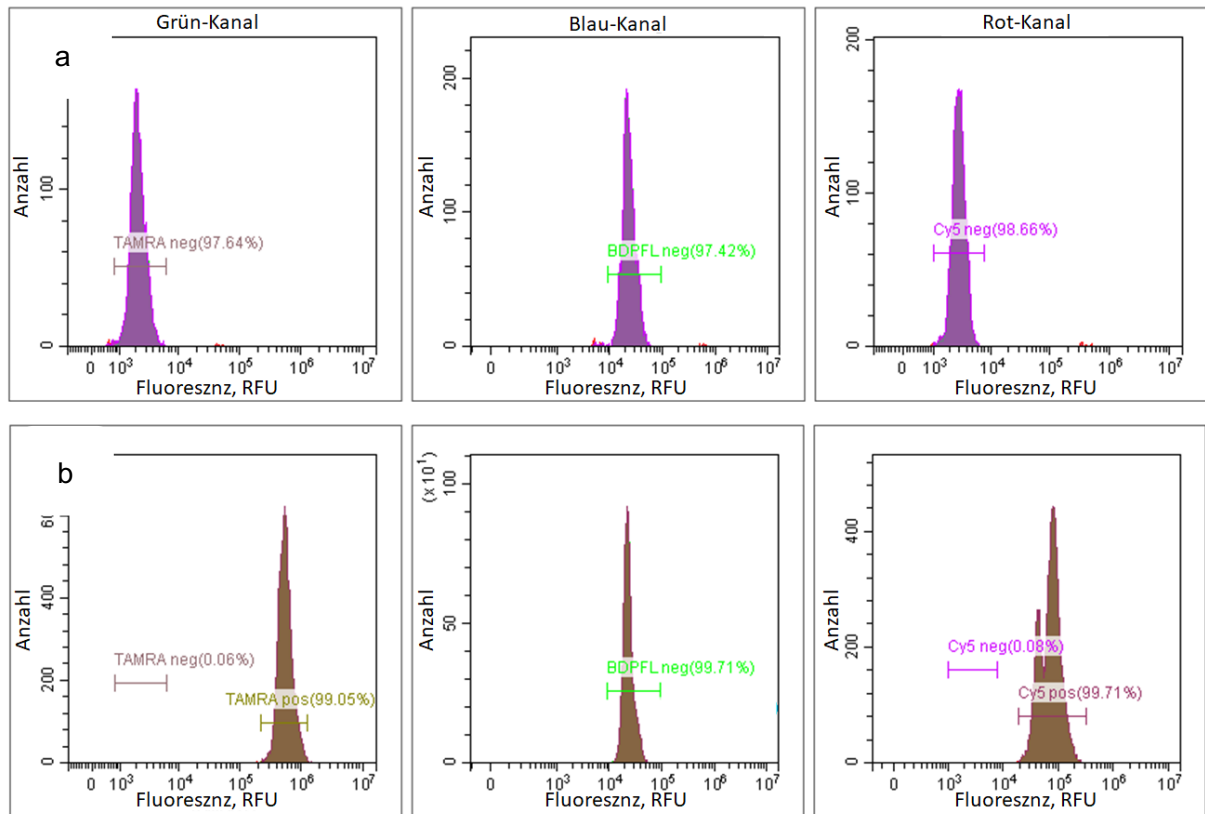


Abbildung 58: FACS-Analyse, Partikelcode „starkes Grün und schwaches Rot“, a. Hintergrundmessung, b. Signalverteilung in den jeweiligen Kanälen

Bei der Analyse desselben Doppelcodes mit dem Fluoreszenzscanner (Abbildung 59) wurde der richtige Code im grünen Kanal erkannt (Abbildung 59a). Neben dem richtigen Code „schwaches Rot“ wurde an einigen Stellen im Rotkanal auch der falsche Code „starkes Rot“ angezeigt (Abbildung 59b; gelbe Kreise). Dieser falsche (Teil-)Code wurde aber nur dort angezeigt, wo sich zwei Partikel aneinandergelagert hatten. Diese Partikelkoagulation könnte zu einer Verstärkung des Signals im Rotkanal führen.

Diese Partikelkoagulation stellt für die Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode keine Schwierigkeit dar, da alle Aminosäurepartikel in den Kavitäten vereinzelt vorliegen.

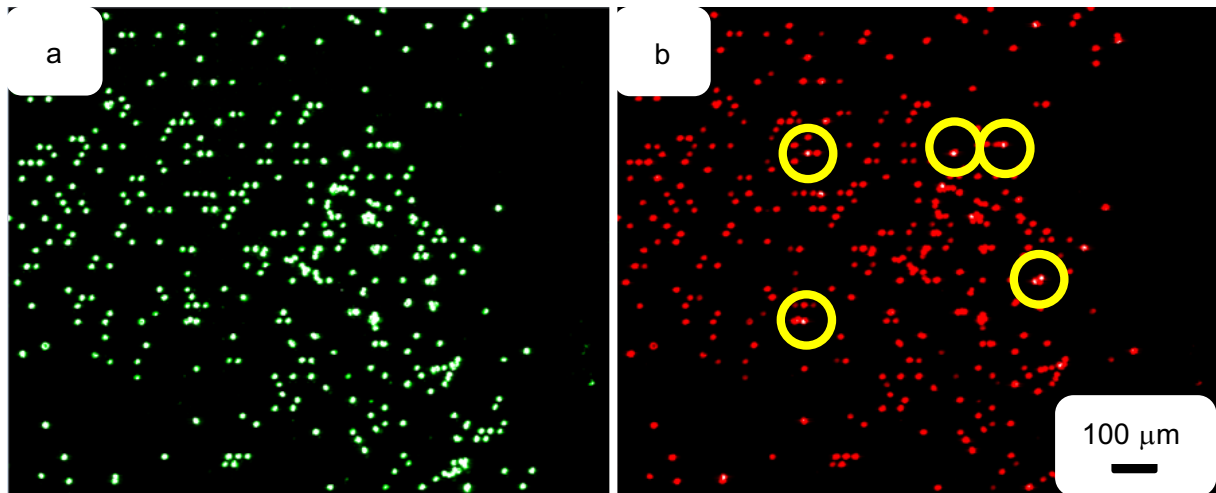


Abbildung 59: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln in den Kavitäten mit dem Code a. „starkes Grün, b. schwaches Rot“; Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 580/14 nm, Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: 677/45 nm; Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

In einer weiteren Messung wurden mit dem FACS Aminosäurepartikel (siehe Tabelle 5; „Leucin“, S. 64) mit dem dreifachen Farbcode „schwaches Grün, schwaches Blau und gleichzeitig starkes Rot“ analysiert. In allen drei Kanälen wurden ein Signalwachstum im Vergleich zur Hintergrundmessung (Abbildung 60a) gemessen. Die Signale (Abbildung 60b) im grünen und blauen Kanal waren jeweils 10-mal stärker als das Hintergrundsignal. Die Signalintensität des Rotkanals hingegen wurde um den Faktor 100 erhöht.

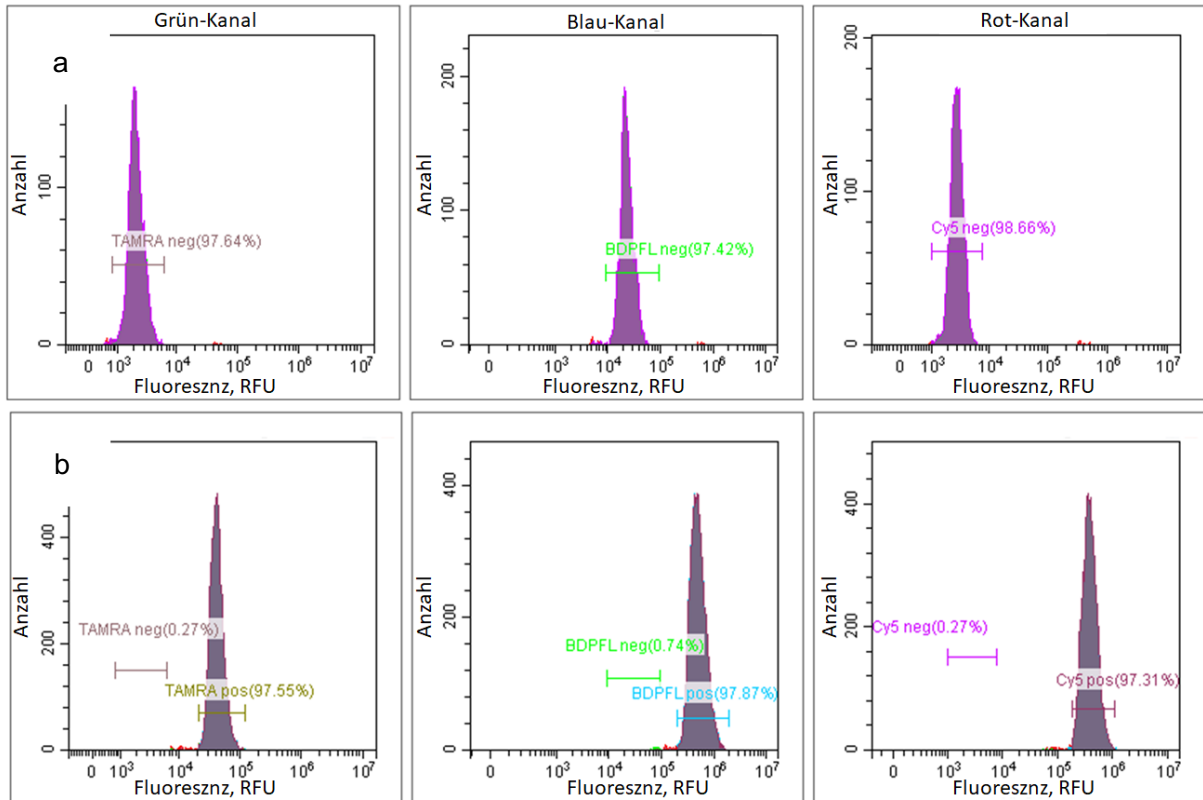


Abbildung 60: FACS-Analyse, Partikelcode „schwaches Grün, schwaches Blau und starkes Rot“; a. Hintergrundmessung, b. Signalverteilung in den jeweiligen Kanälen

Die Analyse derselben dreifach-codierten Aminosäure-Partikel mit einem Fluoreszenzscanner zeigt, dass in den jeweiligen Kanälen der richtige Code detektiert wurde. Dabei zeigte sich, dass nahezu alle Signale im grünen Kanal homogen sind (Abbildung 61a). Einige wenige uneindeutige Signale wurden sowohl im blauen Kanal (Abbildung 61b), als auch im roten Kanal (Abbildung 61c) detektiert. Diese könnten durch Kontaminationen verursacht worden sein, da diese uneindeutigen Signale fast immer nur in einem der Kanäle zu sehen waren. Dies wiederum bedeutet, dass auch mit dieser dreifachen Farbcodierung nahezu alle Aminosäurepartikel der Sorte „Leucin“ eindeutig identifiziert werden können.

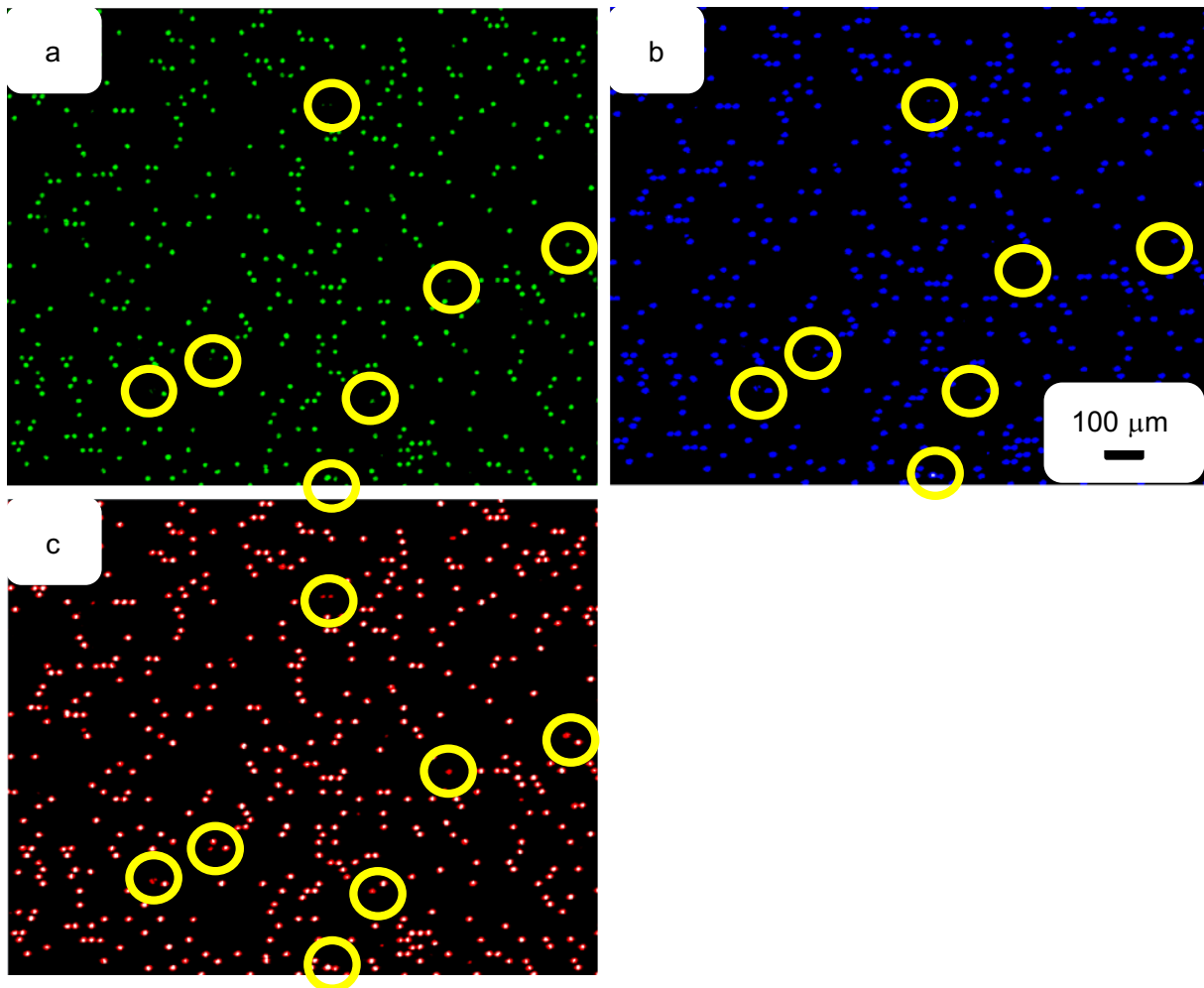


Abbildung 61: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln in den Kavitäten mit dem Code a. „starkes Grün, b. schwaches Blau, C. starkes Rot“; Anregungswellenlänge: 488 nm, Filter: 504/12 nm; Anregungswellenlänge: 532 nm, Filter: 580/14 nm, Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: 677/45 nm; Auflösung: 2 μm; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Um schließlich zu beweisen, dass eine eindeutige Identifikation der Partikelsorten nur mit Hilfe unterschiedlicher Mengen des gleichen Fluorophors möglich ist, wurden zwei unterschiedliche Partikelsorten mit dem gleichen Fluorophor, aber in zwei unterschiedlichen Fluorophorkonzentrationen hergestellt und diese zusätzlich mit nicht-farbmarkierten Partikeln vermischt. Dieses Gemisch aus drei Partikelsorten wurde anschließend mittels FACS analysiert. Abbildung 62a zeigt das Ergebnis der Partikelverteilung. Alle drei Partikelsorten wurden im selben Bereich des Vorwärtsstreulichtbereiches detektiert, was bedeutet, dass alle diese Partikel ähnlich groß sind. Ein Vergleich der Fluoreszenzsignale der einzelnen Partikel (Abbildung 62b) zeigt, dass sich die Signale der unterschiedlichen Partikelcodes nicht überlappen und somit eindeutig voneinander unterschieden werden können. Partikel mit dem Code „schwaches Grün“ haben ein 10-mal stärkeres Fluoreszenzsignal als nicht codierte Partikel und sie sind 10-mal schwächer als die mit dem Code „starkes Grün“ codierten Partikel.

Das bedeutet, dass eine Codierung über einen Konzentrationsunterschied von Fluorophoren möglich ist und die Codes können eindeutig voneinander unterschieden werden. Darüber hinaus zeigt dieses Experiment, dass - im Gegensatz zur bisherigen Methode (Abbildung 24, S. 32) - alle Partikel korrekt und homogen mit organischen Fluorophoren codiert wurden.

Dieses Experiment bestätigt, dass eine eindeutige und stabile Markierung vieler verschiedener Partikelsorten mit den organischen Fluorophoren im wässrigen Medium möglich ist.

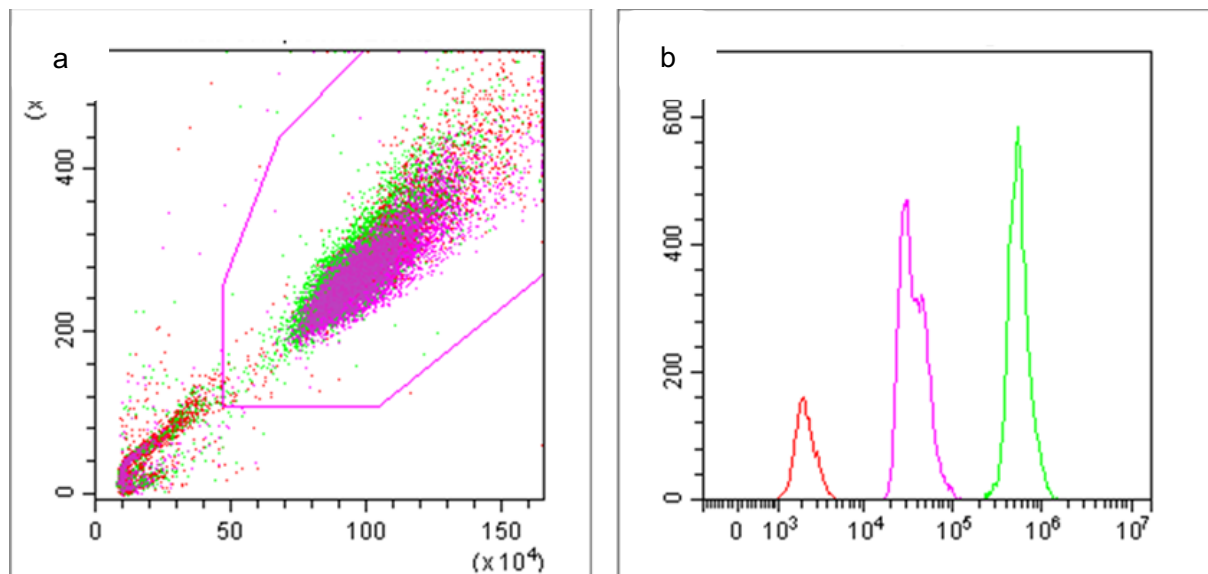


Abbildung 62: FACS-Analyse, Signalvergleich zwischen nichtcodierten Partikeln, mit dem Code „schwaches Grün und starkes Grün codierte Partikel; a. Partikelverteilung, b. Fluoreszenzsignalvergleich, Orange: nichtcodierte, Pink: Code „schwaches Grün“, Grün: Code „starkes Grün“

Alle unterschiedlichen Partikelcodes mit Hilfe von drei verschiedenen Fluorophoren, jeweils in zwei Konzentrationen, wurden mittlerweile mittels FACS bestätigt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Partikelcodes, mit denen die 20 verschiedenen Aminosäuren eindeutig identifiziert werden können. Die linke Spalte listet die Aminosäurebeladung des Partikels auf. In den anderen Spalten stehen die Beiträge der drei unterschiedlichen Fluorophoren für die eindeutige Markierung der jeweiligen Aminosäurepartikel. In der Tabelle sind zwei Arten von Farbkreisen zu sehen. Die ausgefüllten Kreissymbole weisen auf eine Markierung mit niedriger Fluorophorkonzentration hin. Die offenen Kreise stellen Markierungen mit hoher Fluorophormenge dar. Die jeweilige Farbe entspricht dem Fluoreszenzbild des markierten Partikels.

Tabelle 6: Die Codeverteilung für die 20 verschiedenen Aminosäurepartikel und die dafür verwendeten Fluorophore

Aminosäure	BDP-FL-Amin	TAMRA-Amin	Cyanin-5-Amin
Gly			●
Asp			○
Trp		●	
His		○	
Arg		○	
Ala	●		
Cys		●	●
Glu		○	●
Phe	●		●
Pro		○	●
Gln		●	○
Asn		○	○
Ser	●		○
Tyr		○	○
Thr	●	●	
Val	●	○	
Ile	●	●	●
Leu	●	○	●
Lys	●	●	○
Met	●	○	○

3.4 Partikel-Platzierung

Um Peptide in den Mikrokavitäten synthetisieren zu können, müssen die Aminosäuren als Fluoreszenz-codierte Aminosäurepartikel in die Kavitäten gebracht werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Partikel nur minimaler mechanischer Belastung ausgesetzt werden. Denn die Probleme bei der Verwendung von trockenen Aminosäurepartikeln sind offensichtlich auf die übermäßige mechanische Belastung dieser Partikel zurückzuführen.

Die Methode der „Kapillaren unterstützten Partikelplatzierung“ von *Wolf et al* wurde als Modellversuch zur Platzierung von Partikeln verwendet^[96-98] Dafür wurde ein der Vorlage ähnliches aber angepasstes Platzierungsgerät gebaut. Als Vorversuch wurden reine Matrixpartikel (aus dem Polymer SLEC-7552) in die Kavitäten einer nicht mit PEGMA/MMA funktionalisierten Kavitäträger platziert. Um den Füllgrad der Kavitäten mit Partikel zu analysieren, wurde dieser Kavitäträger mit dem Fluoreszenzscanner analysiert. Hierzu wurde der Träger mit einer Wellenlänge von 635 nm und einem OD-Filter untersucht. Insgesamt wurden 2.347.432 von 2.790.000 Kavitäten mit den Partikeln gefüllt. Also enthielten bei diesem Vorversuch ca. 84 % aller Kavitäten ein Partikel. Abbildung 63a stellt die Fluoreszenzaufnahme der gesamten Oberfläche des Kavitäträgers dar. Das hellere Feld zeigt das Kavitätenfeld und der dunklere Bereich ist der Rand. Das Kavitätenfeld an der Ecke zeigte ein gemischtes Signal (Abbildung 63b). In diesem Bereich waren einige der Kavitäten nicht mit den Partikeln gefüllt. In der Mitte des Kavitätenfeldes (Abbildung 63c) wurden jedoch fast alle Kavitäten mit dem Partikel gefüllt.

