

**Herstellung von Peptidarrays mit modifizierten
Aminosäurebausteinen und deren biologische Anwendungen**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von

M.Sc. Clarine Gedigk
aus Karlsruhe

1. Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

2. Referent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2024

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient habe. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung wissenschaftlicher Praxis habe ich beachtet. 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 Primärdaten sind gemäß der Satzung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut für Mikrostrukturtechnologie (IMT) abgegeben und archiviert.

Karlsruhe, 10.09.2024

Clarine Gedigk

Zusammenfassung

Die Entwicklung von neuen, lebensrettenden Impfstoffen, Medikamenten und Diagnosewerkzeugen ist eine wichtige Aufgabe von Forschern und Medizinern. Dabei ist die Erforschung einer Vielzahl von biologischen Prozessen und zugrundeliegenden Abläufen von Erkrankungen für das bessere Verständnis unumgänglich. Eine effiziente Methode zur Untersuchung dieser Mechanismen bieten Peptide im Arrayformat. Mit Hochdurchsatz-Screenings an Peptidarrays können beispielsweise eine Vielzahl an Bindungsstudien von Antikörpern an biologisch und diagnostisch relevante Proteine durchgeführt werden^[1-4]. Peptidarrays eröffnen somit vielseitige Möglichkeiten zur Konzeptentwicklung für die Identifikation von Biomarkern, sowie zur Herstellung neuer Wirkstoffe und Therapeutika. Ebenfalls können verschiedene Modifikationen von Proteinen zur Identifikation von diagnostisch relevanten Peptiden und der Erforschung von Krankheiten beitragen.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit dem Übertrag von posttranslational modifizierten und nicht kanonischen Aminosäuren in Peptidarrays und deren Visualisierung in Reaktionen der Biokonjugation und Chemodetektion. Die Synthese der Arrays erfolgte über einen laserbasierten Transfer der modifizierten Aminosäuren mit Hilfe des nano3D-Druckers. Dieser ermöglicht Spotdichten von bis zu 17.000 Spots/cm² und bietet durch die übertragene Materialmenge im Piko- bis Femtomol Bereich eine kostengünstige und materialeffiziente Methode für verschiedene Synthesen^[5-7]. Anhand dieses Vorgehens konnten Azid-Alkin Click-Reaktionen an lasertransferierten, modifizierten Aminosäuren durchgeführt werden. Ebenfalls konnte ein *proof-of-concept* einer laserbasierten Multikomponentenreaktion gezeigt werden. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung von Peptidarrays mit posttranslational modifizierten Aminosäuren in Bindungsstudien von Antikörpern. Hierfür wurden Analysen zur Erforschung von verschiedenen Krankheiten, wie der rheumatoide Arthritis, dem Sjögrens Syndrom und Hepatitis B durchgeführt. Dabei konnten Gemeinsamkeiten in Bindungsmotiven der rheumatoide Arthritis festgestellt werden. Letztendlich konnte durch die Integration verschiedener Modifikationen wie Citrullinierungen oder Phosphorylierungen in Peptidarrays eine Relevanz dieser Aminosäurebausteine, in der aktuellen Forschung dargelegt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der nano3D-Drucker eine flexible und vielversprechende Syntheseplattform für Hochdurchsatz-Screenings von Peptidarrays mit modifizierten Aminosäuren darstellt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Synthese von Peptiden und Aufbau von Peptidarrays.....	3
2.1.1	Aminosäuren und Peptide	3
2.1.2	Posttranslational modifizierte Aminosäuren	6
2.1.3	Chemische Festphasenpeptidsynthese.....	8
2.1.4	Immunodetektionen mit Peptidarrays	10
2.1.5	Herstellung von Peptidarrays über den nano3D-Drucker	12
2.2	Biokonjugation und Chemodetektion an Peptidarrays	15
2.2.1	Biokonjugation und Bio-Labeling Methoden.....	15
2.2.2	Biokonjugation-Reaktionen	16
2.2.3	Chemodetektion	19
2.3	Das Immunsystem und Autoimmunerkrankungen	20
2.3.1	Das humane Immunsystem.....	20
2.3.2	Antikörper und Antikörperspezifität	21
2.3.3	Autoimmunreaktionen	23
2.3.4	Die Rolle von Posttranslationalen Modifikationen bei Erkrankungen	24
3.	Ziel der Arbeit.....	27
4.	Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren.....	29
4.1	Übertrag und Nachweis von modifizierten Aminosäuren	29
4.1.1	Posttranslational modifizierte Aminosäuren	32
4.1.2	Modifizierte Aminosäuren.....	46
4.2	Click-Reaktionen	51
4.2.1	Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Click-Reaktion	51
4.2.2	Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion	53
4.3	GBB-Reaktion an Allysinethylenacetal	56
5.	Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays.....	59