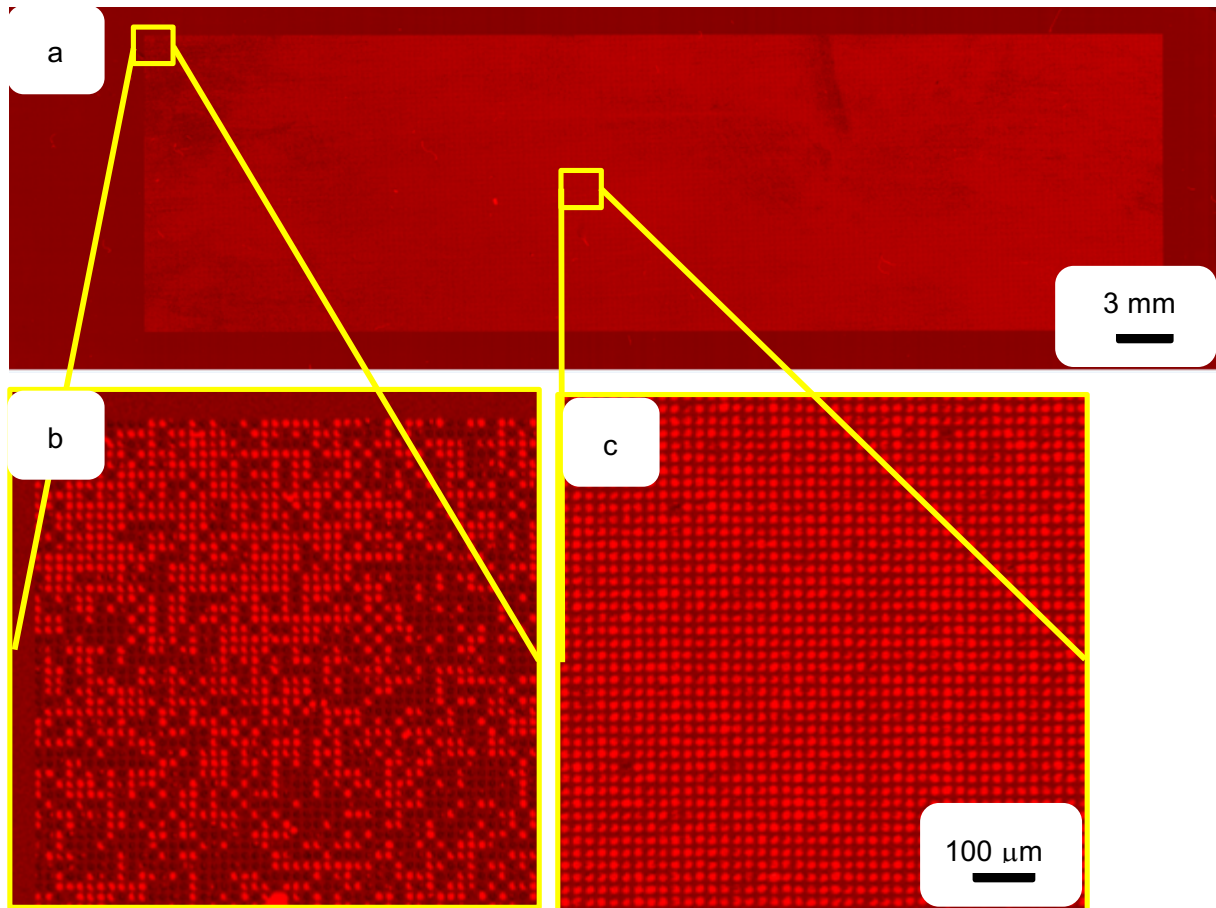


Abbildung 63: Fluoreszenzaufnahme des Kavitäträgers mit dem OD-Filter; a. Fluoreszenzaufnahme mit dem OD-Filter des gesamten Kavitäträgers, b. an der Ecke des Kavitätenfeldes, c. in der Mitte des Kavitätenfeldes; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge: 635 nm, Filter: OD; Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Bei der Verwendung von mit Aminosäuren beladenen Partikeln, die auf eine Oberfläche eines mit PEGMA/MMA funktionalisierten Kavitäträgers platziert wurden, reduzierte sich der Füllgrad um die Hälfte. Im nächsten Versuch wurde zuerst der Steg des Kavitäträgers hydrophobisiert. Der hydrophobe Steg ist notwendig, um zu verhindern, dass die Aminosäure während der Kupplungsreaktion aus der Kavität diffundiert. Dieser hydrophobe Steg störte die Platzierung der Partikel derart, dass die Füllgrade auf ca. 10% zurückging. Aus den obengenannten Gründen musste eine andere Möglichkeit erdacht werden, um die Partikelplatzierung trotz hydrophobisierter Steg des Kavitäträgers zu ermöglichen. Dabei wurde als Alternativ die Platziermethode von *Isa et al* angewendet und modifiziert.^[99]

Zunächst wurde ein Negativ aus PMMA angefertigt (Abbildung 64). In diesem Negativ wurde eine Polydimethylsiloxan (PDMS)-Schablone gegossen. Diese PDMS-Schablone besitzt zwei

Anschlussstellen. In der Mitte der Schablone befindet sich eine Tasche, die exakt auf den Kavitätenträger passt.

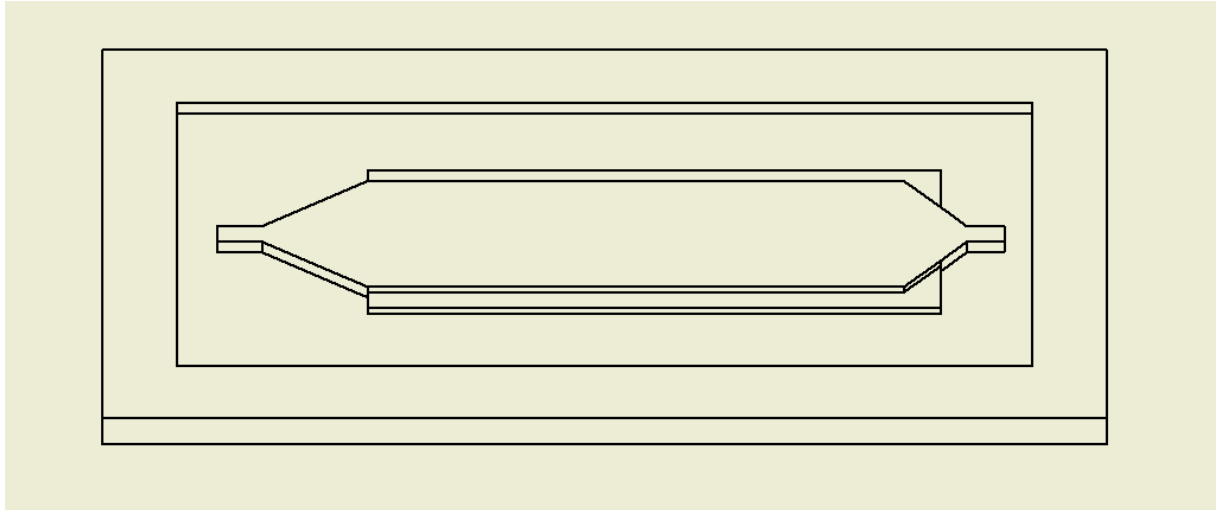


Abbildung 64: *AutoCAD*-Zeichnung des PMMA-Negativs

Der Aufbau der Platzierungskammer erfolgt in eine Sandwichstruktur (Abbildung: 65). In die PDMS-Schablone wird der Kavitätenträger eingelegt und dann wird das Ganze zwischen zwei Haltergläsern befestigt. Abschließend wird an den Schmalseiten der PDMS-Schablone jeweils ein Zugang mit einem PDMS-Stanzer gebohrt.

3.4 Partikel-Platzierung

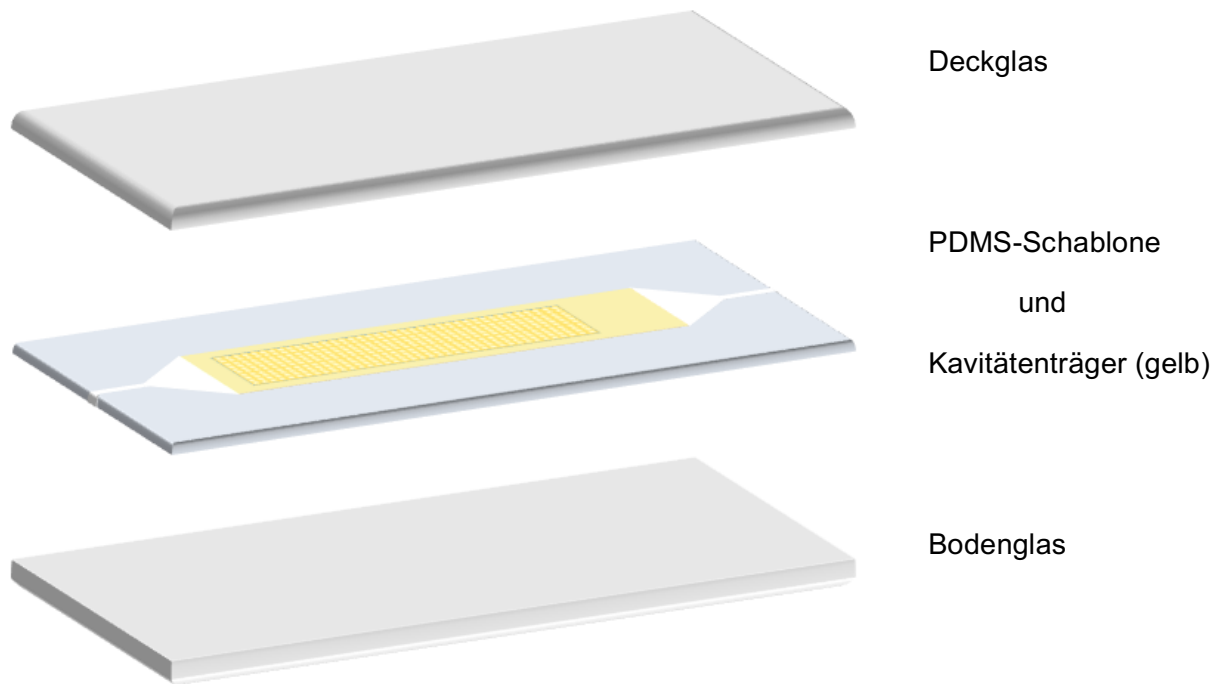


Abbildung 65: schematische Darstellung des Aufbaus der Platzierungskammer

Abbildung 66 zeigt den fertigen Aufbau der Platzierungskammer. Diese Kammer wurde im Ofen bei 100 °C für 10 min zusammengeklebt. Nach dem Abkühlen musste die Kammer vor der Platzierung auf undichte Stellen überprüft werden.

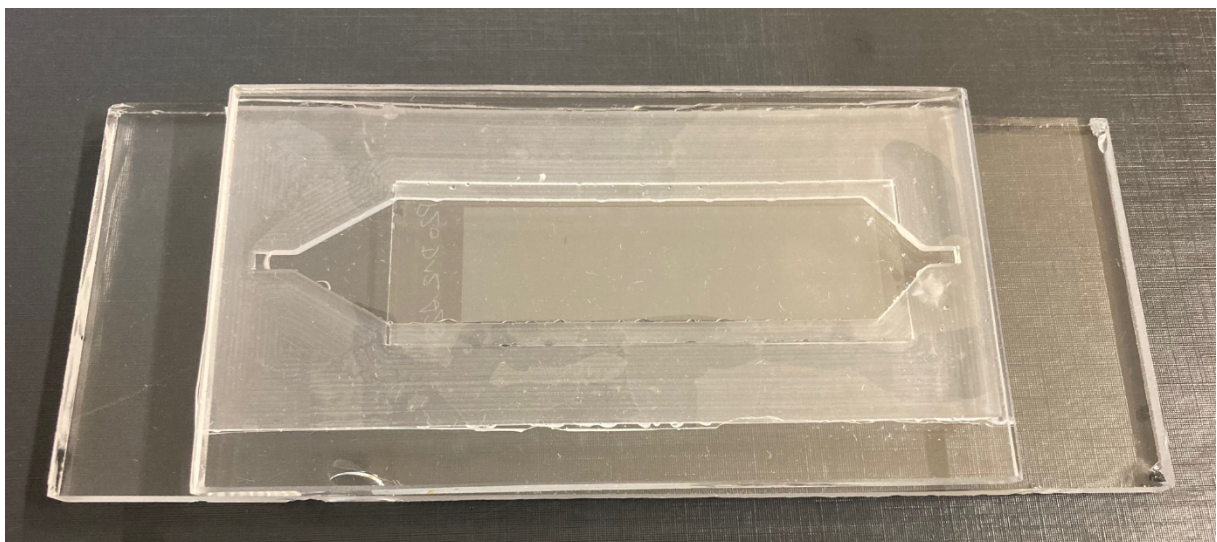


Abbildung 66: Fotoaufnahme der Platzierungskammer

Bei dem Partikelplatzierungsprozess (Abbildung 67) wurde ein Überschuss an Partikelsuspension (2 mg/mL) über den Anschluss in die Platzierungskammer auf die Oberfläche des Kavitäträgers aufgetragen. Die in den Kavitäten eingeschlossenen Luftblasen wurden mittels Ultraschall entfernt. Nach der Ultraschallbehandlung wurden diese Suspension mit einer Spritzpumpe (2 μ L/min) von der Oberfläche des Kavitäträgers langsam abgezogen. Beim Abziehen der Suspension wurden die Partikel durch den Meniskus in die Kavitäten gebracht.

Zum Schluss wurde die Oberfläche des Kavitäträgers mit entionisiertem Wasser gewaschen, um das abgelagerte SDS zu entfernen. Dieser Waschschrift ist notwendig, da das Tensid SDS nach dem Abziehen der Suspension an der Oberfläche des Kavitäträgers auskristallisiert. In Gegenwart von SDS ist sowohl das Lesen von Partikelcodes als auch die Kupplungsreaktion von Aminosäuren mit der Oberfläche des Kavitäträgers nicht mehr möglich.

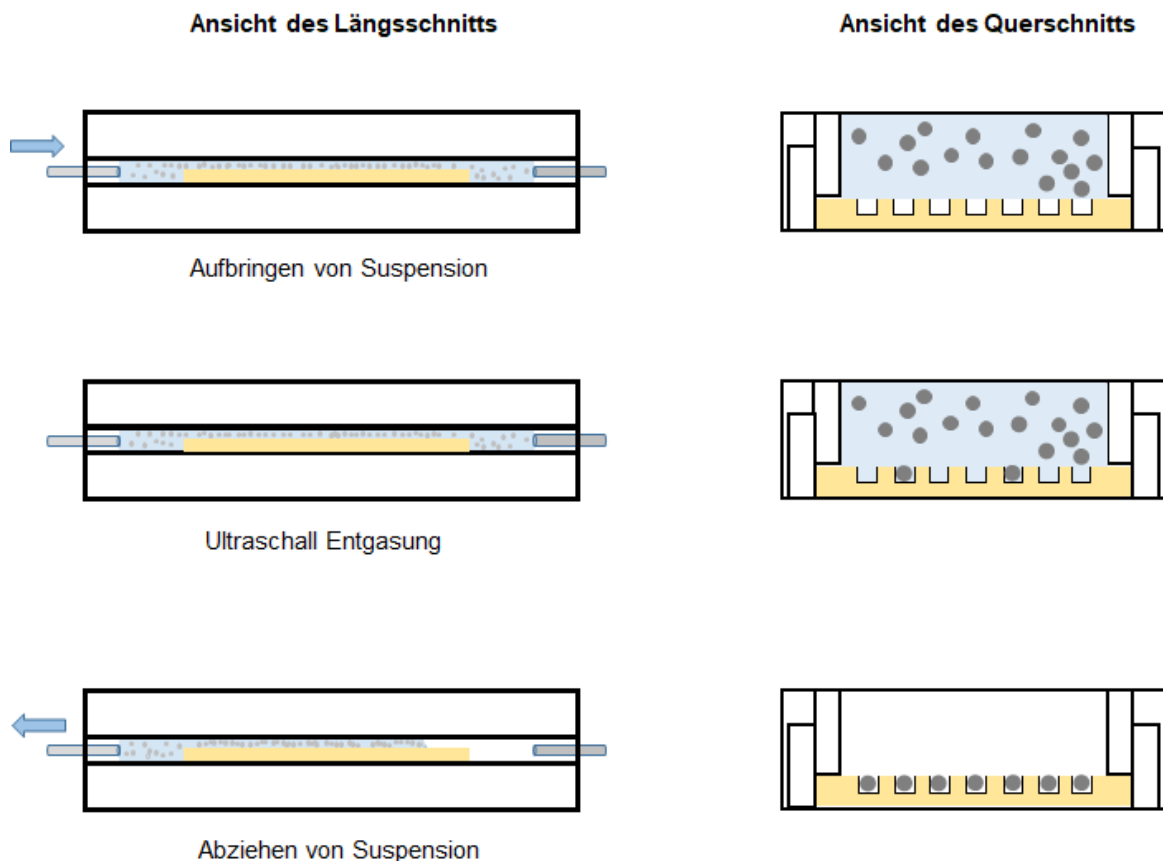


Abbildung 67: schematische Darstellung des Platzierungsprozesses

Um den Füllgrad der Platzierung zu bestimmen, wurde der befüllte Kavitäträger mit dem Fluoreszenzscanner unter Verwendung eines OD-Filters bei einer Wellenlänge von 635 nm gescannt. Abbildung 68 zeigt das Scanergebnis vor und nach der Partikelplatzierung. Das Kavitätenfeld des leeren Kavitäträgers (Abbildung 68a) ist wegen fehlender refraktiver Objekte kaum sichtbar. Bei dem mit Partikeln befüllten Kavitäträger (Abbildung 68b) hingegen kann das Kavitätenfeld eindeutig identifiziert werden.

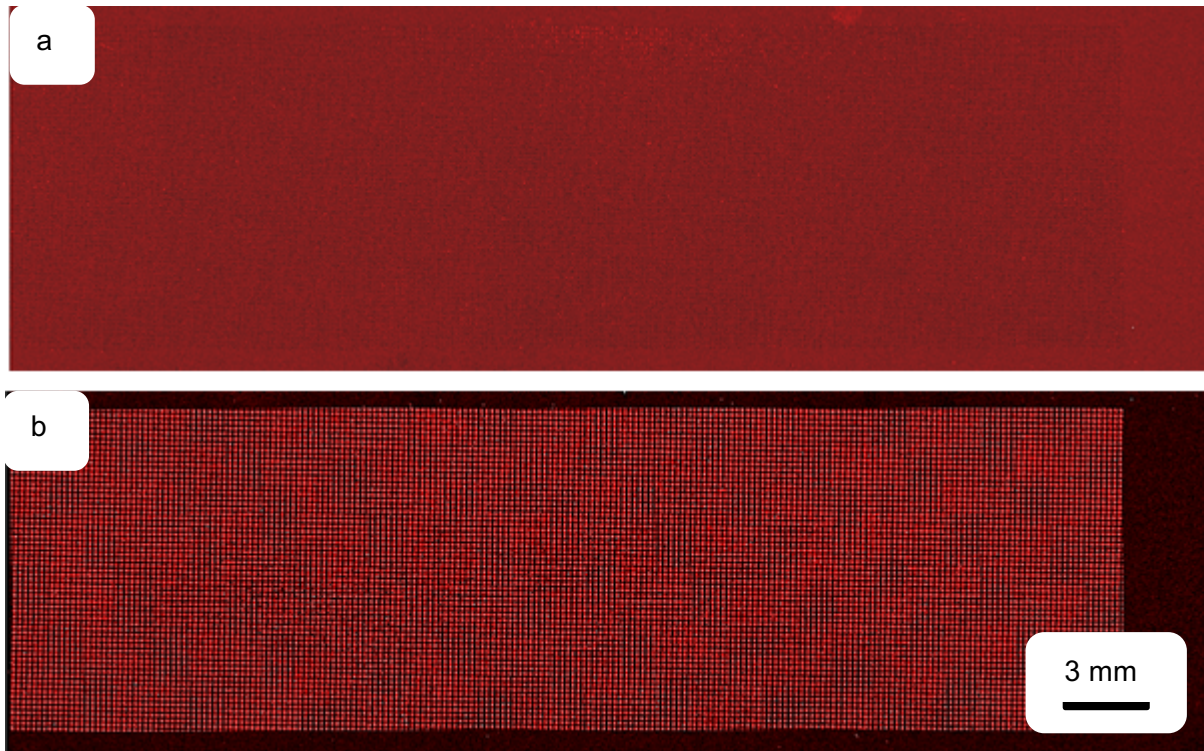


Abbildung 68: Fluoreszenzaufnahme mit OD-Filter; a. Kavitäträger vor der Platzierung, b. Kavitäträger nach der Platzierung mit Matrixpartikel; Der Füllgrad beträgt: 98%; Aufnahmeparameter: Anregungs-wellenlänge: 635 nm, Filter: OD; Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Die ungefüllten Kavitäten konnten anhand des Scanergebnisses mit dem *Mapix*-Programm gezählt werden. Über die Aufnahme wurde ein Raster mit dem entsprechenden Arrayformat auf dem Kavitätenfeld gelegt (Abbildung 69) und das Programm passte das *layout* der Kavitäten mit Hilfe der vorgegebenen Parameter automatisch an. Die gefüllten Kavitäten wurden mit einem Kreis markiert, während die leeren mit einer Linie im Kreis dargestellt wurden. Die Kontaminationen oder die Partikel außerhalb der Kavität wurden von dem Programm nicht berücksichtigt. Die befüllten Kavitäten zeigten unterschiedliche Signalintensitäten. Diese Varianz in den gemessenen Signalen könnte durch die Höhe der

Partikel in der Kavität verursacht werden. Die Partikel am Boden der Kavität ergeben ein schwächeres Signal als die Partikel am oberen Rand der Kavität. Diese Signalabweichung wird von dem Auswertungsprogramm in Form von Kreisen unterschiedlicher Größe dargestellt. Weitere mögliche Ursachen für die Abweichungen könnten durch die unterschiedlichen Partikelgrößen (siehe Kapitel 3.3.1, S. 45) oder durch Kontamination in der Kavität verursacht werden, wobei die Kontaminationen in der Regel deutlich geringe Signale haben. Um die Auswertung nicht durch Signalabweichungen zu verfälschen, wurde beim Zählen der Signale eine minimale Signalstärke von 4000 bis 5000 RFU verwendet.

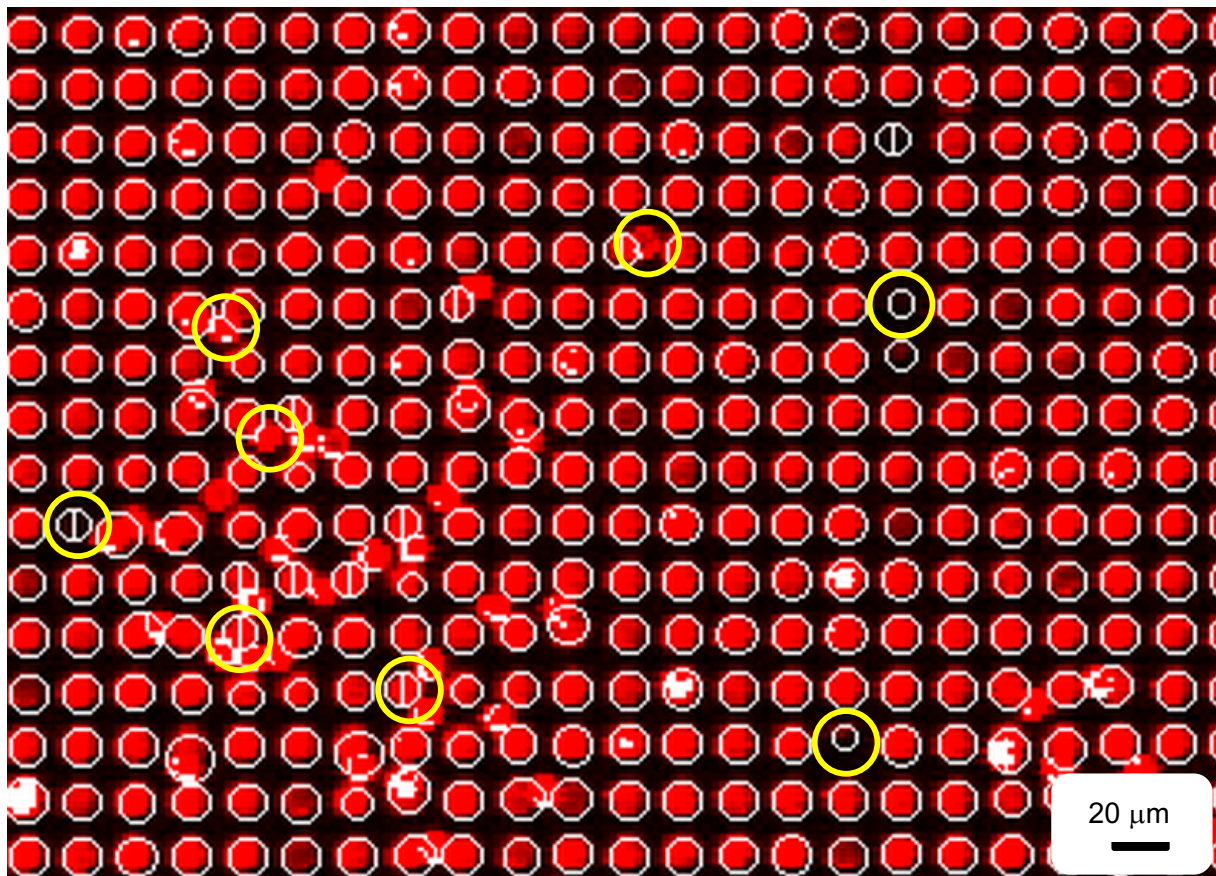


Abbildung 69: Fluoreszenzaufnahme der Oberfläche mit dem OD-Filter; Auswertung mittels *Mapix*-Analyseprogramm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Eine 100 %ige Befüllung aller 2,79 Mio. Kavitäten mit Partikeln konnte trotz mehrfacher Wiederholung des Platzierungsprozesses nicht erreicht werden. Fehlende Kavitäten, Kavitändefekte und verstopfte Kavitäten könnten dazu beigetragen haben (Abbildung 70). Denn diese Kavitäten werden bei der automatisierten Analyse alle als ungefüllt eingestuft.

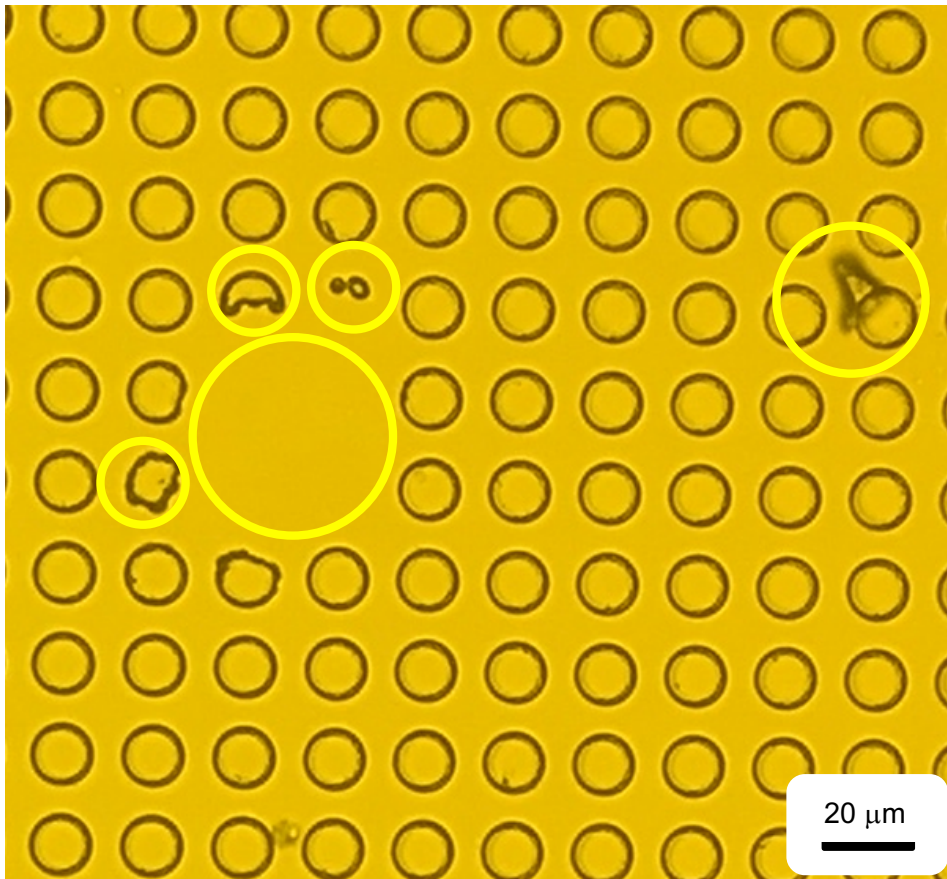


Abbildung 70: Mikroskopische Aufnahme des Kavitätenfeldes mit fehlenden Kavitäten, defekten Kavitäten und Kontaminationen über der Kavität

3.5 Qualitätskontrolle der PEGMA/MMA-Funktionalisierung des Kavitätenträgers

Die chemische Peptidsynthese erfolgt auf einem an die Glasoberfläche kovalent gebundenen PMMA/PEGMA Polymerfilm, der über die notwendigen funktionellen Gruppen verfügt. Die verwendeten Kavitätenträger müssen deswegen vor der Peptidsynthese mit diesem PMMA/PEGMA-Polymerfilm funktionalisiert werden. Der Funktionalisierungsprozess kann mit bis zu 2 Chargen (10 Kavitätenträger pro Charge) gleichzeitig durchgeführt werden.

Nach der Funktionalisierung muss die Qualität des Polymerfilms auf der Oberfläche des Kavitätenträgers überprüft werden. Als Kontrolle wird dabei ein mit PEGMA/MMA funktionalisiertem Kavitätenträger aus der Charge entnommen, die Fmoc-Schutzgruppe auf dem Kavitätenträger mit 10%igem Piperidin in DMF entfernt und die freigewordenen Aminogruppen mit Fluorophor TAMRA-NHS gefärbt. Die positive TAMRA-Färbung deutete auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der Oberfläche des Kavitätenträgers hin (Abbildung 71). Die Fluoreszenzsignale auf der Oberfläche des Kavitätenträgers und insbesondere in den Kavitäten waren weitgehend homogen, außer dass in der oberen rechten Ecke ein heller Fleck detektiert wurde. Dieser Fleck konnte nicht durch das erneute Waschen entfernt werden. Eine mögliche Ursache könnte auf einen lokalen mehrschichtigen Polymerfilm zurückgeführt werden.

Die mehrschichtigen Polymerfilme sind für die Synthese ungeeignet, da diese nicht kovalent an die Oberfläche gebunden, sondern nur eingebettet sind und sich bei der Peptidsynthese, insbesondere bei Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA), von der Oberfläche lösen könnten.

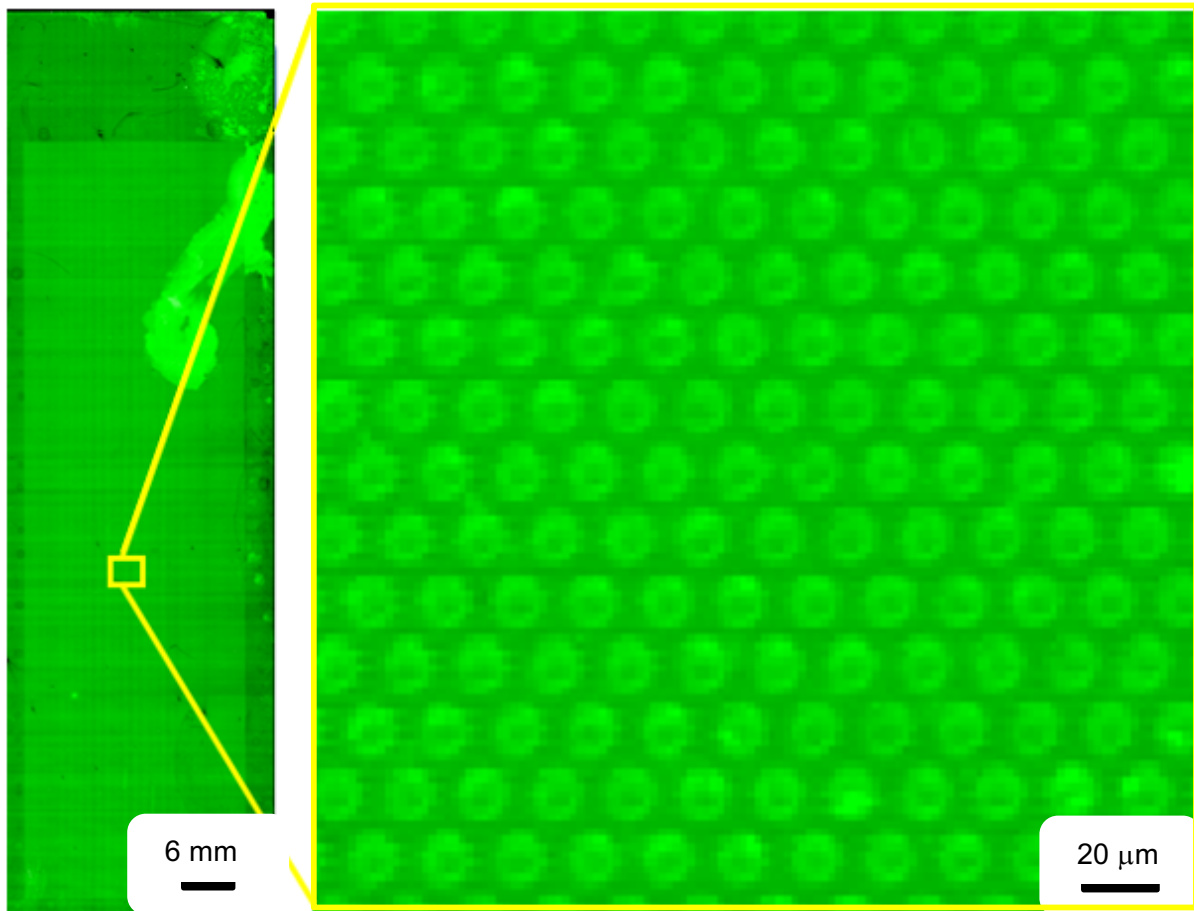


Abbildung 71: Fluoreszenzaufnahme der TAMRA-Färbung auf der Oberfläche des Kavitäträgers; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Um zu überprüfen, ob dieser helle Fleck auf einen mehrschichtigen Polymerfilm zurückzuführen ist, wurde der Kavitäträger mit TFA inkubiert. An der Stelle (Abbildung 72) des hellen Flecks konnte dieser nach TFA-Inkubation nicht mehr nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass dieser Stelle der Oberfläche ein mehrschichtiger Polymerfilm synthetisiert wurde.

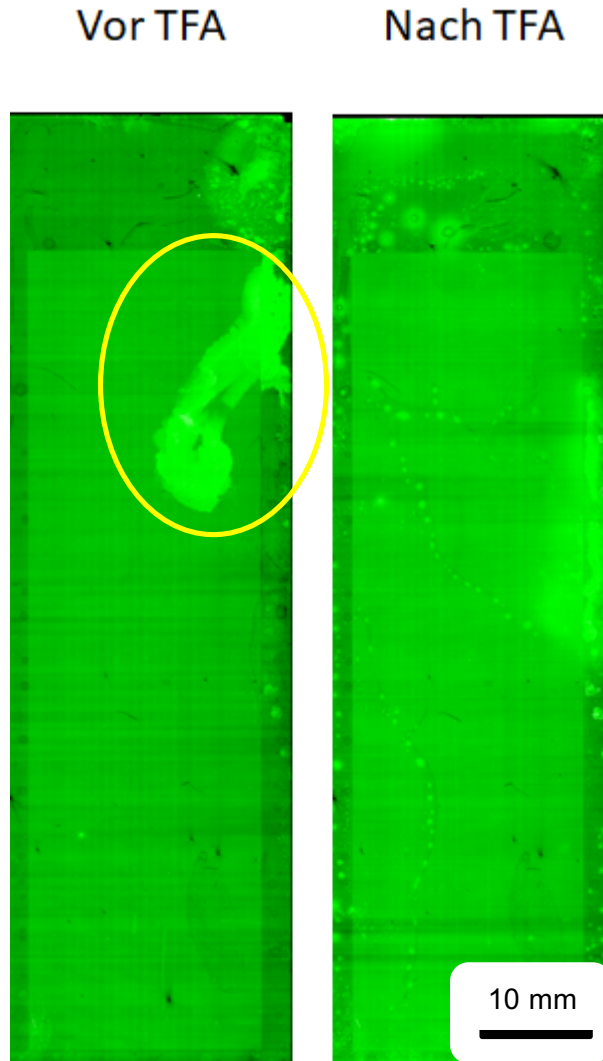


Abbildung 72: Fluoreszenzaufnahme der TAMRA-Färbung auf der Oberfläche des Kavitäträgers vor und nach TFA Inkubation; Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Ein weiterer häufiger Defekt im Polymerfilm ist der Punktdefekt (Abbildung 73). Solche Defekte könnten durch Fremdkörper wie Staub oder Flusen verursacht werden. Wird die Oberfläche während der Funktionalisierung mit dem Fremdkörper kontaminiert, so lässt sich dieser Fremdkörper nur schwer durch Waschen entfernen. Eine Funktionalisierung kann an dieser Stelle dann nicht mehr erfolgen.

Nach TFA

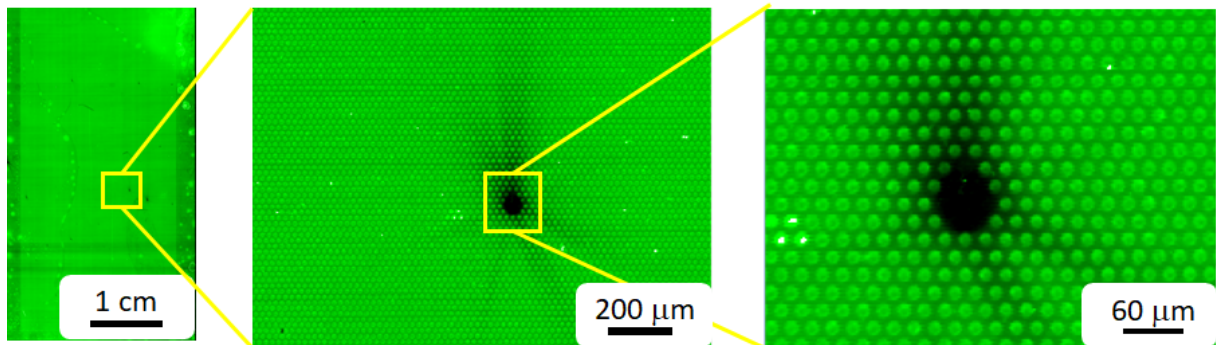


Abbildung 73: Fluoreszenzaufnahme der TAMRA-Färbung auf der Oberfläche des Kavitäträgers vor und nach TFA Inkubation; Defekt im Polymerfilm: Staubkontamination; Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Abbildung 74 zeigt einen an der Oberfläche haftenden Fremdkörper, der trotz Waschen und Inkubation in TFA nicht entfernt wurde. Eine solche Kontamination bedeckt die Kavitäten und könnte sich auch negativ auf den Platzierungsprozess auswirken.

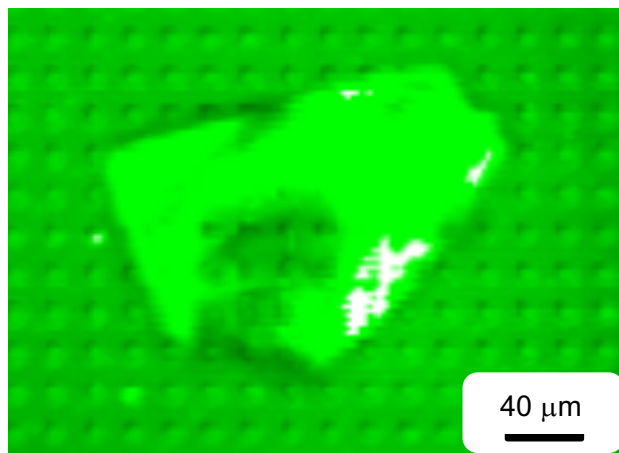


Abbildung 74: Fluoreszenzaufnahme der TAMRA-Färbung auf der Oberfläche des Kavitäträgers nach TFA Inkubation; Staubkontamination; Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm ; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

3.5 Qualitätskontrolle der PEGMA/MMA-Funktionalisierung des Kavitäträgers

Eine andere Art von Beschädigung des Polymerfilms wird durch unsachgemäßes Experimentieren verursacht. Abbildung 75 zeigt eine mechanische Beschädigung des Polymerfilms. Charakteristisch dafür sind die linienförmigen Kratzer auf der Oberfläche. Solche Defekte beeinträchtigen die Qualität der Funktionalisierung nicht, da sich die Beschädigung am Steg befindet und der Polymerfilm am Kavitätenboden weiterhin intakt bleibt.

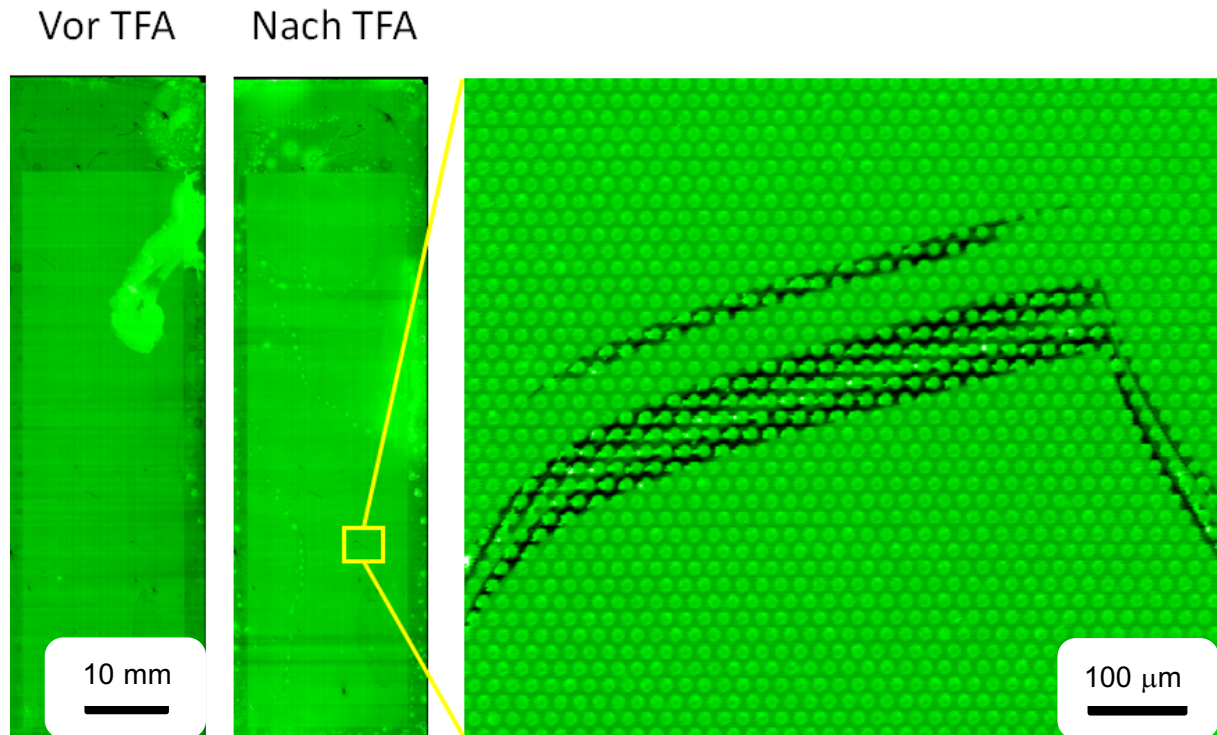


Abbildung 75: Fluoreszenzaufnahme der TAMRA-Färbung auf der Oberfläche des Kavitäträgers vor und nach TFA Inkubation; Mechanische Verletzung des Polymerfilms; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

3.6 Hydrophobisierung der Stege des Kavitäträgers

Die Vorarbeiten: (I) Herstellung monodisperser Partikel, (II) Aminosäurebeladung am Partikel (III) Codierung vom Partikel, (IV) Platzierung von Partikeln in den Kavitäten und (V) Funktionalisierung des PEGMA/MMA-Films auf der Kavitäträgeroberfläche, wurden erfolgreich abgeschlossen. Nun sollte überprüft werden, ob und wie gut die codierten Aminosäurepartikel mit dem Polymerfilm auf dem Kavitätenbodens koppelt. Um eine mögliche radiale Diffusion der Aminosäure in die benachbarten Kavitäten überprüfen zu können, wurde der Füllgrad der Platzierung bewusst gering gehalten.

Zunächst wurden Partikel mit der Aminosäure "Fmoc-Lysin(Boc)-OPfp" (Lys) und mit einer vergleichsweise höheren Konzentration an Cyanin-5-Amin beladen. Diese Partikel wurden dann mit der neu entwickelten Platzierungsmethode (siehe Kap. 3.4, S. 78) in die Kavitäten platziert. Nach Inkubation im Ofen unter Inertgas wurden die nicht umgesetzten Aminogruppen auf der Oberfläche des Kavitäträgers durch Acetylierung deaktiviert. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe der an die Oberfläche gekoppelten Aminosäuren mit Piperidin entfernt und die nun freigesetzten Aminogruppen mit dem Fluorophor TAMRA-NHS angefärbt.

Abbildung 76 stellt die Fluoreszenzaufnahmen der Analyseergebnisse dar. Der Vergleich zwischen der Partikelcode-Aufzeichnung (Abbildung 76a) und der Färbung der Aminosäure Lysin mit TAMRA (Abbildung 76b) bestätigt, dass die Signale der TAMRA-Färbung nur in den Kavitäten vorhanden sind, in denen zuvor der Partikelcode „starkes Rot“ angezeigt hatte. Allerdings wurde dabei ein starkes TAMRA-Signal auch um die gefüllten Kavitäten herum beobachtet. Dies bestätigt, dass unter den gegebenen Bedingungen die Aminosäure radial aus den Kavitäten heraus diffundieren kann. Diese Diffusion sollte verhindert werden, da sie die Aminosäurekonzentration in der eigenen Kavität reduziert und außerdem die benachbarten Kavitäten mit unerwünschten Aminosäuren kontaminieren könnte.