5.1	Generierung von Peptidarrays für Bindungsstudien zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis	61
5.2	Untersuchung der Rolle von Citrullin in diagnostischen Peptiden für Rheumatoide Arthritis.....	80
5.2.1	Epitopmapping von citrulliniertem Kollagen zur Evaluierung von Antigen Mimikry bei rheumatoider Arthritis.....	81
5.2.2	Untersuchung potenzieller Epitope von citrulliniertem Kollagen Typ 2 mittels Substitutionsanalysen	91
5.2.3	Erforschung des Einflusses der Frühdiagnostik von rheumatoider Arthritis	107
5.3	Biologische Anwendung von Phosphorylierungen in Peptidarrays	117
6.	Zusammenfassung und Ausblick	127
6.1	Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren	127
6.2	Untersuchungen verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays	129
7.	Experimentalteil	131
7.1	Analytik und Geräte	131
7.2	Lösungsmittel, Chemikalien und Syntheseoberflächen	134
7.3	Antikörper, Seren und biologische Stoffe	135
7.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften	136
7.5	Versuchsbeschreibungen	143
7.5.1	Laser-basierte Synthesen	143
7.5.2	Synthese und Charakterisierung verwendeter Phosphorylierungsreagenzien.....	144
8.	Danksagung.....	147
9.	Abkürzungsverzeichnis	149
10.	Abbildungsverzeichnis	153
11.	Tabellenverzeichnis	163
12.	Literaturverzeichnis.....	167
13.	Anhang	177

13.1	Einwaagen der Beschichtungslösungen.....	177
13.2	Parameter des laserbasierten Transfers mit dem nano3D Drucker	179
13.3	Anonymisierte Daten zu den verwendeten Patientenserien.....	181
13.4	Daten und Fluoreszenzscans zu den biologischen Anwendungen	182

1. Einleitung

Die jüngsten globalen Herausforderungen durch die COVID-19-Pandemie haben das Augenmerk der medizinischen Forschung auf die dringende Notwendigkeit effektiver therapeutischer Ansätze und Impfstoffe gelenkt^[8-9]. Diese Krise hat nicht nur die Relevanz einer beschleunigten Entwicklung von Impfstoffen und Therapeutika hervorgehoben, sondern auch das Verständnis für komplexe immunologische Reaktionen in den Vordergrund gerückt. In diesem Kontext erlangen Autoimmunerkrankungen, bei denen das Immunsystem fälschlicherweise körpereigenes Gewebe angreift, zunehmend an Bedeutung. Schätzungen zufolge sind weltweit mehrere Millionen Menschen von Autoimmunerkrankungen betroffen, was nicht nur die individuelle Lebensqualität beeinträchtigt, sondern auch erhebliche gesellschaftliche und wirtschaftliche Auswirkungen zur Folge hat. Eine 2023 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass entgegen der Vorhersage von 3-9 %, 10 % der Bevölkerung von 19 der häufigsten Autoimmunerkrankungen betroffen sind und die Zahl der Betroffenen weiter steigt^[10]. Zudem wurde bei 22 Millionen Teilnehmern bestätigt, dass die Wahrscheinlichkeit, eine zweite Autoimmunkrankheit zu entwickeln, bei Personen mit bereits bestehender Autoimmunkrankheit höher ist, als bei Personen ohne solche Vorerkrankung^[10]. Aufgrund der stetigen Zunahme von Autoimmunerkrankungen und wiederholt auftretender Pandemien, ist die Entwicklung von Therapeutika und Wirkstoffen, sowie die Erforschung der Ursachen vieler Krankheiten unumgänglich.