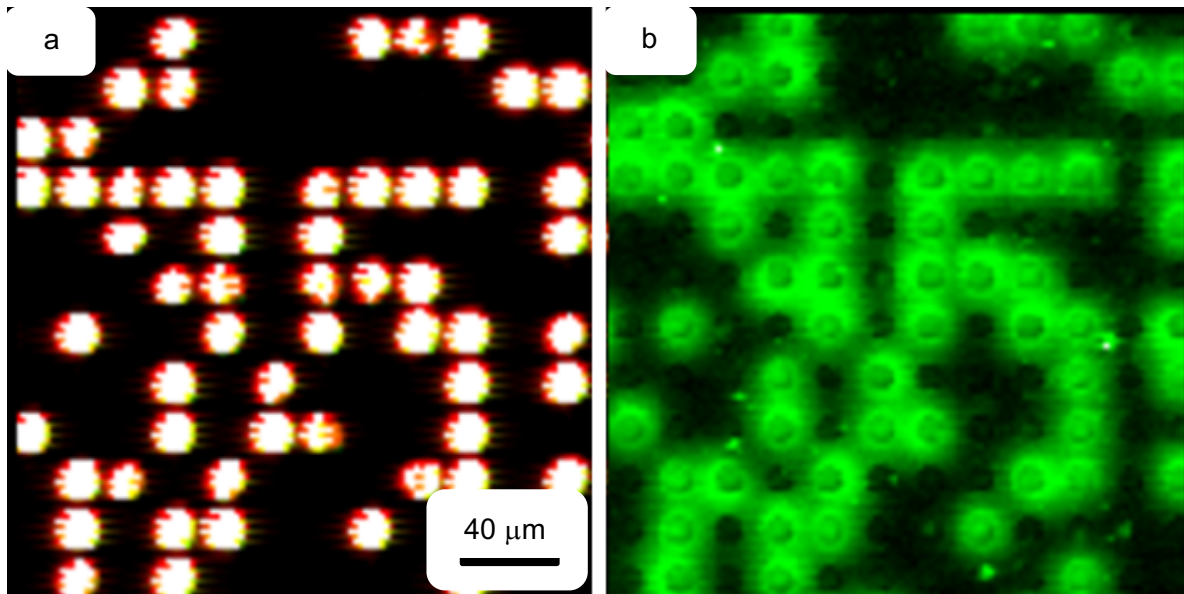


Abbildung 76: Fluoreszenzaufnahmen der Lysin-Partikel in Kavitäten; a. Fluoreszenzbild des Partikelcodes „starkes Rot“, b. Fluoreszenzbild der TAMRA-Färbung an Aminosäure Lysin; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 635 nm, Filter: 677/45 nm, Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Um die Diffusion der Aminosäure aus den Kavitäten zu verhindern, sollte auf dem Steg des Kavitäträgers eine Barriere gegen diese Diffusion geschaffen werden. Die Hydrophobisierung des Stegs liefert in diesem Sinne ein gutes Ergebnis und stellt die Methode der Wahl dar.

Um dies zu erreichen wurden zunächst die Kavitäten mit den Nanopartikeln des Matrixpolymers SLEC-7552 gefüllt. Dieser Schritt ist notwendig, um den Polymerfilm auf dem Kavitätenboden (Synthesefläche) zu schützen. Danach wurde der PEGMA/MMA-Film auf dem Steg mittels Plasma entfernt und anschließend die Oberfläche des Kavitäträgers mit Trichlor (1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorooctyl)silan hydrophobisiert.

Nach der Hydrophobisierung des Stegs wurde das vorherige Experiment unter denselben Reaktionsbedingungen wiederholt. Bei der Analyse wurde einmal die Partikelposition in den jeweiligen Kavitäten erfasst (Abbildung 77a) und dann die TAMRA-Färbung der Aminosäure Lysin dargestellt (Abbildung 77b). Die TAMRA-Signale wurden nur in den zuvor mit den Partikeln gefüllten Kavitäten nachgewiesen. Die Signale der TAMRA-Färbung waren vergleichsweise schwächer als in dem vorherigen Experiment. Dies könnte daran liegen, dass der PGMA/PMMA-Film nur am Boden der Kavität intakt blieb und nicht überall in den Kavitäten. Durch das Hydrophobisierungsverfahren wurde die Synthesefläche in der Kavität deutlich

3.6 Hydrophobisierung der Stege des Kavitäträgers

reduziert. Die Stege und auch die leeren Kavitäten zeigen in diesem Fall keine Fluoreszenzsignale. Dies ist der Beweis, dass der hydrophobe Steg die Diffusion der Aminosäuren aus den Kavitäten verhindert und somit eine Kreuzkontamination durch Aminosäuren aus benachbarten Kavitäten vermeiden kann.

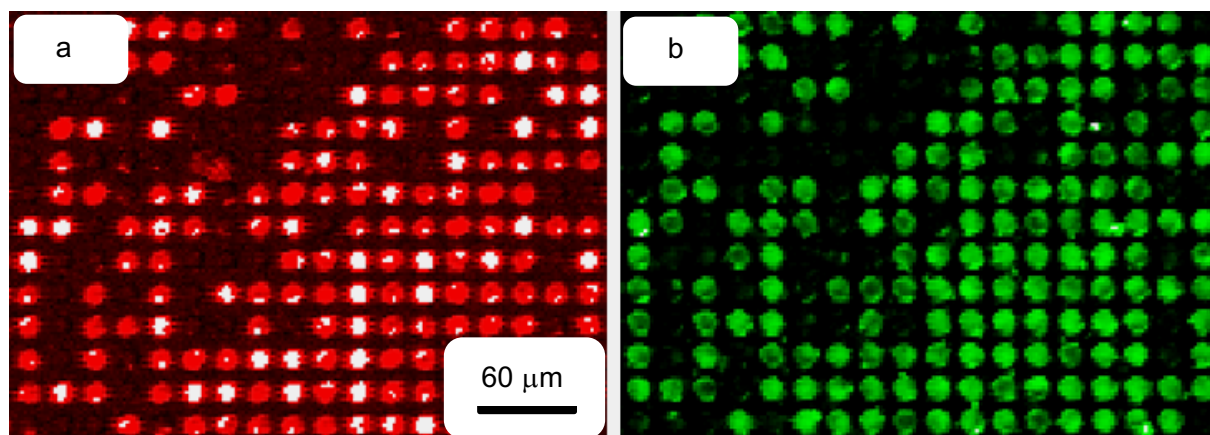


Abbildung 77: Fluoreszenzaufnahmen der Kavitäten. a. Fluoreszenzbild mit dem OD-Filter, Bestimmung der Partikelposition b. Fluoreszenzbild der TAMRA-Färbung an Aminosäure Lysin; Aufnahme-parameter: Anregungswellenlänge 635 nm, Filter: OD, Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 µm; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Ein weiteres Experiment wurde mit zwei Aminosäurepartikeln durchgeführt. Ziel dieses Experiments war es zu überprüfen, ob die neu entwickelte Methode eine Kreuzkontamination zwischen den Aminosäurepartikeln induziert. Hier wurde ein Partikel mit der Aminosäure Fmoc-Gly-Opfp (Gly) und dem Partikelcode „Blau“ beladen. In einem anderen Partikel wurden die Aminosäure Lys und der Partikelcode „Grün“ absorbiert. In Abbildung 78a wurde die Position der jeweiligen Partikel in den Kavitäten bestimmt. Die Gly-Partikel tragen einen blauen Farbcode und die Lys-Partikel haben ein grüner Farbcode. Nach der Kupplungsreaktion wurden die α -Aminogruppen der beiden Aminosäuren mit dem Fluorophor TAMRA-NHS gefärbt. Die Lys-Seitenkette wurde mit dem Fluorophor Dylight 650-NHS sichtbar gemacht. Die Färbungsaufnahme (Abbildung 78b) zeigt ein homogenes Fluoreszenzsignal in den jeweiligen Kavitäten, die zuvor ein Partikel enthielten. Die nicht mit Partikeln befüllten Kavitäten haben keine Fluoreszenzsignale. Die grünen Signale deuten auf Gly hin und die orangfarbige Signale zeigen Lys an. Ein Vergleich mit der Fluoreszenzaufnahme der Partikelcodes macht deutlich, dass in den Kavitäten, die zuvor ein Gly-Partikel enthielten, nur die Aminosäure Gly nachgewiesen werden konnte. Gleiches gilt für Lys.

3.6 Hydrophobisierung der Stege des Kavitäträgers

Die Färbesignale der Aminosäuren sind eindeutig und homogen. Dies bedeutet, dass die neu entwickelte Methode keine Kreuzkontamination zwischen den Partikeln induziert.

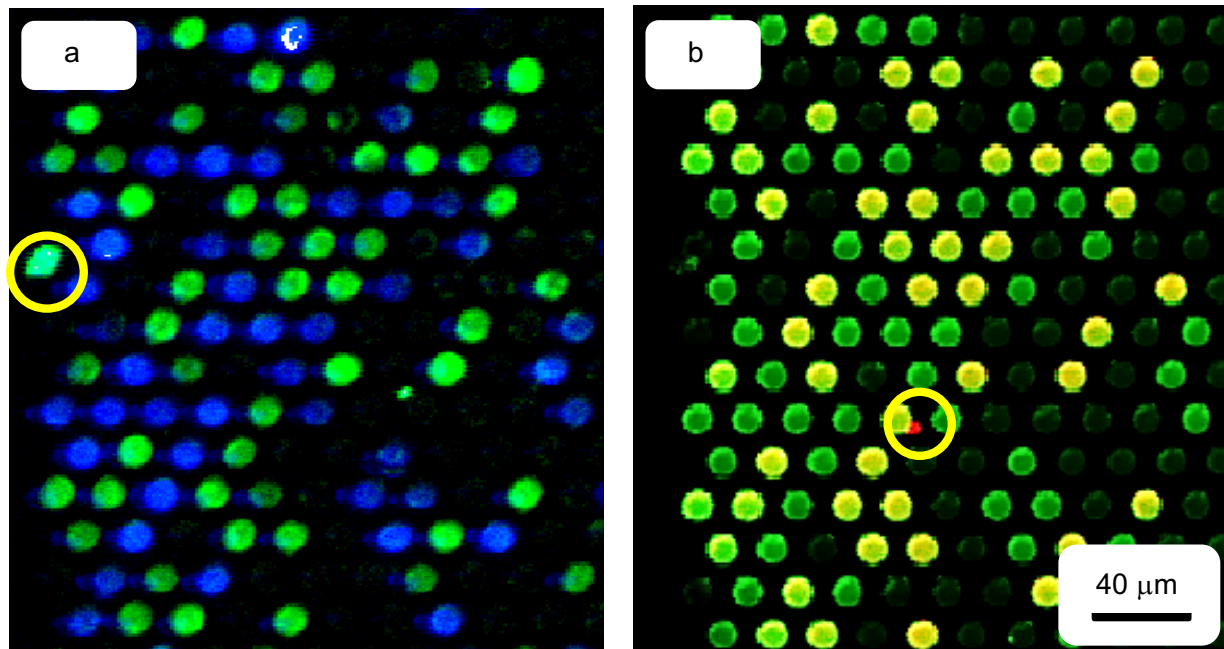


Abbildung 78: Fluoreszenzaufnahmen der Kavitäten. a. Fluoreszenzaufnahme der Partikelcodes, Blau für Gly-Partikel, Grün für Lys-Partikel. b. Aufnahme der Fluorophorfärbung der verknüpften Aminosäuren, grünes Signal für Gly, orangiges Signal für Lys. Kontamination detektiert. Anregungswellenlänge 488 nm, Filter: 504/12 nm, Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Anregungswellenlänge 635 nm, Filter: 677/45 nm, Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

3.7 HA- und FLAG-Färbung

Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Synthese von Peptidarrays geeignet ist, wurden mit der entwickelten Methode zwei bekannte Peptidsequenzen HA- und FLAG-Tag gezielt in den Kavitäten synthetisiert. Die Sequenz des HA-Tags ist YPYDVPDYA und die Sequenz vom FLAG-Tag lautet DYKDDDDK (Tabelle 7). Aufgebaut wurden diese beiden Tags von rechts nach links (= vom C-Terminus zum N-Terminus). Nachdem die Peptide aufgebaut waren und alle Schutzgruppen entfernt wurden, wurden die hergestellten Peptiden mit den Antikörpern anti-HA-Cy3 (gegen das HA-Tag) und anti-FLAG-Cy5 (gegen das FLAG-Tag) nachgewiesen.

Tabelle 7: Sequenzen für HA-Tag und FLAG-Tag

HA-Tag			FLAG-Tag		
Symbol	Abkürzung	Aminosäure	Symbol	Abkürzung	Aminosäure
Y	Tyr	Tyrosin	D	Asp	Asparaginsäure
P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
Y	Tyr	Tyrosin	K	Lys	Lysin
D	Asp	Asparaginsäure	D	Asp	Asparaginsäure
V	Val	Valin	D	Asp	Asparaginsäure
P	Pro	Prolin	D	Asp	Asparaginsäure
D	Pro	Prolin	D	Asp	Asparaginsäure
Y	Tyr	Tyrosin	K	Lys	Lysin
A	Ala	Alanin			

Abbildung 79 stellt die Fluoreszenzaufnahme der Antikörperfärbung der gesamten Oberfläche dar. In den Kavitäten dieser Oberfläche wurden FLAG-Tags synthetisiert und diese Tags mit anti-FLAG-Cy5 Antikörper nachgewiesen. Die Fluoreszenzsignale in den Kavitäten zeigen eine Antikörper-Antigen-Bindung an und liefern so den Beweis für die erfolgreiche Synthese der FLAG-Tags. Mit einer Belichtungsverstärkung (*gain*) von 15 wurden in insgesamt 85 % aller Kavitäten Signale detektiert. Der entsprechende Wert bei der Verwendung von trockenen Aminosäurepartikeln lag bei unter 4,9 %.^[29-30]

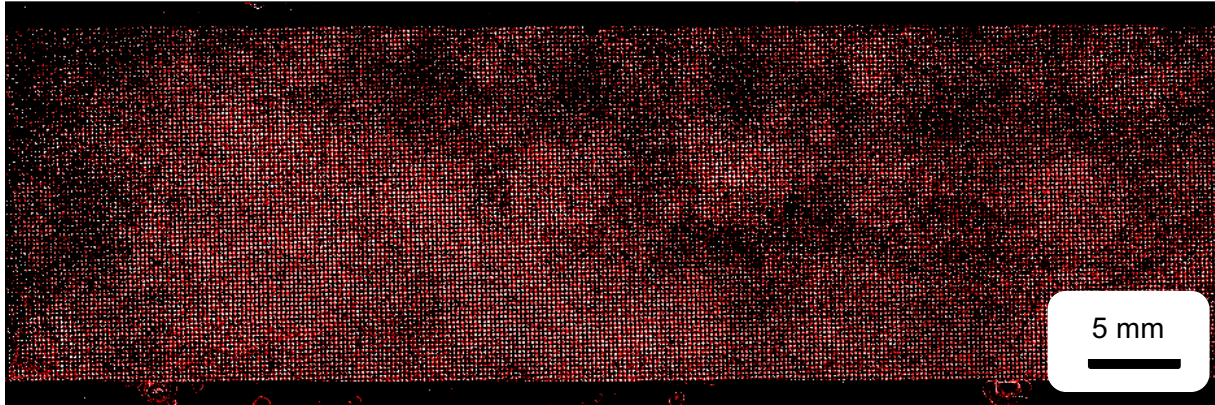


Abbildung 79 Fluoreszenzaufnahme der gesamten Oberfläche des Kavitäträgers nach der Antikörperfärbung von FLAG-Tags; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 633 nm; Filter: 677/45 nm; Auflösung: 2 μ m; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Tabelle 8 zeigt die Füllgrade der Kavitäten in den einzelnen Schichten. Hierzu wurde während des Partikelplatzierungsprozesses ein durchschnittlicher Füllgrad von 98 % erreicht. Der Füllgrad der einzelnen Schichten variiert zwischen 95 % und 99 %. Die siebte Schicht erreichte mit 95 % der geringste Füllgrad. Der höchste Füllgrad von 99 % wurde in der vierten, sechsten und achten Schicht erreicht

Tabelle 8: Füllgrade des Partikelplatzierungsprozesses der Einzelschichten bei der Synthese von FLAG-TAG

Schicht	Aminosäure	Füllgrade
1	Lys	98 %
2	Asp	97 %
3	Asp	98 %
4	Asp	99 %
5	Asp	97 %
6	Lys	99 %
7	Tyr	95 %
8	Asp	99 %

Die Fluoreszenzsignale sind nicht in allen Kavitäten vorhanden (Abbildung 80). Das liegt daran, dass bei der Synthese nicht alle Kavitäten mit Partikeln befüllt waren (Durchschnittlicher Füllgrad 98 %). Diese leeren Kavitäten wurden durch Acetylierung deaktiviert und stehen danach für die Synthese nicht mehr zur Verfügung. Die in diesen Kavitäten hergestellten Peptide haben nicht die richtige Sequenz und können nicht mittels Antikörperfärbung nachgewiesen werden.

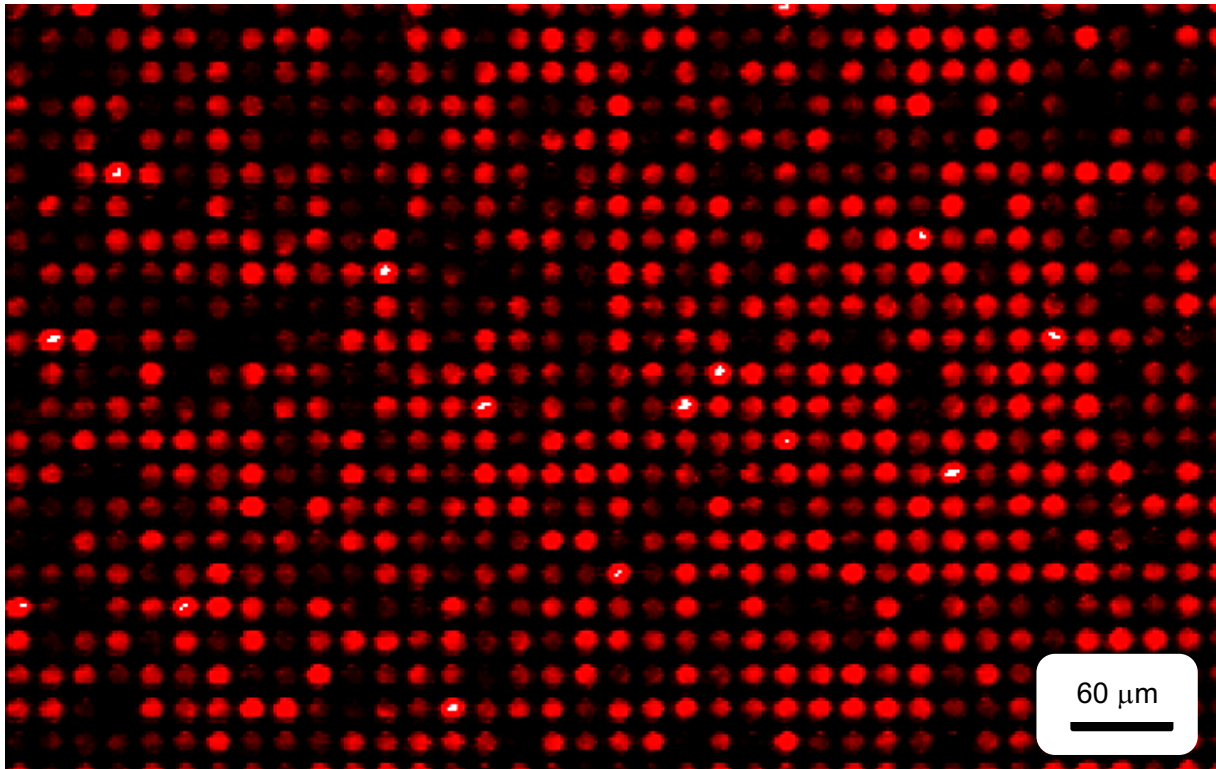


Abbildung 80: Fluoreszenzaufnahme der Oberfläche des Kavitäträgers nach der Antikörperfärbung von FLAG-Tags; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 633 nm; Filter: 677/45 nm; Auflösung: 2 µm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Weiter zeigte sich, dass die Signale der Antikörperfärbung in den jeweiligen Kavitäten inhomogen sind. Dies bedeutet, dass die Menge des synthetisierten Peptids in den Kavitäten variiert. Anschließende Untersuchungen legen nahe, dass diese Inhomogenität wahrscheinlich durch den Partikelplatzierungsprozess verursacht werden.

Abbildung 81 stellt eine REM-Aufnahme der Oberfläche des Kavitäträgers unmittelbar nach der Partikelplatzierung dar. In dieser Abbildung können sowohl leere Kavitäten, mit Partikeln gefüllte Kavitäten als auch auf dem Steg befindliche Partikel beobachtet werden.

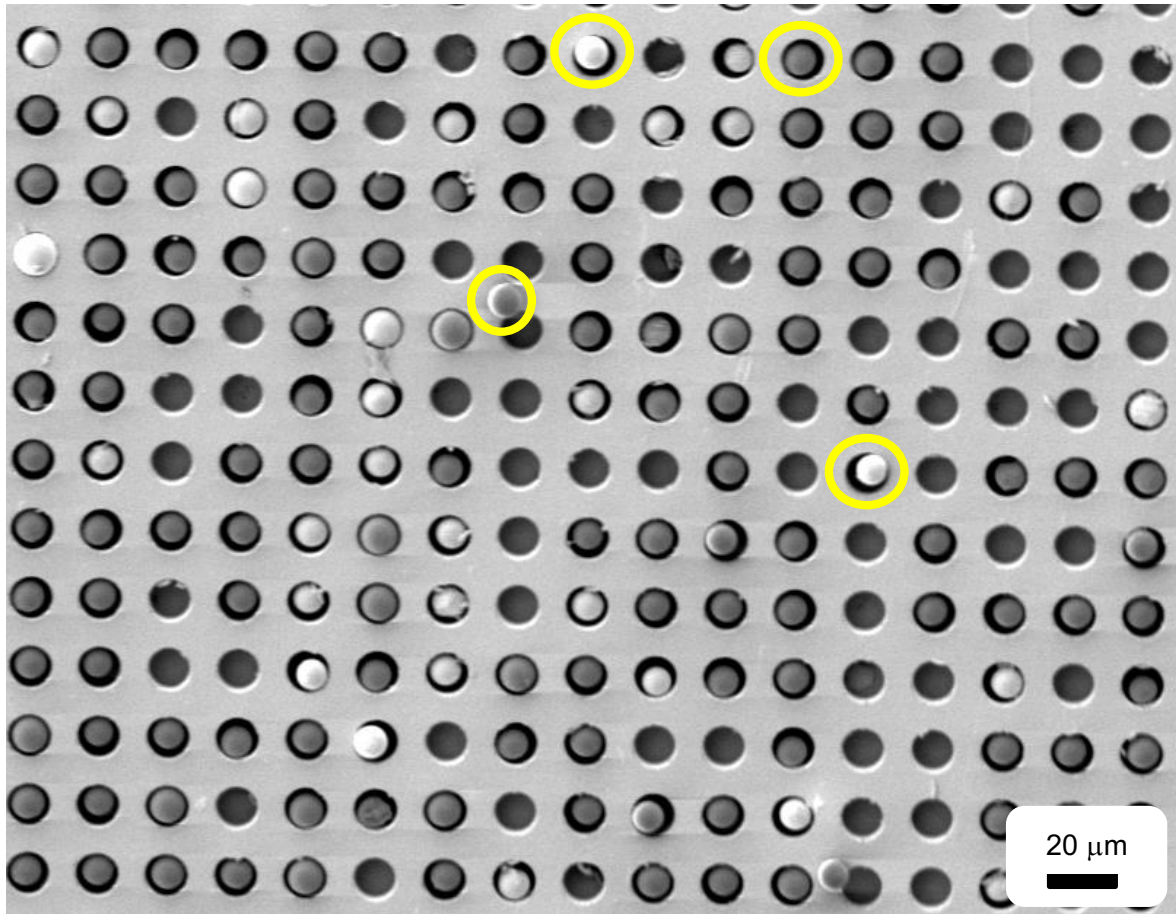


Abbildung 81 REM-Aufnahme der Oberfläche des Kavitäträgers nach der Platzierung von Partikeln

Die Abbildung zeigt aber auch, dass die Partikel in den Kavitäten sich in unterschiedlicher Höhe befinden. Die in der Aufnahme dunkel angezeigten Partikel sitzen tiefer in den Kavitäten als die hell erscheinenden Partikel und einige Partikel befinden sich sogar direkt am oberen Rand der Kavität. Abbildung 82 zeigt eine schematische Darstellung der möglichen Höhenpositionen der Partikel in einer Kavität.