Ein vielversprechender Forschungsbereich, der zur Ursachenforschung, Krankheitsprognose und Entwicklung von Medikamenten von verschiedenen Erkrankungen beitragen kann, sind posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von Proteinen^[11]. Posttranslationale Modifikationen spielen unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Proteinaktivitäten und -interaktionen, wodurch sie maßgeblich zur Entstehung und Progression autoimmuner Erkrankungen beitragen können^[12]. Insbesondere die Citrullinierung von Proteinen hat sich als ein zentraler Mechanismus herausgestellt, der mit der Pathogenese von Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis in Verbindung gebracht wird^[13-15]. Diese Modifikationen können nicht nur die Immunogenität von Peptiden beeinflussen, sondern auch deren Erkennung durch T-Zellen und Antikörper modulieren^[16-21]. Um diese komplexen Zusammenhänge besser verstehen und interpretieren zu können, sind innovative

Einleitung

Ansätze erforderlich. Hochdurchsatztechniken haben sich als wertvolles Instrument zur systematischen Analyse von PTMs und deren biologischen Auswirkungen etabliert^[22]. Die Generierung umfangreicher Datensätze zu modifizierten Proteinen kann mittels moderner Technologien wie Peptidarrays^[23-24] und Massenspektrometrie^[25] in kurzer Zeit erfolgen. Diese Methoden bieten nicht nur eine effiziente Möglichkeit zur Identifizierung relevanter PTMs, sondern auch zur Entdeckung neuer immunologischer Marker, die für Diagnostik und Therapie von Autoimmunerkrankungen sowie anderen immunologischen Erkrankungen von Bedeutung sein könnten^[26]. Ebenfalls können durch die Kombination von Hochdurchsatztechniken mit Biokonjugationen eine große Menge an biologischen Proben, sowie verschiedene Interaktionen mit Immunzellen schnell und detailliert analysiert werden. Dabei kann durch die Entwicklung spezifischer biokonjugierter Reagenzien eine gezielte Markierung verschiedener modifizierter Peptide oder Proteine ermöglicht werden^[27-28]. Diese Technologien eröffnen die Möglichkeit zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, wie maßgeschneiderte Polymere^[29], sowie zur Entwicklung von biologischen Testverfahren^[30].

Der am Institut für Mikrostrukturtechnik entwickelte nano3D-Drucker stellt eine geeignete Methode zur Kombination von Hochdurchsatztechniken in Form von Peptidarrays mit verschiedenen biologischen Anwendungen dar^[6]. In dieser Arbeit sollen posttranskriptionale Modifikationen in Peptidarrays integriert und mit Reaktionen der Biokonjugation, sowie Bindungsstudien zu Erkrankungen des Immunsystems kombiniert werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Synthese von Peptiden und Aufbau von Peptidarrays

Peptide und Proteine werden aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen und Eigenschaften in einem breiten Spektrum von der Natur eingesetzt. So können Peptide beispielsweise die Wirkung von Entzündungen durch hemmende oder fördernde Eigenschaften beeinflussen^[31]. Zudem sind Peptide in weiteren zahlreichen Prozessen der Immunantwort beteiligt, da sie sowohl in der Struktur der Antigene als auch als Bestandteile der Antikörper vorkommen. Basierend darauf werden Peptide und Proteine häufig unter anderem in der Entwicklung von Wirkstoffen gegen verschiedenste Krankheiten verwendet^[32]. Ebenso werden sie für viele weitere Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen^[33], beispielsweise in Form von Hochdurchsatz-Screening Methoden verwendet^[34], um Aufschluss über verschiedene Wechselwirkungen, Signalwege und die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten (Pathogenese) zu geben.

2.1.1 Aminosäuren und Peptide

Das Grundgerüst vieler immunologisch relevanter Strukturen, wie beispielsweise Antikörper und Antigene, besteht aus Aminosäuren. Diese werden miteinander über Peptidbindungen, auch Amidbindungen genannt, zu Peptiden bzw. Proteinen verknüpft^[35]. Dabei wird durch die Anzahl der verknüpften Aminosäuren differenziert, ob es sich um ein Peptid (<100 Aminosäuren) oder Protein (>100 Aminosäuren) handelt^[36]. In der Natur werden zur Synthese von Peptiden und Proteinen vorwiegend 20 verschiedene Aminosäuren verwendet^[37] (Abbildung 1). Diese Aminosäuren sind im genetischen Code jedes Lebewesens verankert und werden als proteinogene Aminosäuren bezeichnet. Die proteinogenen Aminosäuren zählen zu den α -Aminosäuren und weisen, mit Ausnahme von Glycin, ein Chiralitätszentrum am α -Kohlenstoffatom auf. Durch die Chiralität kann zwischen L- und D-Aminosäuren differenziert werden, wobei für die natürliche Proteinbiosynthese nur L-Enantiomere verwendet werden^[38].