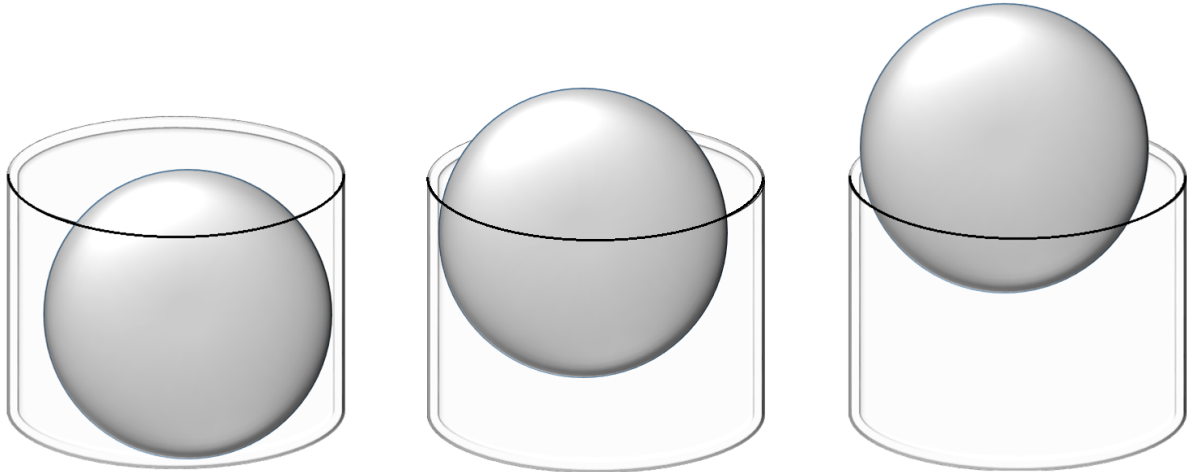


Abbildung 82: schematische Darstellung der möglichen Höhenpositionen von Partikeln in Kavitäten nach der Platzierung

Je weiter das Partikel vom Kavitätenboden entfernt ist, desto schwieriger könnte es sein, den Boden der Kavität während des Kupplungsschritts durch Aufschmelzen des Partikels vollständig zu bedecken. Auf der unbedeckten Fläche wird die Diffusion der Aminosäure erschwert und führt zu einem schlechteren Kupplungsergebnis.

Dieser in Abbildung 81 beobachtete Unterschied in der Höhenposition der Partikel in der Kavität und auch teilweise ungefüllten Kavitäten könnten durch den Platzierungsschritt verursacht worden sein. Der Meniskus der Flüssigkeit drückt das Partikel zunächst in die Kavität, beim Verlassen der Kavität schiebt der Meniskus das Partikel in Richtung Kavitätenwand. Wenn der Platzierungsprozess zu schnell durchgeführt wird, platziert der Meniskus das Partikel in der Kavität entweder auf einer höheren Ebene oder zieht das Partikel sogar vollständig aus der Kavität heraus (Abbildung 83). Interessanterweise wird der Höhenunterschied der Partikeln in den jeweiligen Kavitäten häufiger auf dem mit hydrophoben Stegen funktionalisierten Kavitäträger beobachtet. Eine Hypothese legt nahe, dass der hydrophobe Steg auf der Oberfläche des Kavitäträgers diese Effekte zusätzlich verstärkt haben könnte. Die verwendeten Partikel sind hydrophob und könnte eine Affinität zum hydrophoben Steg aufweisen.

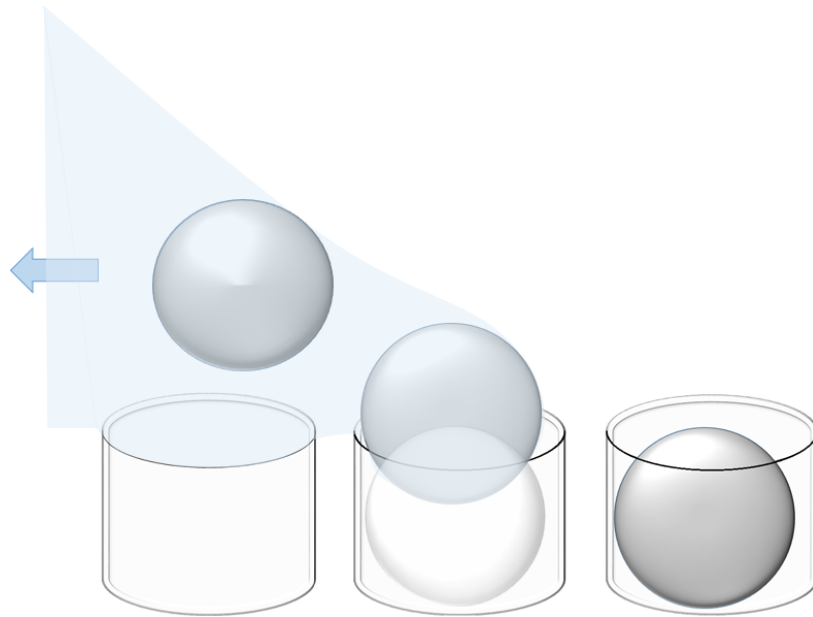


Abbildung 83: schematische Darstellung von durch den Meniskus herausgezogenen Partikel

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie gut diese „falsch“ platzierten Partikel den Boden der Kavität nach der Inkubation im Ofen bedeckten. Dazu wurde ein weiterer Kavitätenträger mit den Partikeln befüllt, das Ganze eine Stunde bei 90 °C im Ofen inkubiert und anschließend per REM analysiert.

Die REM-Aufnahme (Abbildung 84) zeigt, dass sich die Partikel in den Kavitäten trotz Inkubation im Ofen bei 90 °C kaum geschmolzen sind. Außerdem ist hier deutlich zu erkennen, dass die Partikelschmelze den Kavitätenboden oft nicht erreicht. Die Verlängerung der Inkubationszeit um eine weitere Stunde bringt keine sichtbare Verbesserung. Das bedeutet, dass die verwendete Methode nicht geeignet ist, um das Partikelmaterial vollständig zum Schmelzen zu bringen.

Aus diesem Grund wurde als nächstes ein Verfahren entwickelt, um die Partikel anderweitig zu verflüssigen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Partikel in Lösungsmitteldampf zu inkubieren.

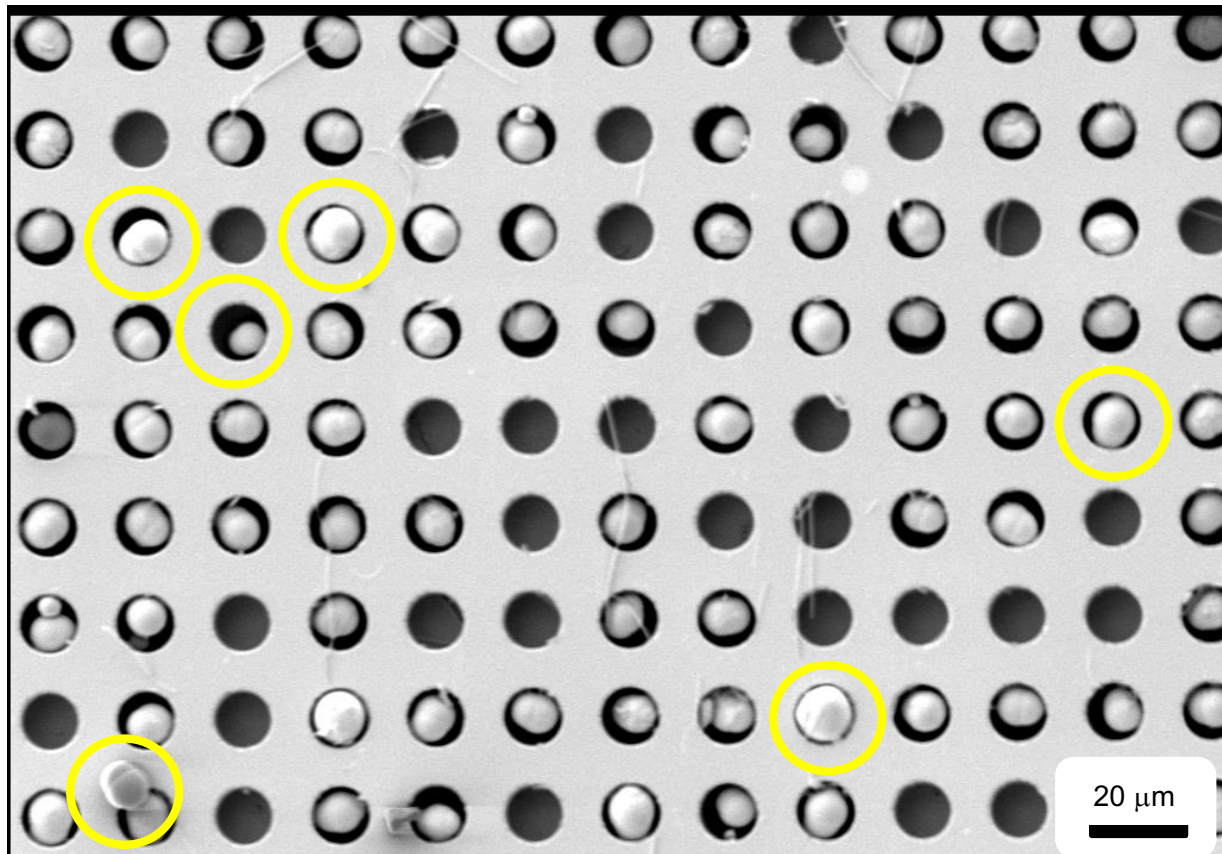


Abbildung 84: REM-Aufnahme der Oberfläche nach der Inkubation im Ofen

Als Vorversuch und zur besseren Veranschaulichung wurden die Partikel auf einem hydrophoben Kavitäenträger mit größeren Kavitäten (50 µm Durchmesser) platziert (Abbildung 85a). Nach einer 10 sekundigen Inkubation in Acetondampf waren alle Partikel in den Kavitäten geschmolzen (Abbildung 85b).

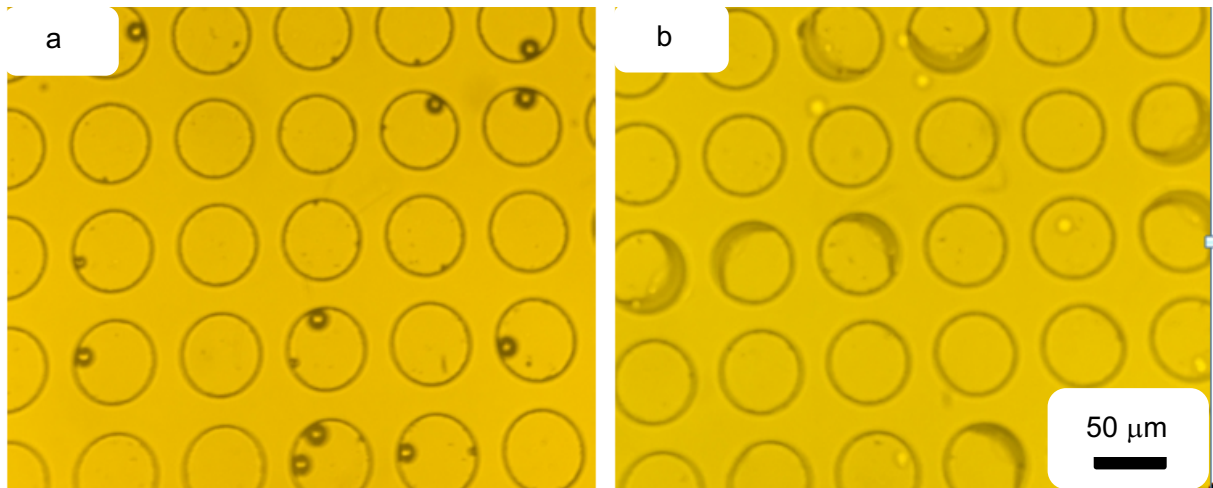


Abbildung 85: Mikroskopische Aufnahmen des Partikelschmelzversuchs; a Partikel in Kavitäten vor der Inkubation in Acetondampf. b nach der Inkubation in Acetondampf

Nach diesem Vorversuch wurde die Inkubation der Partikel in Acetondampf wieder mit dem korrekten Kavitäträger (mit 12 μm Durchmesser) wiederholt und das Ergebnis per REM analysiert.

Um sicherzustellen, dass alle Partikel geschmolzen werden, wurde die Acetondampf-Inkubationszeit auf fünf Minuten erhöht. Anschließend wurde der Kavitäträger 1 h bei 90 °C im Ofen behandelt. Die REM-Aufnahme (Abbildung 86) dieses Kavitäträgers zeigt, dass diesmal alle Partikel geschmolzen sind und dadurch der Boden der Kavität deutlich besser mit der Partikelschmelze bedeckt ist. Dennoch bleibt in manchen Kavitäten bis zur Hälfte unbedeckt. (Eine vollständige Füllung der Kavität mit der Partikelschmelze von einem Partikel ist nicht möglich, da das Volumen der Partikel einem Drittel des Volumens der Kavität entspricht).

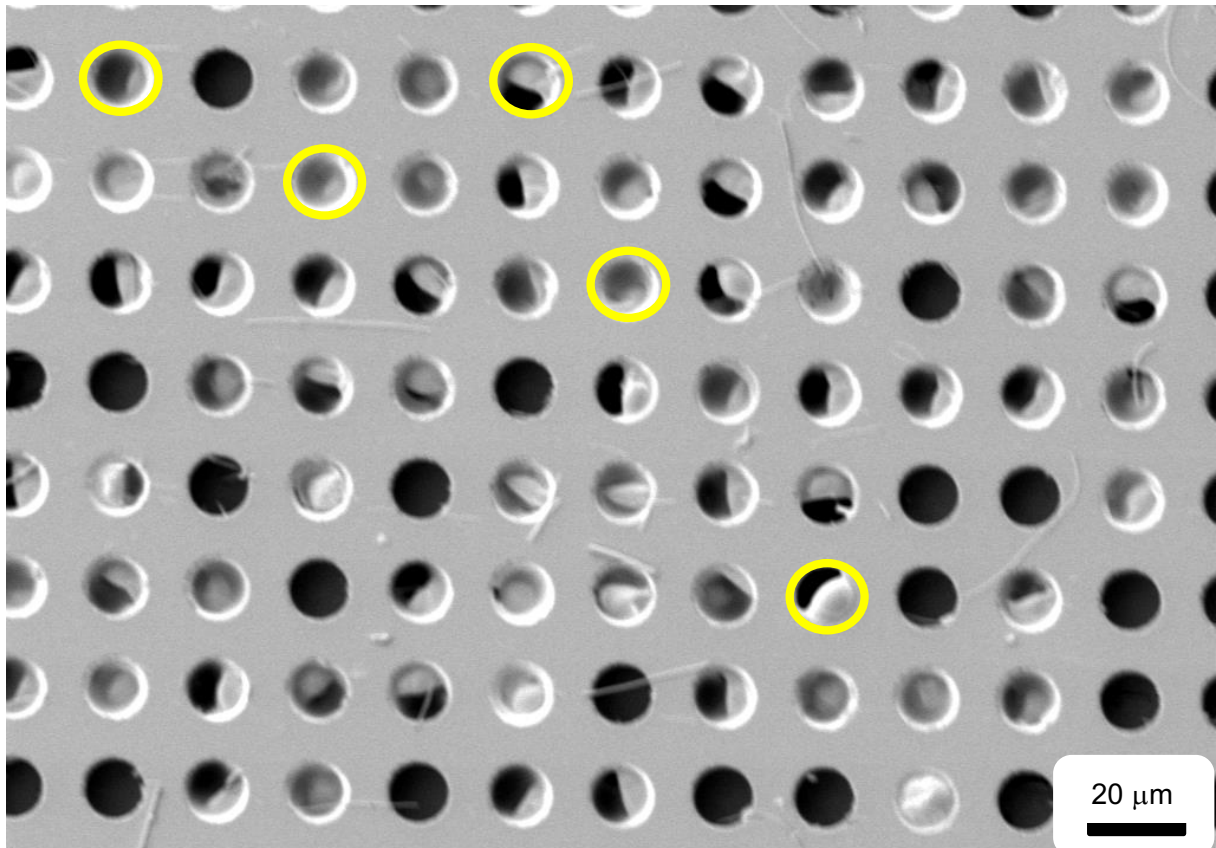


Abbildung 86: REM-Aufnahme der Oberfläche nach einer fünfminütigen Inkubation in Acetondampf und nach einer Stunde im Ofen bei 90 °C

Die Kavitäten mit halb gedeckten (Kavitäten) Boden könnten unter Umständen durch längere Inkubation des Kavitätenträgers in Acetondampf vollständig mit der Partikelschmelze bedeckt werden. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Kavitätenträger mit den Partikeln befüllt und die anschließende Inkubation des Kavitätenträgers in Acetondampf wurde auf eine Stunde verlängert. Danach wurde der Kavitätenträger eine Stunde bei 90 °C im Ofen erhitzt. Das REM-Bild (Abbildung 87) zeigt in diesem Fall jedoch keine signifikante Verbesserung der Bodenbedeckung durch Partikelschmelze im Vergleich zum vorherigen Experiment. Dies bedeutet, dass die an der Kavitätenwand platzierten Partikel zwar durch Inkubation in Acetondampf verflüssigt werden könnte, die Partikelschmelze jedoch aufgrund der Adhäsionskraft mit der Kavitätenwand interagiert. Dadurch klebt die Partikelschmelze an der Wand und kann den Boden der Kavität nicht mehr bedecken.

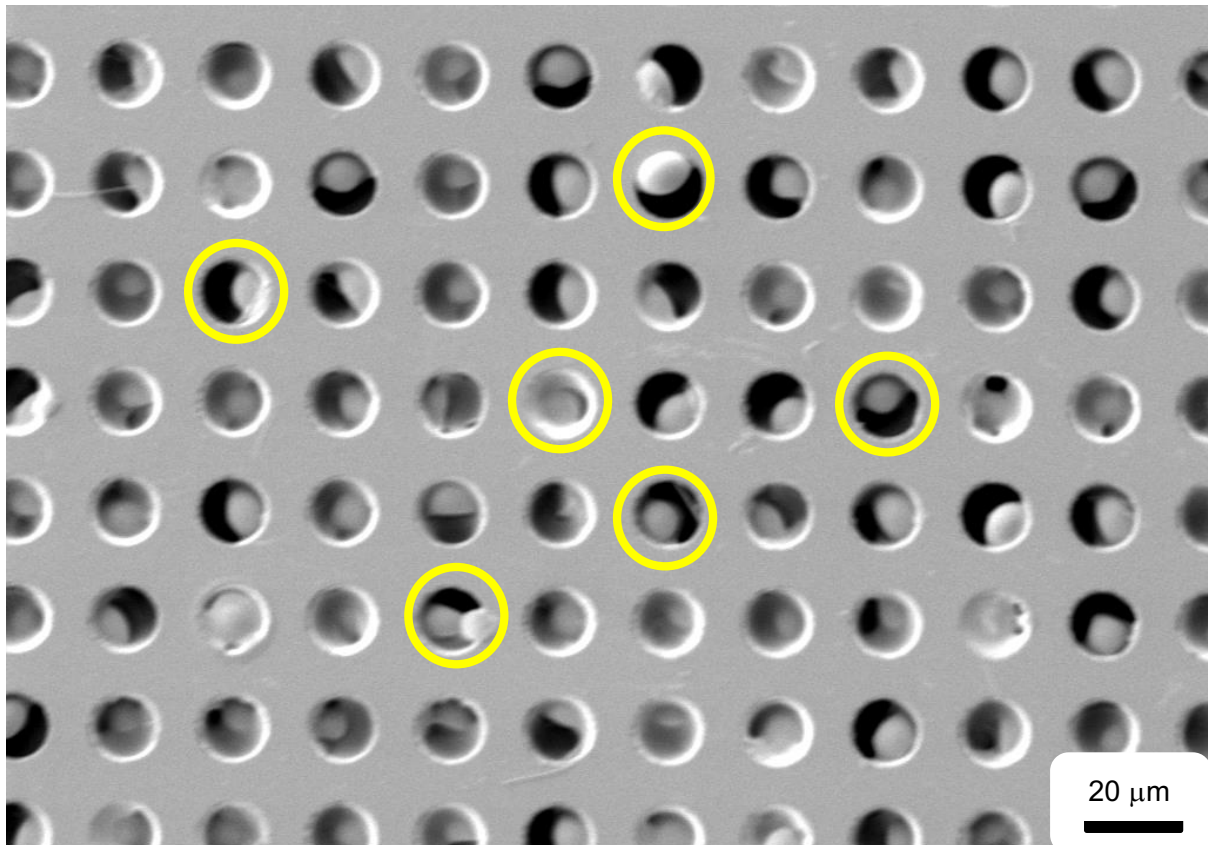


Abbildung 87: REM-Aufnahme der Oberfläche nach einer einstündigen Inkubation in Aceton-Dampf und nach einer Stunde im Ofen bei 90 °C

Dieser Höhenunterschied zwischen Partikeln in Kavitäten stellt nicht nur ein Problem für die Peptidsynthese dar, sondern auch das Codelesen. Je näher ein Partikel sich am oberen Rand der Kavität befindet, desto stärker ist das Signal. Dieses Phänomen tritt auf, weil bei dem zur Analyse verwendeten Fluoreszenzscanner die gemessene Signalintensität stark von der Fokusebene abhängt. Verschiebt sich diese um wenige μm , ändern sich die gemessenen Intensitäten erheblich.

Zum Vergleich wurden mit TAMRA-markierte Partikel (Code „schwaches Grün“) einmal auf einen hydrophoben Kavitätrträger und einmal auf einen nicht-funktionalisierten Kavitätrträger platziert. Nach dem Inkubationsprozess wurde der Partikelcode der beiden Kavitätrträger mit einem Fluoreszenzscanner untersucht.

Die Partikel in Kavitäten eines hydrophoben Kavitätrträgers zeigen nicht nur ein inhomogenes Fluoreszenzbild, sondern in einigen Kavitäten werden auch falsche Codes (statt Code „schwaches Grün“, Code „starkes Grün“) detektiert (Abbildung 88). Diese falschen Codes könnten durch die jeweilige Höhenposition der Partikel in den Kavitäten verursacht worden sein.