Theoretische Grundlagen

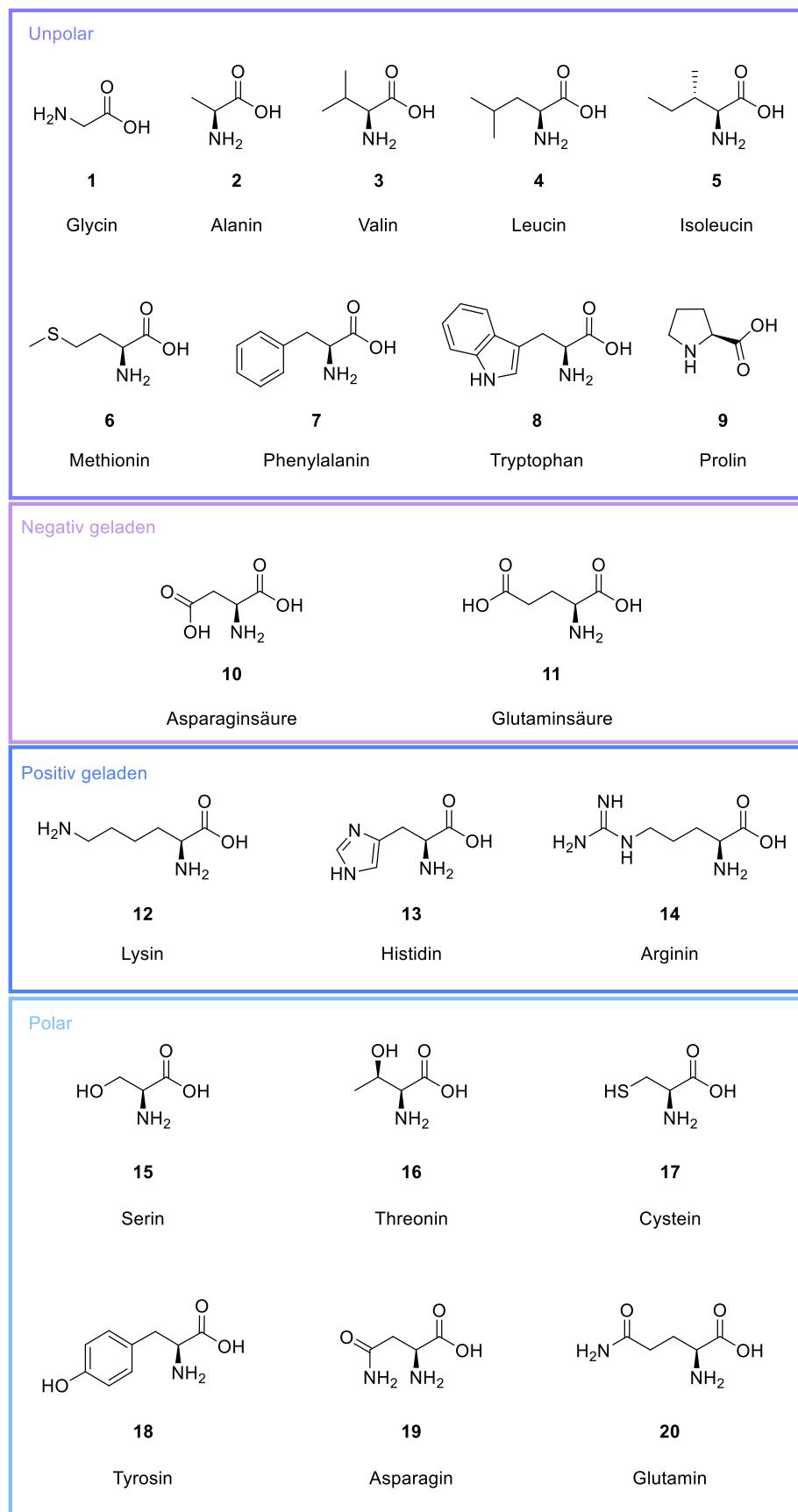
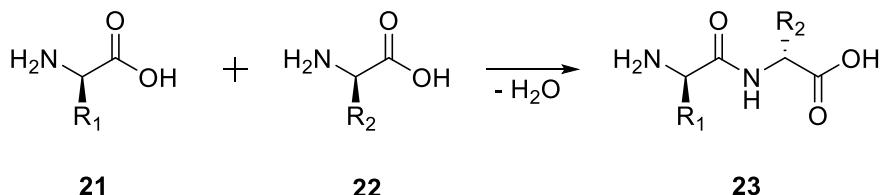