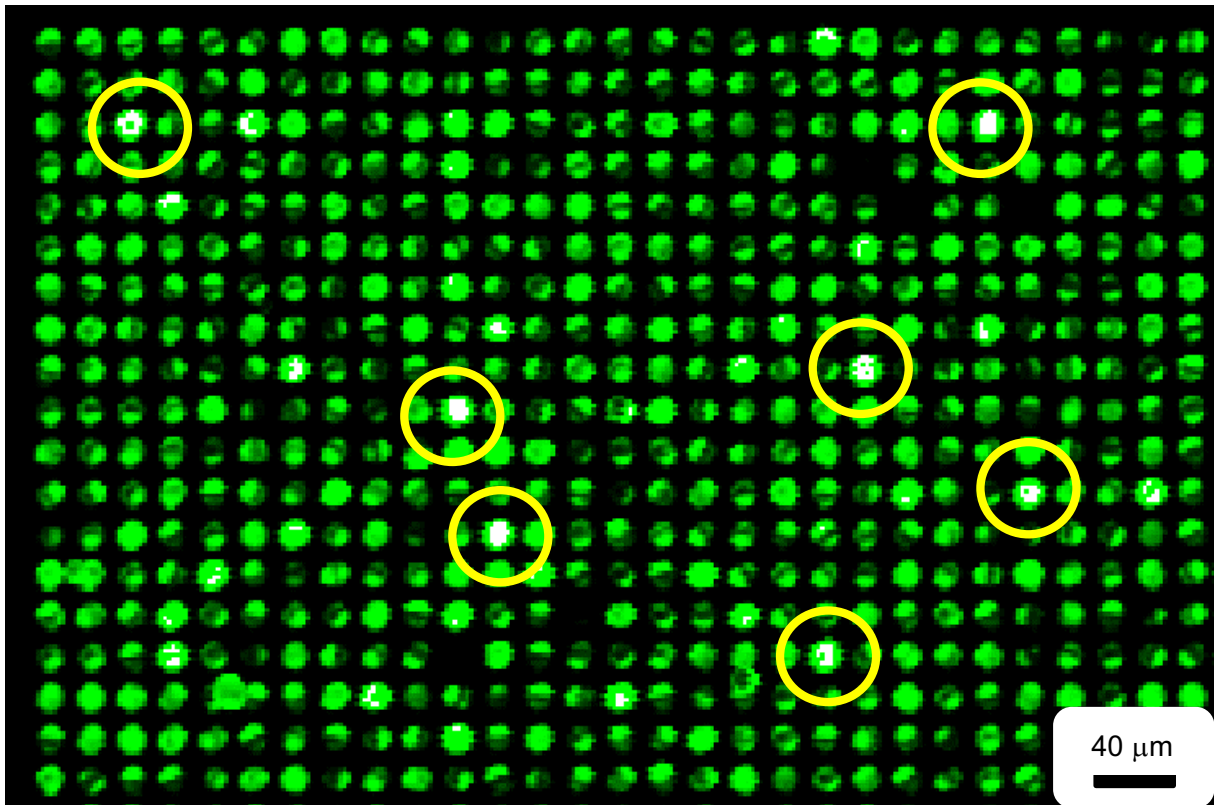


Abbildung 88: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln mit Code „schwaches Grün“ nach der Inkubation im Ofen; Partikel in Kavitäten eines hydrophoben Kavitäträgers; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm; Filter: 580/14 nm; Auflösung: 2 μm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Nach einer zusätzlichen Acetondampfinkubation dieses Kavitäträgers wurden bei der Analyse weiterhin vereinzelte falsche Codes beobachtet (Abbildung 89). Die Codesignale in einigen Kavitäten zeigen ein Sichelmuster. Dieses Muster entspricht den halbgefüllten Kavitäten aus der vorherigen REM-Aufnahme. Das bedeutet, dass die Partikelschmelze den Boden der Kavitäten nicht komplett abdeckt.

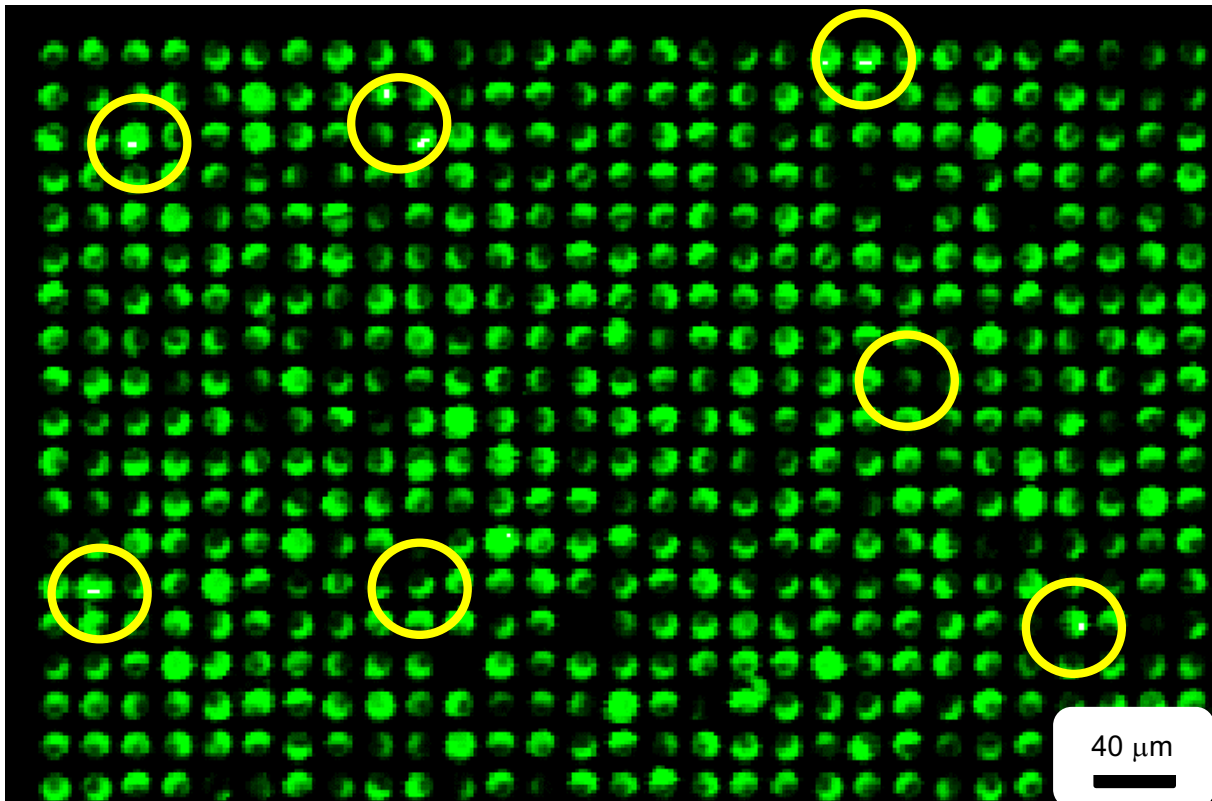


Abbildung 89: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln mit Code „schwaches Grün“ nach der Inkubation in Acetondampf und im Ofen; Partikel in Kavitäten eines hydrophoben Kavitäträgers. Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm; Filter: 580/14 nm; Auflösung: 2 μm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Zum Vergleich wurde das gleiche Experiment auf einem nicht-funktionalisierten Kavitäträger durchgeführt. Nach der Inkubation im Ofen wurden die Partikelcodes mit dem Scanner analysiert. In diesem Fall wurden die Partikelcodes von dem Fluoreszenzscanner korrekt detektiert. Die Signale der Codes sind homogen (Abbildung 90) und zeigen ein kreisförmiges Muster. Dies bedeutet, dass der Boden der Kavität vollständig mit Partikelschmelze bedeckt wurde. Diese Beobachtung untermauert die Hypothese, dass der hydrophobe Steg den Höhenunterschied der abgelagerten Partikeln in den Kavitäten induziert.

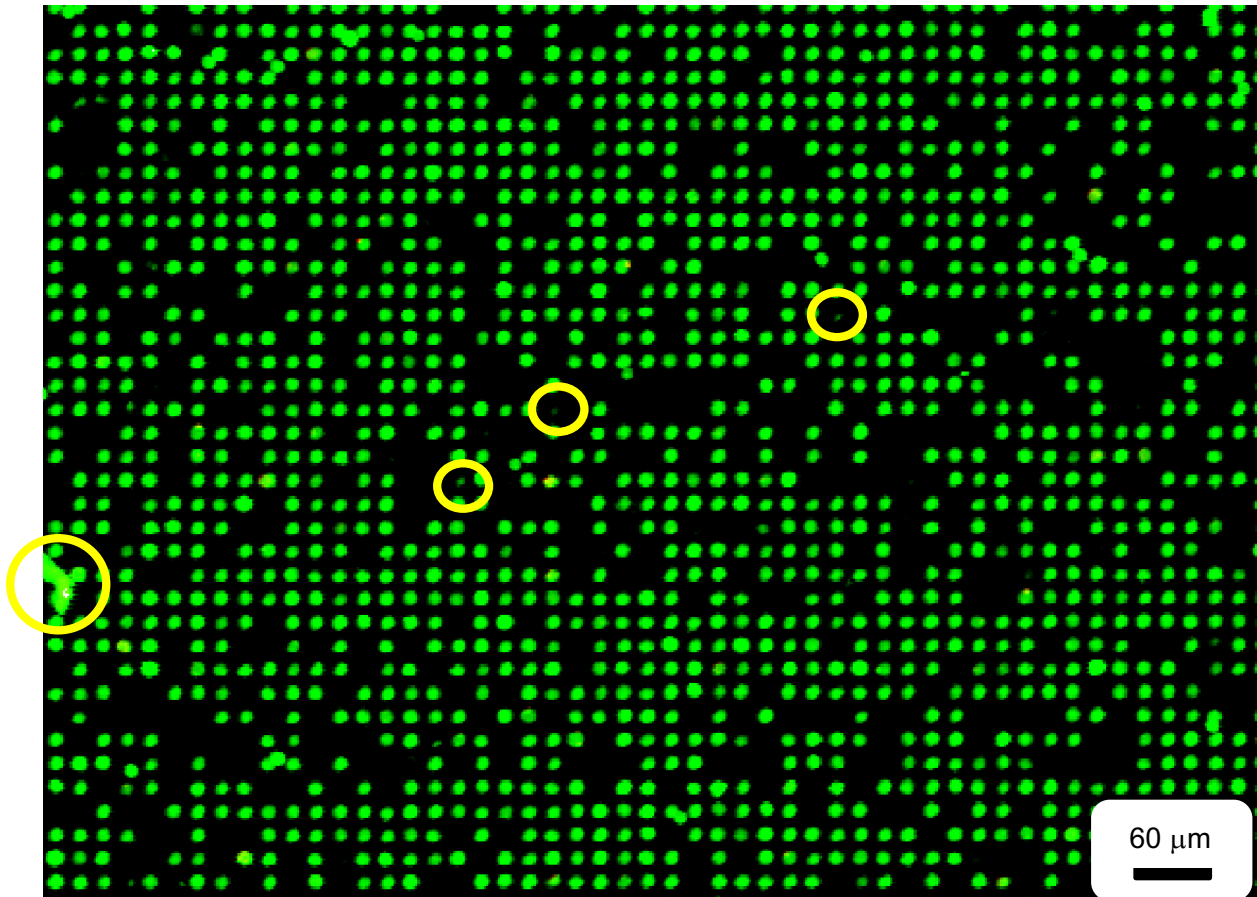


Abbildung 90: Fluoreszenzaufnahme von Partikeln mit Code „schwaches Grün“ nach der Ofen-Inkubation Partikel in Kavitäten eines nicht-funktionalisierten Kavitäträgers; Kontamination miterfasst; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm; Filter: 580/14 nm; Auflösung: 2 μm; Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Nach der Anpassung der Synthesemethode wurde ein weiterer Peptid-Tag, der HA-Tag, auf der an den Stegen hydrophoben, mit PEGMA/MMA funktionalisierten Oberfläche eines Kavitäträgers synthetisiert und die hergestellten Peptide mit anti-HA-Cy3 Antikörper nachgewiesen. Abbildung 91 stellt die Fluoreszenzaufnahme der gesamten Oberfläche mit einem *gain* von 2,0 nach der Antikörperfärbung dar. Die grünen Fluoreszenzsignale deuten die Antikörper-Antigen-Bindung hin und bestätigen die Sequenzen des hergestellten Peptids. Die Signale der HA-Antikörper-Färbung sind um Faktor 7 intensiver und homogener als die Signale der FLAG-Färbung, was allerdings auch an einer unterschiedlichen Bindungsaffinität der verwendeten Antikörper liegen könnte. Die optimierte Synthesemethode mit der zusätzlichen Acetondampfinkubation ermöglicht jedenfalls eine homogene Signalverteilung in den Kavitäten.

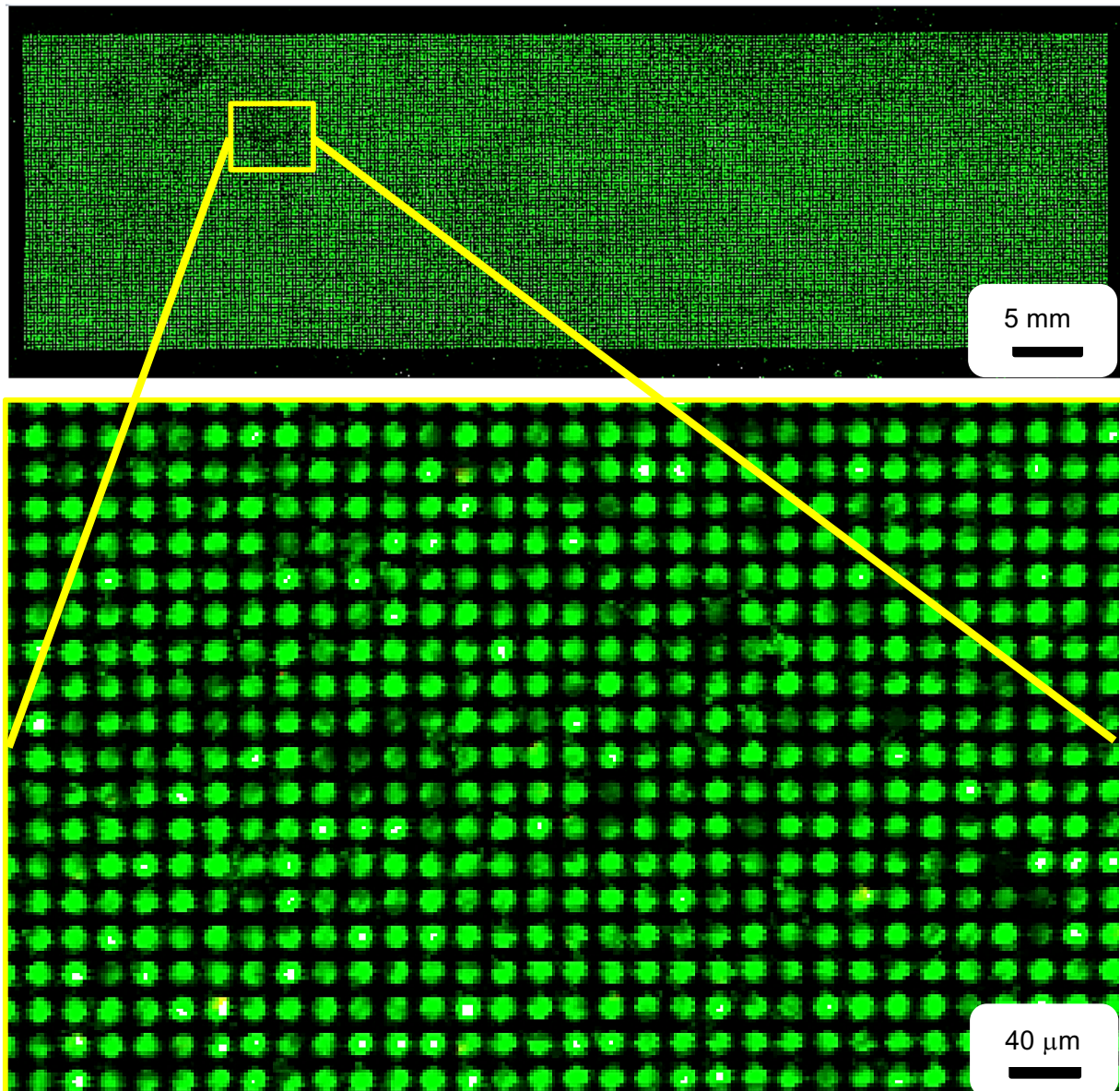


Abbildung 91: Fluoreszenzaufnahme der gesamten Oberfläche des Kavitäträgers nach der Antikörperfärbung von HA-Tags; Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 µm; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

Bei der Herstellung des HA-Tags wurde im Partikelplatzierungsprozess ein durchschnittlicher Füllgrad von 99 % erreicht (Tabelle 9). In der zweiten, dritten und siebten Schicht waren nahezu alle Kavitäten mit Partikeln gefüllt und die achte Schicht hatte mit 96 % der geringste Füllgrad.

Tabelle 9: Füllgrade des Partikelplatzierungsprozesses der Einzelschichten bei der Synthese von HA-TAG

Schicht	Aminosäure	Füllgrade
1	Ala	98 %
2	Tyr	nahezu 100 %
3	Asp	nahezu 100 %
4	Pro	99 %
5	Val	99 %
6	Asp	99 %
7	Tyr	nahezu 100 %
8	Pro	96 %
9	Tyr	98 %

Bei der Analyse der HA-Antikörperfärbung wurde möglicher Polymerfilmdefekt auf der Oberfläche des Kavitäträgers beobachtet (Abbildung 92). Möglicherweise wurde an dieser Stelle ein mehrschichtiger Polymerfilm synthetisiert (siehe Kap. 3.5, S. 86). An dieser Stelle könnten Peptide auf den oberen Schichten des mehrschichtigen Polymerfilms synthetisiert worden sein. Da sich diese oberen Schichten durch mehrmaliges Behandeln des Kavitäträgers mit Ultraschall und die Inkubation mit TFA ablösen, sinkt die Peptiddichte an der betroffenen Stelle und führt zu einer inhomogenen Antikörperfärbung.

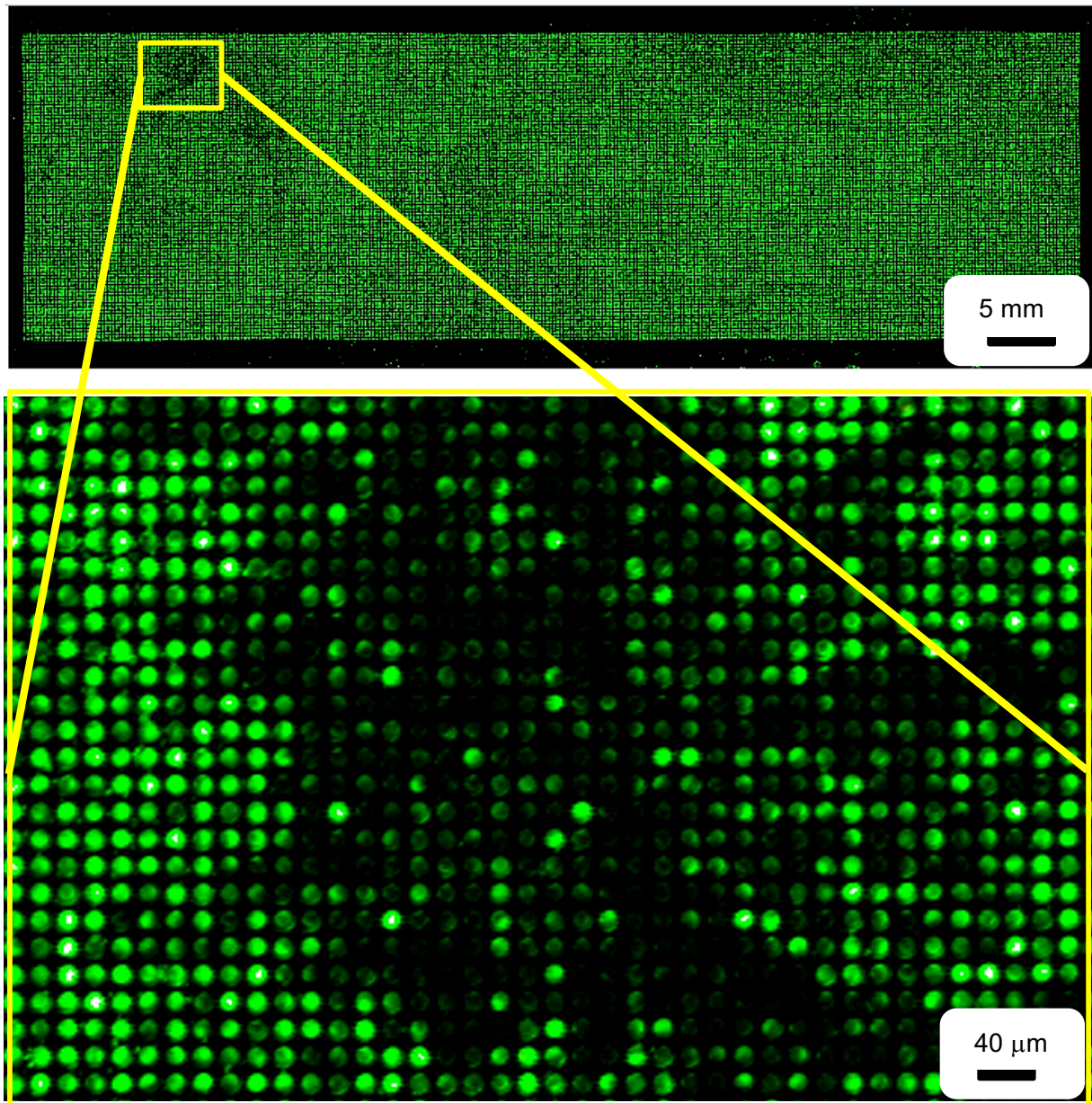


Abbildung 92: Fluoreszenzaufnahme der Oberfläche des Kavitäträgers nach der Antikörperfärbung von HA-Tags. Mögliche Polymerfilmdefekt auf der Oberfläche; Anregungswellenlänge 532 nm, Filter: 582/75 nm, Auflösung: 2 μm ; Die Bilder wurden in Helligkeit und im Kontrast optimiert

4. Zusammenfassung und Ausblick

Zum Aufbau eines funktionsfähigen Peptidarrays ist mit der bisherigen Methode nicht möglich.^[29-30] Dies liegt daran, dass diese Methode Schwachstellen in verschiedenen Verfahrensschritten aufweisen:

- (I) Die begrenzte Aufnahme von Aminosäure am PMMA-Partikel
- (II) Die mechanische Platzierungsmethode führt zu Materialaustausch (Aminosäure und Codes) zwischen den Partikeln
- (III) Die Aminosäure von am Rand der Kavitäten hängenden Partikel stehen nicht an den Aufbau des Peptidarrays zur Verfügung
- (IV) Die Codierung von Partikeln ist nicht zuverlässig, Die Signale des Codes sind inhomogen

In Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die auflisteten technischen Hürden behoben und konnte mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode erstmals qualitativ hochwertige und extrem dichte Peptidarrays mit 248.000 Spots/cm² hergestellt werden und der Erfolg der Synthese durch die Antikörperfärbung der HA- und Flag-Tags überprüft und bestätigt werden.

Hierzu wurde die Prozessschritte der bisherigen Methode^[29-30] neu entwickelt: 1. Die Beladung der Partikel mit Aminosäuren, 2. die Codierung der Partikel und 3. Die möglichst vollständige Platzierung der Partikel ohne mechanischen Stress in den Kavitäten.

Beladung der Partikel mit Aminosäuren

Bei der bisherigen Methode mit kommerziell erhältlichen quervernetzten PMMA-Partikeln war das Problem, dass die Aminosäure-Bausteine nur auf die Oberfläche der Partikel beschichtet waren. Dies hat den Nachteil, dass die Aufnahmekapazität des Partikels für Aminosäuren auf maximal 3 Gew.-% begrenzt ist.^[29-30] Dabei wurde die Menge der beladenen Aminosäuren auf das Gewicht und nicht auf die Stoffmenge bezogen. Beispielsweise steht bei gleicher Masse fast doppelt so viel Fmoc-Glycin-OPfp wie Fmoc-Arginin-OPfp zur Verfügung.

Ein weiteres Problem bei dem Verfahren war das Mahlen von Aminosäure-Partikel-Aggregaten. Da die Aminosäure-Bausteine nur auf die Oberfläche des Partikels aufgetragen wurden, Könnte diese Beschichtung aufgrund des mechanischen Mahlprozesses zerstört werden. Dies würde zur Bildung von drei Arten von Partikeln führen: Reine

Aminosäurefragmente, Partikel mit unbeschädigter und Partikel mit beschädigter Aminosäurebeschichtung. Diese möglichen Partikelgemische sind nicht voneinander separierbar und könnten mit großer Wahrscheinlichkeit einer der Gründe für die enttäuschenden Syntheseergebnisse der publizierten Methode sein.^[29-30]

Um eine höhere und sichere Beladung des Partikels mit Aminosäuren zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit völlig neue Partikel hergestellt. Als Partikelmaterial wurde hierfür das schmelzbare Matrixpolymer SLEC-7552 verwendet. Bei der Partikelherstellung wurden verschiedene Mikrofluidik-Technologien, wie SPG-Membranemulsion und Tröpfchengenerator getestet, um möglichst homogene monosphärische Partikel mit Größen im Bereich von ca. $9 \pm 2 \mu\text{m}$ zu synthetisieren. Eine enge Größenverteilung ist wichtig, damit nur je ein Partikel pro Kavität ($12 \mu\text{m}$ Durchmesser) Platz hat. Der Tröpfchengenerator wurde zur Methode der Wahl, da diese Technologie Partikel mit engster *Gauß*-Verteilung erzeugen kann.

Nach den Optimierungen konnten Partikel der gewünschten Größe hergestellt (siehe Abbildung 41. S. 52) und alle 20 biogene Aminosäuren in Partikel aufgenommen werden. Die Aufnahmekapazität des Partikels steigt auf bis zu 16 Gew.-% (siehe Tabelle 3, S. 53) und kann gegenüber der bisherigen Methode (bis zu 3 Gew.-%)^[29-30] eine deutlich größere Menge an Aminosäure-Bausteine für die Synthese bereitstellen. Bei der Kupplungsreaktion im Ofen können die Aminosäure-Bausteine wieder für die Synthese zur Verfügung gestellt werden (siehe Abbildung 44. S. 56).

Partikelcodierung

Um die hergestellten und mit Aminosäuren beladenen Partikel voneinander unterscheidbar zu machen, müssen die Partikel mit entsprechenden Codes markiert werden. Nach der bisherigen Methode^[29-30] müssen die Partikel zuerst die QDs adsorbieren und dann die entsprechende Aminosäure auf der Partikeloberfläche beschichten. Dies hat den Vorteil, dass die Aminosäure das QD schützt.

Die QD-Markierung von *Popov*^[29-30] wurde mit insgesamt 4 QD-Typen, 14 Codierungsmöglichkeiten (siehe Kap. 3.2, S. 27) generiert. Das genügt nicht, um 20 Aminosäuren zu markieren. Außerdem wurde eine Einlagerung von QDs in dem Polymerfilm des Objektträgers beobachtet, die nicht mehr entfernt werden konnte (siehe Abbildung 45, S. 58). Diese QD-Einlagerung summiert sich bei sich wiederholenden Synthesezyklen. Dies erschwert sowohl die Identifizierung von Partikelcodes als auch die spätere Antikörperfärbung aufgrund des

Hintergrundsignals. Außerdem stellt die unkontrollierte Freisetzung von QD ein Gesundheitsrisiko dar.

Das in dieser Arbeit neu entwickelte Codierverfahren nutzt organische Fluorophore zur Markierung der Partikel. Dazu wurden drei Fluorophore verwendet: BDP-FL-Amin, TAMRA-Amin und Cyanin-5-Amin. Die Verwendung von Fluorophoren hat den Vorteil, dass aufgrund ihrer geringen Toxizität und einfachen Handhabung im Vergleich zu QDs keine weiteren Schutzmaßnahmen erforderlich sind. Die Markierung mit Fluorophoren lieferte trotz des breiten Absorptions- und Emissionsspektrums ein überraschend gutes Ergebnis. Bei Verwendung geeigneter Filter konnten die Signale in den jeweiligen Kanälen separat aufgezeichnet werden. Anhand einer Konzentrationsdifferenz konnten aus 3 Fluorophoren 21 mögliche Farbcodekombinationen (siehe Tabelle 6, S. 77) generiert werden. Mit dem neuen Codierverfahren können alle 20 Aminosäuren eindeutig codiert und mit einem Fluoreszenzscanner ausgelesen werden.

Partikelplatzierung

Die Platzierung von Partikeln nach dem bisherigen Verfahren war ein mechanischer Vorgang. Die trockene Partikel wurde mit fusselfreien Tüchern in die Kavitäten gewischt.^[29-30] Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Durchführung schnell und einfach ist. Durch den mechanischen Wischprozess werden die Partikel jedoch mechanisch so stark beansprucht und machten eine exakte Auslesung der Partikelcodes unmöglich. Ein weiteres Problem bei dem Verfahren war die Entfernung von überschüssigen Partikeln unter Verwendung von Druckluft. Dadurch konnte eine Kontamination des gesamten Abzugsbereichs nicht ausgeschlossen werden. Zudem wurde häufig beobachtet, dass auch Partikel aus Kavitäten entfernt wurden.

Ein weiteres Problem bestand darin, dass mechanisch beanspruchte Partikel an den Wänden der Kavitäten haften blieben. Dadurch können die Aminosäure-Bausteine bei der Extraktion (durch Hitze oder Lösungsmitteldampf) den Boden der Kavitäten (Synthesefläche) nicht erreichen und die Peptide in dieser Kavität können nicht wie geplant weiter verlängert werden.

Die neu entwickelte Methode der Templat-unterstützten, selbstorganisierten Partikelplatzierung sorgt dafür, dass die mechanische Belastung der Partikel minimal ist. Anstelle von trockenen Partikeln wird eine Partikelsuspension auf die Oberfläche des Kavitäträgers

aufgetragen. Die Suspension hält die Partikel gefangen und verhindert eine unkontrollierte Freisetzung von Partikeln in die Umgebung. Um die Suspension an Ort und Stelle zu halten, wurde eine Platzierungskammer gebaut (siehe Abbildung 66, S. 81). Während des Platzierungsprozesses brach der Meniskus nicht nur die Partikel in die Kavitäten, sondern entfernte auch die überschüssigen Partikel von der Oberfläche des Kavitäträgers. Mit diesem neuen Verfahren waren durchschnittlich mehr als 98 % aller Kavitäten mit den Partikeln gefüllt.

Synthese eines extrem hochdichten Peptidarrays

Mit der neu entwickelten Methode wurde zwei Peptid-Tags, ein HA- und ein FLAG-Tag, erfolgreich synthetisiert und die beiden Tags, die HA-Tags in 90 % aller Kavitäten und die FLAG-Tags in 85 % aller Kavitäten, anhand der Antikörperfärbung nachgewiesen. Mit der bisherigen Methode konnte Peptid jedoch nur in 4,8 % aller Kavitäten hergestellt werden.^[29-30] Dies bedeutet, dass die Methode zum Aufbau von Peptiden funktionsfähig ist und die hergestellten Peptide die richtigen Sequenzen aufweisen.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode können zukünftig Peptidarray mit einer Peptiddichte von 248.000 Peptide/cm² kostengünstig auf mikrostrukturierten Trägern synthetisiert werden. Durch weitere Miniaturisierung der Kavitäten könnte die Peptiddichte pro Quadratcentimeter noch weiter erhöht werden. Mit dieser neuen Methode können derzeit Peptide mit unterschiedlichen Sequenzen in 2,79 Mio Kavitäten hergestellt werden. Hierfür ist eine geeignete Auslesesoftware erforderlich, um die Codes der jeweiligen Partikel in den einzelnen Schichten auszulesen und daraus eine Bibliothek aufbauen zu können.

Optimierungsbedarf

Um die neu entwickelte Methode weiter zu perfektionieren, könnte die Methode weiter optimiert werden. Bei der Antikörperfärbung wurde festgestellt, dass die Signale in einigen der unterschiedlichen Kavitäten nicht homogen waren (siehe Abbildung 80, S. 97 und Abbildung 91, S. 108). Dies könnte daran liegen, dass die Partikelschmelze - viel seltener als bei der bisherigen Methode^[29-30] - den Kavitätenboden (Synthesefläche) während der Kupplungsreaktion nicht in allen Fällen vollständig bedeckt, so dass die Aminosäuren in der Partikelschmelze nicht mit der gesamten Synthesefläche kuppeln können. Dies reduzierte die Peptiddichte in den betroffenen Kavitäten, was die inhomogene Antikörperfärbung erklären könnte. Um dieses Problem zu beheben, sollten eine spezielle Aceton-Dampfkammer für den Einsatz in einer Zentrifuge konstruiert werden. Beim Inkubieren des Kavitäträgers in

dieser Kammer soll die Partikelschmelze mit Hilfe der Zentrifugalkraft näher an den Boden der Kavität gedrückt werden, um eine vollständige Bedeckung des Bodens mit Partikelschmelze zu ermöglichen. Die Kammer muss jedoch so gestaltet sein, dass das Lösungsmittel nicht direkt mit dem Kavitäträger in Berührung kommt. Ein kurzer Kontakt von Aceton (flüssig) mit dem Kavitäträger reicht aus, um trotz des hydrophoben Stegs die Aminosäure aus den betroffenen Kavitäten in die benachbarten Kavitäten zu diffundieren. Dies führt zu einer Kreuzkontamination der betroffenen Kavitäten

Weiterer Optimierungsbedarf bezieht sich auf die Entgasung der Kavitäten. Bisher wurde der Kavitäträger einer wiederholten Ultraschallbehandlung unterzogen, die zum Bruch des Kavitäträgers führen kann. Eine schonendere Methode zur Entgasung der Kavitäten wäre daher von Vorteil.

Anwendungen der Peptidarrays

Wie in der Einleitung besprochen, können solche Peptidarrays verwendet werden, um nach potentiellen peptidbasierten Antibiotika zu suchen. Die Kavitäten können in diesem Fall als separater Testraum für Bakterien fungieren. Die an die Oberfläche synthetisierten Peptide müssen nach der Befüllung mit Zellen freigesetzt werden, um eine Interaktion zwischen Peptiden und Zellen zu ermöglichen. Ein Stoffaustausch zwischen den benachbarten Kavitäten ist hier räumlich nicht möglich und somit können Fehlsignale minimiert werden.

Die Suche nach Antikörpern, die posttranslational modifizierte Peptide erkennen, erfordert eine enorme Vielfalt an Peptiden, die mit molekularbiologischen Methoden wie dem Phagen-Display nur schwer zu bewältigen sind. Für diese Art der Untersuchung ist der größte Mehrwert der in dieser Arbeit entwickelten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode zu erwarten. Denn mit der neu entwickelten Methode können in kürzester Zeit bis zu 248.000 Peptide/cm² zuverlässig hergestellt werden.

5. Experimenteller Teil

5.1 Materialien

Analysenwaage

Die Analysenwaage ML 54/01 der Firma Mettler Toledo (Greifensee/Schweiz) wurde verwendet

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie CytoFLEXs der Firma Beckman Coulter (USA) wurde verwendet

Fluoreszenzscanner

Der Fluoreszenzscanner InnoScan 1100 AL der Firma Innopsys (Carbonne/Frankreich) wurde verwendet

Flusssensor

Der Flusssensor Flow Unit M und Flow Unit L der Firma Fluigent wurde verwendet

Glasspritze

Die 10 mL Gasdichte Glasspritzen der Firma VWR wurde hierfür verwendet

Mastersizer

BECKMAN COULTER Model: LS 230 mit LS variable speed fluid module plus wurde verwendet

Mikrofluidikpumpen

Die Mikrofluidikpumpen Line UP Flow EZ 2000 mbar der Firma Fluigent wurde eingesetzt

Mikrostrukturierter Glasträger

Die mikrostrukturierte Glasträger der Firma AMO wurde verwendet

Oberflächebeschichtung

Der Sputter Coater 108auto der Firma Cressington wurde verwendet

Ofen

Der Ofen B 180 der Firma Nabertherm wurde verwendet

Peptidreaktor

Der Peptidreaktor Preppy der Firma Supelco (Pennsylvania/USA) wurde verwendet

Photometer

Das Spektralphotometer Jenway 7305 der Firma Bibby Scientific Ltd (Staffordshire/UK), sowie die Küvetten „UV-Cuvette Micro“ der Brand GmbH & Co. KG wurde verwendet

Plasmagerät

Das Plasmagerät Zepto Modell 2 Typ A der Firma Diener wurde verwendet

Rasterelektronenmikroskop

Die Rasterelektronenmikroskop EVO 10 der Firma Zeiss wurde verwendet

Spritzpumpen

Die Spritzpumpen Legato 101 der Firma KdScientific wurde verwendet

Tröpfchengenerator

Der Tröpfchengenerator sideconnect der Firma Micronit (Niederland) wurde eingesetzt

Ultraschallbad

Das Ultraschallbad FB15061 der Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts/USA) wurde verwendet

Wippschüttler

Die Wippschüttler RS-RS 5 der Firma Phoenix Instrument GmbH wurde hierfür verwendet

5.2 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel von Thermo Fisher Scientific (Schwerte / Deutschland) bezogen oder waren bei der Arbeitsgruppe erhältlich

Fluorophoren

Die verwendeten Fluorophoren wurden von der Firma Lumiprobe (Hannover/Germany) erworben

Aminosäuren

Die verwendeten Fmoc-Aminosäuren wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Germany) erworben.

Polymer-Matrix

Die Matrix (SLEC-P LT 7552) wurde von der Firma Sekisui Chemical Co. Ltd. (Osaka/Japan) erworben

Antikörper

Der verwendete Ready Tag anti-HA Clone 12CA5 wurde von der Firma BioXCell/Hölzel Diagnostika Handels GmbH (Köln/Deutschland) erworben. Der monoklonale Anti-Flag M1 Antikörper wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) bezogen.

Ultrapures Wasser

Ultrapures Wasser wurde mit einem Synergy® Water Purification System, ausgestattet mit einem Synergy Pak 2 von Merck (Darmstadt/Deutschland), generiert.

5.3 Methoden

5.3.1 Methode nach *Popov*^[29-30]

Partikelcodierung mit QDs

In einem 20 mL Becherglas wurde 1 g PMMA-Partikel in 10 mL DCM suspendiert. Nach 30 Minuten Rühren wurde 100 µL QD-Suspension (2,5 mg/mL) zugegeben und für weitere 30 Minuten gerührt. Die Suspension wurde dann in ein 25 ml Becherglas überführt. Anschließend wurden der Suspension mit einer Bürette 30 ml Aceton zugetropft. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Geschwindigkeit des Tropfens mit der Verdampfung des DCM entsprach. Dann wurde 30 mL Ethanol unter den gleichen Bedingungen zu der Suspension gegeben. Danach wurde der Suspension unter den gleichen Bedingungen 30 ml Ethanol zugesetzt. Die Partikel wurden sedimentiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde die Suspension zweimal mit Ethanol und dann zweimal mit Aceton gewaschen.

Aminosäureadsorption am Partikel

In einem Becherglas wurde Aminosäure (siehe Tabelle 1, S. 28) in 4 mL DCM gelöst. Diese Lösung wurde auf die mit QD markierten PMMA-Partikel aufgetragen. Diese Suspension wurde gerührt, bis ein Gelartiges Medium entstand. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, wurden die Aminosäure-Partikel-Aggregate in ein Falcon Tube überführt und mit zwei Stahlkugel gemahlen. Die Partikel wurden unter Argon bei 4 °C aufbewahrt.

5.3.2 Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode^{optimiert nach [29-30]}

Fmoc-Entschützung mit Beladungsmessung

Ein hydrophober Kavitäträger wurde trocken in eine Petrischale gelegt und mit 1,00 mL einer 10,0 % Piperidin in DMF (v/v) Lösung für 1 h bedeckt inkubiert. Danach wurde die Entschützungslösung in eine UV-Küvette überführt und die Absorption bei 305 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe des *Lambert-Beerschen* Gesetzes wurde die Beladung bestimmt. Anschließend wurde die Oberfläche des Kavitäträgers 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Der Kavitäträger wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Fmoc-Entschützung

Ein hydrophoben Kavitäträger wurde 10 min in DMF gequollen und anschließend in einer 10,0 % Piperidin in DMF (v/v) Lösung für 1h geschüttelt. Danach wurde die Oberfläche des Kavitäträgers 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Als letztes wurde dieser Kavitäträger mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Herstellung der PDMS-Schablone

Eine Mischung aus flüssigem PDMS-Prepolymer mit einem Härter im Verhältnis 7:1 wurde über eine vorgefertigte Form gegossen. Nach einer zehnmütigen Inkubation im Ofen bei 90 °C wurde das PDMS abgekühlt, entformt und zwei Anschlussstellen mit einem PDMS-Stanzer gebohrt.

Partikelplatzierung

Die hergestellte PDMS-Schablone wurde auf den hydrophoben, Fmoc-entschützten Kavitäträger gelegt und dann zwischen zwei Haltergläser platziert. Die Platzierungskammer wurde im Ofen bei 90 °C für 10 Minuten inkubiert. Nachdem Abkühlen wurde die Partikelsuspension über eine Anschlussstelle auf die Oberfläche des Kavitäträgers aufgetragen. Das Ganze wurde 5x1 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspensionslösung mit einer Spritzenpumpe (Flussrate: 2 µm/h) abgezogen. Die Oberfläche

des Kavitätenträgers wurde mit deionisiertem Wasser gewaschen, mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas gelagert.

Kupplungsreaktion von Aminosäure mit der Oberfläche

Ein hydrophober, Fmoc-entschützter Kavitätenträger wurde nach der Partikelplatzierung 5 min in einer Acetondampfkammer inkubiert. Anschließend wurde der Kavitätenträger in eine Kupplungskammer platziert und im Ofen 1h bei 90 °C unter Argon gekuppelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Oberfläche des Kavitätenträgers 2x1 min mit Aceton, 1x1 min mit deionisiertem Wasser und 1x1 min mit Aceton im Ultraschal gewaschen. Der Kavitätenträger wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Acetylierung (Capping)

Ein hydrophober, Fmoc-entschützter Kavitätenträger wurde 30 min in DMF inkubiert. dann wurde eine Mischung aus 10,0 % Ac_2O , 20,0 % DIPEA und 70,0 % DMF (v/v/v) zugegeben und über Nacht acetyliert. Danach wurde dieser Kavitätenträger 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Der Kavitätenträger wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Seitenkettenentschützung

Ein hydrophober, Fmoc-entschützter Kavitätenträger wurde 30 min in DCM inkubiert. Danach wurde dieser Kavitätenträger in einer Mischung aus 51,0 % TFA, 44,5 % DCM, 2,5 % TIPS und 2,0 % dest. Wasser (v/v/v/v) 90 min geschüttelt. Zum Schluss wurde der Kavitätenträger 1x5 min mit DCM, 1x5 min mit DMF und 1x30 min mit 5,0 % DIPEA in DMF gereinigt und anschließend nochmal 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Zum Schluss wurde der Kavitätenträger mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Fluoreszenzfärbung

Ein hydrophober, Fmoc-entschützter Kavitäträger wurde für 30 min in PBS-T (Phosphat gepuffertes Saline mit 0,1 % Vol Twee 20™) inkubiert. Dann wurde der Kavitäträger mit einer 1:10.000 Mischung aus TAMRA-NHS (20,0 mg/mL in DMF) in PBS-T zugegeben und über Nacht unter Lichtausschluss gefärbt. Zum Schluss wurde der Kavitäträger 1x5 min mit PBS-T, 1x5 min mit MilliQ, 1x5 min mit DMF, 2x5 min mit EE, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Der Kavitäträger wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Antikörperfärbung

Ein hydrophober, Fmoc-entschützter Kavitäträger wurde in einer Teflon-Synthesekammer 30 min in PBS-T inkubiert. Danach wurde der Kavitäträger mit Rockland Blocking Buffer (RN) 2 h bei 100 rpm geschüttelt und 1x5 min mit PBS-T gewaschen. Danach wurde eine Färbelösung aus einer 1:1000 Verdünnung eines Antikörpers (Monoklonaler Maus anti-HA-Cy3 (c=1,00 mg/mL) IgG Antikörper oder Monoklonaler Maus (M2) anti-Flag-Cy5 (c=1,00 mg/mL) IgG Antikörper) in 10,0 % RB in PBS-T (v/v), zugegeben und für 2 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Zum Schluss wurde der Kavitäträger 5x1 min mit PBS-T gewaschen, mit deionisiertem Wasser gespült, mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Knüpfen einer Amidbindung

Ein hydrophober, Fmoc-entschützter Kavitäträger wurde in einer Petrischale in einem Exsikkator unter Argon mit einer 0,1 M Lösung aus 1,00 Äq. Aminohexansäure, 1,00 Äq. DIC und 1,00 Äq. OxymaPure in 1,00 mL DMF bedeckt und für mindestens 16 h inkubiert. Danach wurde die Reaktionslösung entfernt und der Kavitäträger 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Zum Schluss wurde der Kavitäträger mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

5.3.3 Oberflächefunktionalisierung mit PEGMA/MMA^[modifiziert nach 100]

Reinigung und Aktivierung der Oberfläche des Kavitäträgers

Die Kavitäträger wurden über Nacht in einer 1 M KOH in iPrOH Lösung inkubiert. Danach wurden die Kavitäträger 5x2 min mit deionisiertem Wasser und 1x5 min mit EtOH gewaschen. Anschließend wurden die Kavitäträger für 30 min bei 110 °C inkubiert. Nach der Abkühlung wurden die Kavitäträger in einem Exsikkator unter Schutzgas platziert und für den nächsten Schritt vorbereitet.