Abbildung 1: Darstellung der proteinogenen Aminosäuren und Kategorisierung in ihre chemischen Eigenschaften

Die Grundstruktur einer Aminosäure besteht aus einer Aminogruppe, sowie einer Carboxylgruppe, welche über ein Kohlenstoffatom (α -C-Atom) verbunden sind. Der maßgebende Unterschied zwischen den Aminosäuren ist die Seitenkette (Rest, R) am α -Kohlenstoffatom, welche die chemischen und physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Aminosäure bestimmt. Somit können Aminosäure in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Klassisch werden Aminosäuren in basische (positiv geladen), saure (negativ geladen), unpolare (hydrophob) und polare (ungeladen) Aminosäuren differenziert. Ebenso können sie auch in aromatische, aliphatische, amidierte, hydroxylierte und schwefelhaltige Aminosäuren unterteilt werden. Die Ausbildung einer Peptidbindung (**23**) findet durch die Reaktion der Carboxylgruppe einer Aminosäure (**21**) mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure (**22**) unter Wasserabspaltung statt (Schema 1)^[38].

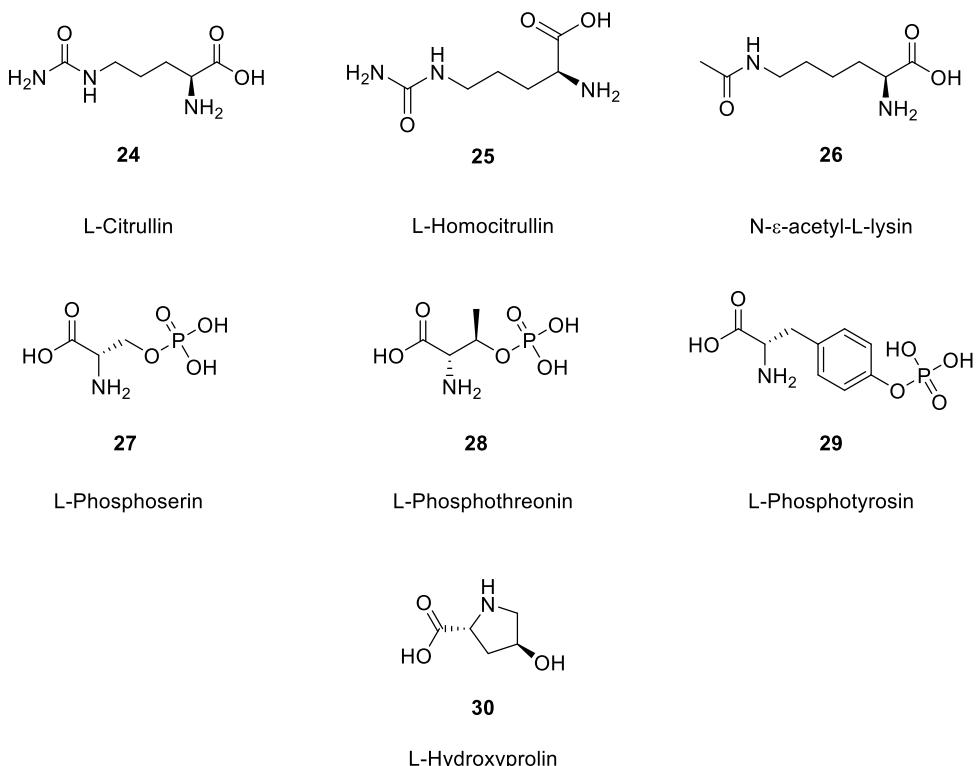


Schema 1: Verknüpfung der Carboxylgruppe einer Aminosäure (**21**) mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure (**22**) zu einer Peptidbindung (**23**) unter Wasserabspaltung