Synthese von Bromierungsilan

Eine Mischung aus 4,68 mL (20 mM, 4,427 g) APTES, 2,77 mL (20 mM, 2,024 g) TEA wurden unter Schutzgas in 70 mL DCM gelöst und auf – 80 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Mischung aus 2,47 mL (20 mM, 4,598 g) α -Bromisobutyrylbromid in 30 mL wasserfreiem DCM tropfenweise unter konstantem Rühren zugetropft. Nachdem die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte, wurde das DCM unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL wasserfreiem Hexan gelöst und 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das verbleibende bräunliche Öl wurde im Vakuum destilliert. Die hergestellte Bromsilan wurde bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Bromierung der Oberfläche des Kavitäträgers

In einem Rundkolben wurde 2 mM des hergestellten Bromsilans mit 8 mM N-Propyltriethoxysilan (PTES) in wasserfreiem DCM gelöst. Anschließend wurde diese Mischung auf die aktivierten trockenen Oberflächen des Kavitäträgers aufgetragen. Nach der 12-stündigen Inkubation unter Schutzgas wurde das DCM entfernt und die Kavitäträger 3x5 min mit EtOH, 2x2 min mit Aceton gewaschen. Danach wurden die Kavitäträger im Ofen bei 110 °C für 2 h getrocknet. Nach der Abkühlung auf die Raumtemperatur wurden die Kavitäträger bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Polymerisation der Oberfläche des Kavitäträgers

Unterschutzgas wurden die bromierten Kavitäträger in einem Exsikkator platziert. Dann wurde eine Mischung aus 2,88 mL PEGMA (8,75 mM, 3,17 g), 8,38 mL MMA (78,75 mM, 7,89 g), 91 µL PMDETA (0,44 mM, 76 mg) und 620 µL TEGMME (3,96 mM, 650 mg) in 37 mL DMSO unter Luftausschluss vorbereitet. Danach wurde 44 mg CuCl (0,44 mM) zugegeben und die Mischung für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Dann wurde die Mischung auf die Kavitäträger übergossen, unter Schutzgas und Lichtausschluss für 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde die Kavitäträger 5x5 min mit DMSO, 2x5 min mit MeOH und 1x10 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Nachdem Trocknen wurden die Kavitäträger bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

Veresterung der Oberfläche des Kavitäträgers

Die polymerisierten Kavitäträger wurden in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt. In einen Dreihalskolben wurde nach dreimaligem Schlenken im Gegenstrom eine Mischung aus 1,0 Äq. Fmoc-β-Alanin-OH, 1,2 Äq. DIC und 2,0 Äq. NMI in 200 mL DMF hergestellt. Diese Mischung wurde im Gegenstrom auf die Oberfläche der Kavitäträger gegossen und über Nacht inkubiert. Danach wurden die Kavitäträger 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Kavitäträger wurden anschließend im Luftstrom getrocknet und bei 4 °C über Schutzgas bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Acetylierung an die Oberfläche des Kavitäträgers

Die veresterten Kavitäträger wurden in einer Petrischale gelegt und für 10 min in DMF inkubiert. Danach wurde eine Mischung aus 10,0 % Essigester, 20,0 % DIPEA und 70,0 % DMF (v/v/v) gegeben und über Nacht acetyliert. Zum Schluss wurden diese Kavitäträger 5x5 min mit DMF, 2x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Kavitäträger wurden mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

5.3.4 Hydrophobisierung der Stege des Kavitäträgers

Als Erstes wurde der Exsikkator über Nacht evakuiert. Danach wurden die Kavitäten des Kavitäträgers mit den Nanopartikeln aus Matrixpolymers SLEC-7552 befüllt und 1 h bei 120 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Kavitäträger im Plasma bei 100 % Leistung für 10 min behandelt. Danach wurden die Kavitäträger im Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre mit 20 µL Trichloro(1H, 1H, 2H, 2H-perfluorooctyl)silan pro Kavitäträger in einem extra Gefäß gelegt. Nach der Evakuierung des Exsikkators wurde die Kavitäträger für 3 h silanisiert. Zum Schluss wurden die Kavitäträger jeweils 1x1 min mit deionisiertem Wasser, DCM und MeOH im Ultraschal gewaschen. Die Kavitäträger wurden mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Schutzgas aufbewahrt.

5.3.5 Verdünnungsreihe der Fluorophoren

Zur Codierung von Partikeln wurden die drei Fluorophoren BDP-FL-Amin, TAMRA-Amin und Cyanin-5-Amin verwendet. Für eine Konzentrationscodierung wurden zunächst die Stammlösungen (Tabelle 10) der drei Fluorophore hergestellt.

Tabelle 10: Übersicht zur Herstellung von Stammlösungen (ST)

ST	TAMRA-Amin	Cyanin-5-Amin	BDP-FL-Amin
Fluorophor	2,1 mg	2,6 mg	1,3 mg
DCM	5 mL	5 mL	4 mL
MeOH	0,2 mL	0,1 mL	1 mL

Aus den Stammlösungen von Fluorophoren wurden Verdünnungsreihen hergestellt (Tabelle 11). Die Partikel mit überbelichtetem Signalcodes wurden mit Verdünnungsreihe 1 (V1) und Partikel mit normalen Expositionscodes mit Verdünnungsreihe 2 (V2) markiert.

Tabelle 11: Übersicht zur Herstellung von V1 und V2.

V1	TAMRA-Amin	Cyanin-5-Amin	BDP-FL-Amin
ST	0,5 mL	0,1 mL	0,4 mL
DCM	5 mL	5 mL	5 mL

V2	TAMRA-Amin	Cyanin-5-Amin	BDP-FL-Amin
ST	0,05 mL	0,01 mL	0,01 mL
DCM	5 mL	5 mL	5 mL

5.3.6 Partikelherstellung

5.3.6.1 Herstellung der dispersen Phase

In einem Schnappdeckenglas wurden ca. 60 mg Matrixpolymer SLEC-7552 (modifiziertes Styrol-co-Acrylpolymer) in 3 mL DCM gelöst. Anschließend wurden entsprechende Mengen von Aminosäure und Fluorophoren (siehe Tabelle 12) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht unter Lichtausschluss gerührt.

Tabelle 12: Mengeangaben von Aminosäuren und Fluorophoren. V1 für Verdünnungsreihe 1, V2 für Verdünnungsreihe 2

Aminosäure	m (mg)	BDP-FL-Amin (mL)	TAMRA-Amin (mL)	Cy5-Amin (mL)
Trp	7,30		V2 0,10	
His	9,20		V2 0,10	
Gly	5,40			V2 0,10
Asp	6,80			V1 0,03
Arg	9,60	V2 0,10		
Ala	5,60	V1 0,15		
Cys	8,80		V2 0,01	V2 0,01
Gln	9,10		V2 0,10	V1 0,01
Glu	6,90		V1 0,05	V2 0,02
Asn	9,00		V1 0,10	V1 0,01
Thr	6,60	V2 0,10	V2 0,20	
Val	5,90	V2 0,10	V1 0,10	
Phe	6,50	V2 0,10		V2 0,01
Ser	6,50	V2 0,05		V1 0,01
Tyr	7,30	V1 0,10		V1 0,15
Pro	5,90		V1 0,10	V2 0,01
Ile	6,10	V2 0,05	V2 0,05	V2 0,01
Leu	6,10	V2 0,05	V1 0,15	V2 0,01
Lys	7,50	V1 0,10	V2 0,10	V2 0,10
Met	6,30	V2 0,01	V1 0,10	V1 0,01

5.3.6.2 Herstellung der Kontinuierliche Phase

In einem 100 mL Schraubflasche wurden 5 g SDS in 100 mL deionisiertes Wasser gelöst.

5.3.6.3 Partikelherstellungparameter

Zunächste wurde die Lösung der dispersen Phase 10 min mit Ultraschall entgast. Anschließend wurden die Lösungen beider Phasen mit Spritzenvorsatzfiltern abfiltriert und dann in das jeweilige Reservoir überführt. Bei der Tröpfchenherstellung wurde die Lösung der dispersen Phase mit einer Flussrate von 0,20 mL/h und die Flüssigkeit der kontinuierlichen Phase mit einer Flussrate von 5,00 mL/h in den Mikrofluidikchip befördert. Die hergestellten Tröpfchen wurden in einem Behälter gesammelt, das Lösungsmittel über Nacht verdunstet und die Partikel bei Raumtemperatur aufbewahrt.

6. Abkürzung

%	Prozent
% Vol.	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
A	Alanin
abs.	absolut
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Ala	Alanin
AMP	antimikrobielle Peptide
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
äq.	äquivalent
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BIBS	α -Bromoisobutyrylbromid
BDP	BODIPY®
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	kationische antimikrobielle Peptide
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CuCl	Kupfer(I)chlorid
Cy3	Cyanin-3

Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
d ₅₀	mittlere Partikelgröße
d ₉₀	Größe aller 90% Partikel
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DDC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOD	Drop-On-Demand
ESA	Essigsäureanhydrid
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FLAG	DYKDDDDK
G	Glycin
Gew.-%	Gewichtsprozent
ggf.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
HA	YPYDVPDYA
HBr	Bromwasserstoff
HCl	Salzsäure

His	Histidin
HLB	Hydrophil-Lipophil-Gleichgewicht
HOAc	Essigsäure
Ile	Isoleucin
iPrOH	Isopropanol
K	Lysin
Kap.	Kapitel
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
L	Leucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	molare Masse
max.	maximal
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Million
mL	Milliliter
mL/h	Milliliter pro Stunde
mM	Millimol
MMA	Methylmethacrylat
n	Stoffmenge
NHS	N-Hydroxysuccinimid

NMI	N-Methylimidazol
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
OD-Filter	optischer Dichtefilter
OPfp	Pentafluorophenyl-Ester
O/W	Öl in Wasser
P	Prolin
PBS-T	Phosphat gepuffertes Saline mit Twee 20™
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEGMA	Poly(ethylenglycol)methacrylate
Phe	Phenylalanin
PMDETA	Bis-(2-dimethylaminoethyl)methylamine
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPI	Protein-Protein-Interaktion
Pro	Prolin
PTES	N-Propyltriethoxysilan
PVA	Polyvinylalkohol
Quantum Dot	QD
RB	Rockland Blocking Buffer
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Seite
s	Sekunde

SDS	Natriumdodecylsulfat
SPG	Shirasu Porous Glass
S ₀	Singulett Grundzustand
S ₁	Singulett angeregter Zustand
Ser	Serin
ST	Stammlösung
TAMRA	tetramethylrhodamine
TEA	Triethylamin
TGMME	Triethylenglycolemonomethylether
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Twin 20™	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)- monododekansäure-sorbitylester
Tyr	Tyrosin
usw.	und so weiter
v	Volumen
V	Valin
V1	Verdünnungsreihe 1
V2	Verdünnungsreihe 2
Val	Valin
Y	Tyrosin
Z.B.	zum Beispiel
μL	Mikroliter
μmol	Mikromol

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. Habchi, P. Tompa, S. Longhi, V. N. Uversky, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6561-6588.
- [2] H. Amartely, A. Iosub-Amir, A. Friedler, *J. Vis. Exp.* **2014**, e52097.
- [3] R. Bianco, D. Melisi, F. Ciardiello and G. Tortora, *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 290-294.
- [4] H. Benyamini, Friedler, A., *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 989-1003.
- [5] C. W. Diehnelt, *Front Microbiol* **2013**, *4*, 402.
- [6] M. Zasloff, *Nature* **2002**, *415*, 389-395.
- [7] H. G. Boman, *J. intern. Med.* **2003**, *254*, 197-215.
- [8] J. F. Prescott, *Vet Microbiol* **2014**, *171*, 273-278.
- [9] C. Kirchhelle, *Palgrave Communications* **2018**, *4*.
- [10] R. I. Aminov, R. I. Mackie, *FEMS Microbiol Lett* **2007**, *271*, 147-161.
- [11] E. D. Brown, G. D. Wright, *Nature* **2016**, *529*, 336-343.
- [12] B. P. Lazzaro, M. Zasloff, J. Rolff, *Science* **2020**, *368*.
- [13] G. Wang, X. Li, Z. Wang, *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, D1087-1093.
- [14] K. v. d. Saal, *Biochemie*, Springer Spektrum, **2020**.
- [15] L. C. Szymczak, H. Y. Kuo, M. Mrksich, *Anal Chem* **2018**, *90*, 266-282.
- [16] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [17] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.
- [18] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Betrone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nature Genetics* **2000**, *26*, 283-289.
- [19] K. Hilpert, R. Volkmer-Engert, T. Walter, R. E. Hancock, *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 1008-1012.
- [20] P. M. Lopez-Perez, E. Grimsey, L. Bourne, R. Mikut, K. Hilpert, *Front Chem* **2017**, *5*, 25.
- [21] E. Pardoux, A. Roux, R. Mathey, D. Boturyn, Y. Roupioz, *Talanta* **2019**, *203*, 322-327.
- [22] A. Rebollo, E. Savier, P. Tuffery, *Biomolecules* **2021**, *11*, 772.
- [23] R. Frank, *J IMMUNOL METHODS* **2002**, *267*, 13-26.
- [24] T. Luu, S. Pham, S. Deshpande, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 91-97.
- [25] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. Konig, 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.
- [26] M. M. Antonius J. Dikmans, Norbert Zander, Frank Adler, Gerhard Türk, Ronald Frank *Mol Divers* **2004**, *8*, 197-207.
- [27] F. F. Loeffler, T. C. Foertsch, R. Popov, D. S. Mattes, M. Schlageter, M. Sedlmayr, B. Ridder, F. X. Dang, C. von Bojničić-Kninski, L. K. Weber, A. Fischer, J. Greifenstein,

- V. Bykovskaya, I. Buliev, F. Bischoff, L. Hahn, M. A. R. Meier, S. Bräse, A. K. Powell, T. S. Balaban, F. Breitling, A. Nesterov-Mueller, *Nature Communications* **2016**, 7, 11844.
- [28] 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* **2008**, 120, 7241-7244.
- [29] R. Popov, *Process Development for Manufacturing Stochastic Peptide Microarrays, Vol. DOKTORS DER INGENIEURSWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)* Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), **2018**.
- [30] R. Popov, G. K. Shankara, C. von Bojnacic-Kninski, P. Barua, D. Mattes, F. Breitling, A. Nesterov-Mueller, *Sci Rep* **2019**, 9, 16468.
- [31] N. J. Ayon, *AIMS Molecular Science* **2020**, 7, 229-268.
- [32] C. T. Walsh, R. V. O'Brien, C. Khosla, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2013**, 52, 7098-7124.
- [33] M. Akram, M. Asif, M. Uzair, N. Akhtar, A. Madni, S. M. Ali, H. Zahoor, K. Asmat, *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, 5, 3997-4000.
- [34] H. P. Latscha, U. Kazmaier, H. Klein, *Organische Chemie*, Springer Spektrum, **2016**
- [35] E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1906**, 39, 530-610.
- [36] U. Brandt, O. Anderka, S. Kerscher, S. Kieß and K. Ridinger, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2018**
- [37] [https://www.wikiwand.com/de/B%C3%A4ndermodell_\(Proteine\)](https://www.wikiwand.com/de/B%C3%A4ndermodell_(Proteine)) (letzter Abruf am 06.01.2022)
- [38] E. Fischer and E. Fourneau, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, 34, 2868–2877.
- [39] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [40] R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng* **1985**, 24, 799-810.
- [41] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat Protoc* **2007**, 2, 3247-3256.
- [42] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2091-2158.
- [43] M. Stawikowski, G. B. Fields, *Curr Protoc Protein Sci.* **2002**, Chapter 18, Unit-18.1.
- [44] J. M. Palomo, *RSC Adv.* **2014**, 4, 32658-32672.
- [45] M. Bergmann, L. Zervas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, 65, 1192-1201.
- [46] G. Y. H. Louis, A. Carpino, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 344-3409.
- [47] W. Y. Li, N. M. O'Brien-Simpson, M. A. Hossain, J. D. Wade, *Austr. J. Chem.* **2020**, 73.

- [48] F. Cornille, P. Emery, W. Schuler, C. Lenoir, B. Mach, B. P. Roques, W. Reith, *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 2143-2149.
- [49] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [50] G. Y. H. Louis A. Carping, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [51] H. Rink, *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [52] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron lett* **1989**, *30*, 4645-4648.
- [53] B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 2761-2770.
- [54] S. Schubert, *Biochemie*, Eugen Ulmer, Stuttgart, **2021**
- [55] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [56] E. Valeur, M. Bradley, *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 606-631.
- [57] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [58] L. Kisfaludy, J. E. Roberts, R. H. Johnson, G. L. Mayers, K. J., *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3563-3565.
- [59] R. Frank, R. Döring, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040.
- [60] J. Eichler, M. Bienert, A. Stierandova, M. Lebl, *Pept Res* **1991**, *4*, 296-307.
- [61] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135.
- [62] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1984**, *81*, 3998-4002.
- [63] R. Langer, *Nature* **1998**, *392*, 5-10.
- [64] N. K. Varde, D. W. Pack, *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 35-51.
- [65] E. M. Collnot, H. Ali, C. M. Lehr, *J. Control Release* **2012**, *161*, 235-246.
- [66] Y. Deng, Y. Cai, Z. Sun, J. Liu, C. Liu, J. Wei, W. Li, C. Liu, Y. Wang, D. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8466-8473.
- [67] M. J. Heller, *Annu Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 129-153.
- [68] K. Saralidze, L. H. Koole, M. L. W. Knetsch, *Materials* **2010**, *3*, 3537-3564.
- [69] W. Li, L. Zhang, X. Ge, B. Xu, W. Zhang, L. Qu, C. H. Choi, J. Xu, A. Zhang, H. Lee, D. A. Weitz, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 5646-5683.
- [70] S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, A. P. Lee, *Lab Chip* **2008**, *8*, 198-220.
- [71] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, S. R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163-4166.
- [72] K.-K. Kang, B. Lee and C.-S. Lee, *Microelectronic Engineering* **2018**, *199*, 1-15.
- [73] R. Seemann, M. Brinkmann, T. Pfohl, S. Herminghaus, *Rep. Prog. Phys.* **2012**, *75*, 016601.
- [74] J. L. Salager, *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, New York, **2004**
- [75] A. Y. Khan, S. Talegaonkar, Z. Iqbal, F. J. Ahmed, R. K. Khar, *Curr. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 429-443.
- [76] Y. Zhang, H. F. Chan, K. W. Leong, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 104-120.

- [77] P. Taylor, *Colloids Surf. A* **1995**, 99, 175-185.
- [78] J. C. Baret, *Lab Chip* **2012**, 12, 422-433.
- [79] M. Choudhary, S. M. Kamil, *ACS Omega* **2020**, 5, 22891-22900.
- [80] A. A. Olajire, *Energy* **2014**, 77, 963-982.
- [81] T. Dantas, V. Santana, T. Souza, C. Lucas, A. Neto, P. Aum, *Brazilian Journal of Petroleum and Gas* **2019**, 12, 251-265.
- [82] E. A. Specht, E. Braselmann, A. E. Palmer, *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, 79, 93-117.
- [83] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogoyo, *Trends. Cell Biol.* **2004**, 14, 29-35.
- [84] J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2015**, 12, 244-250.
- [85] M. Muralidhar Reddy, T. Kodadek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 106, 12672-12677.
- [86] R. L. W. Roska, T. G. S. Lama, J. P. Hennes, R. E. Carlson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16660-16662.
- [87] K. Im, S. Mareninov, M. F. P. Diaz, W. H. Yong, *Methods Mol. Biol.* **2019**, 1897, 299-311.
- [88] S. Li, D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. J. Luebke, H. R. Garner, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4088-4089.
- [89] H. Hötzl, *Environmental Geology* **1996**, 27, 87-96.
- [90] A. Knop, *Neues Jahrb Mineral Geol Petrogr* **1978**, 350-363.
- [91] F. Strieth-Kalthoff, *Neuartige Quencher für photokatalytische Reaktionen : Konzeption einer zweidimensionalen mechanismusbasierten Screeningstrategie*, Springer Spektrum, Wiesbaden, **2019**
- [92] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2006**
- [93] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142-155.
- [94] V. Stadler, R. Kirmse, M. Beyer, F. Breitling, T. Ludwig, F. R. Bischoff, *Langmuir* **2008**, 24, 8151-8157.
- [95] das Bild wurde unter <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/> generiert (letzter Abruf am 06.01.2022)
- [96] S. Ni, M. J. Klein, N. D. Spencer, H. Wolf, *Langmuir* **2014**, 30, 90-95.
- [97] L. Malaquin, T. Kraus, H. Schmid, E. Delamarche, H. Wolf, *Langmuir* **2007**, 23, 11513-11521.
- [98] S. Ni, J. Leemann, H. Wolf, L. Isa, *Faraday Discuss* **2015**, 181, 225-242.
- [99] R. Pioli, M. A. Fernandez-Rodriguez, F. Grillo, L. Alvarez, R. Stocker, L. Isa, E. Secchi, *Lab Chip* **2021**, 21, 888-895.

- [100] C. Schirwitz, *Purification of Peptides in High-Complexity Arrays*, Vol. *DOKTORS DER NaTURWISSENSCHAFTEN (Dr. re. nat.)* Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2012**

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Breitling und bei Frau Prof. Dr. Anne Ulrich bedanken, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit in einer unterstützenden und freundlichen Arbeitsatmosphäre anzufertigen. Vielen Dank für Ihre zielführende und professionelle Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Nicolas Vogel (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, FAU), der mir die Möglichkeit gab, Ihre Forschungsgruppe zu besuchen und mir informative Tipps zur Mikrofluidik und Partikelherstellung vermittelte.

Ich danke Herrn Christoph Heyoppe, Herrn Dr. Christoph Bickmann (IBG), Herrn Dr. Benjamin Bitterer, Herrn Dr. Nikas Peter (Universität Trier), Herrn Manfred Kraut (IMVT), meinem Onkel Herrn Dr. Clemens Stoffel und meinem Deutschlehrer Herrn Axel Wondratschek für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Ich danke Herrn Andreas Hensel (IMVT) für die Vermessung meiner Partikelprobe mit dem Mastersizer.

Ich danke Frau Dr. Dagmar Hildebrand (Universität Heidelberg), Frau Aline Sähr (Universität Heidelberg) und Herrn Bastian Kindermann (Firma Beckman Coulter) für die FACS-Messung meiner Proben.

Ich danke Herrn Richard Thelen für den Zugang zum Reinraum.

Ich danke meinen Kollegen für die angenehme Atmosphäre und Hilfsbereitschaft. Insbesondere Herrn Andreas Klinkusch, Frau Dr. Daniela Mattes und Dr. Laura Weber für ihre umfangreiche Hilfe bei Problemen. Frau Karin Herbst für die Bearbeitung meiner Bestellungen. Herrn Dr. Benjamin Bitterer für das Korrekturlesen meines Schreibens. Frau Clarine Gedigk für die Organisation der Vorträge. Herrn Fabian Falk für die gute

8. Danksagung

Zusammenarbeit sowie Herrn Chaoyu Wu, Herrn Jannik Schlindwein, Frau Litsy Hüscherlath und Herrn Stefan Lux für die gute Amtosphäre und die schöne Zeit.

Ich danke Herrn Manfred Kraut (IMT) für seine Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Werthwein dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, eine solide Basis für meine wissenschaftliche Karriere aufzubauen.

Ich danke Herrn Dr. Tomas Martin und seiner Frau Sibille Martin für ihre Unterstützung, für ihre Hilfe und für die gut zubereiteten Mahlzeiten.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Herrn Axel Wondratschek aussprechen. Ohne sein Engagement und seine Unterstützung hätte ich nie einen akademischen Weg einschlagen können.

Ich danke vor allem meiner Familie von ganzem Herzen danken. Vielen Dank für euer Verständnis und eure mentale Unterstützung.