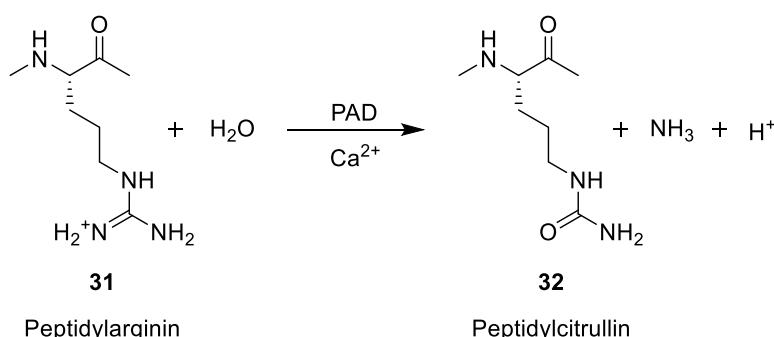
Die freie Aminogruppe des dabei entstandenen Peptids wird als *N*-Terminus und die freie Carboxylgruppe als *C*-Terminus bezeichnet. Die Reihenfolge der Aminosäuren, sog. Sequenz der Peptide wird auch als Primärstruktur bezeichnet und entscheidet über die Eigenschaften der Peptide. Längere Peptide, sog. Polypeptide, können durch die Wechselwirkung nicht benachbarter Aminosäuren Sekundärstrukturen, beispielsweise die α -Helix oder das β -Faltblatt, ausbilden. Trotz der hohen Stabilität sind diese Strukturen sehr flexibel und können zahlreiche Konformationen eingehen. Diese Konformationen werden als Tertiärstruktur bezeichnet und können durch Drehungen um Einzelbindungen, sowie über verschiedene Wechselwirkungen wie Elektrostatik oder Wasserstoffbrücken entstehen. Die Zusammenlagerung vieler Polypeptide oder Proteine zu Proteinkomplexen wird als Quartärstruktur bezeichnet^[36, 38].

2.1.2 Posttranslational modifizierte Aminosäuren

Neben den 20 proteinogenen Aminosäuren gibt es zahlreiche weitere Aminosäuren, die nicht während der Translation in der Proteinbiosynthese eingebaut werden. Von diesen sogenannten nicht proteinogenen Aminosäuren gibt es bereits über 400 verschiedene bekannte Varianten^[39], die eine biologische Funktion besitzen, wobei die tatsächliche Zahl der möglichen Modifikationen unbekannt ist. Bekannte biologische Funktionen sind unter anderem der Einfluss als Metabolite im Stoffwechsel oder auch als Hormone und Neurotransmitter, sowie Toxine^[40]. Zu den nicht proteinogenen Aminosäuren zählen unter anderem Aminosäuren mit veränderter Chiralität wie beispielsweise D-Aminosäuren, sowie Aminosäuren mit diversen Modifikationen an ihren funktionellen Gruppen. Zudem können Veränderungen nach der Translation in der Proteinbiosynthese auftreten, welche als posttranslational modifizierte (PTM) Aminosäuren bezeichnet werden. Diese PTMs werden in der Regel durch den Organismus selbst ausgelöst und können beabsichtigte aber auch unbeabsichtigte Veränderungen der Proteine sein. Zu den unbeabsichtigt Modifikationen zählen Beschädigungen durch zum Beispiel Radikale^[41-42], Strahlung^[43-44] oder andere Proteine^[45], wodurch diese verändert oder denaturiert werden können und so ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr erfüllen können. Die Variation an beabsichtigten und unbeabsichtigten Modifikationen deckt ein breites Spektrum von Veränderungen des N- oder C-Terminus, den Seitenketten, Abspaltungen von funktionellen Gruppen oder größeren Sequenzen, das Hinzufügen verschiedener Bindungen bis hin zur Anknüpfung an größere Moleküle ab^[46]. Die unter anderem am häufigsten vorkommenden chemischen Modifikationen sind Phosphorylierungen^[47], Acetylierungen^[48], Methylierungen^[49], Ubiquitinierungen^[50], Hydroxylierungen und Glycosylierungen^[51]. Einige Beispiele für posttranslational modifizierte Aminosäuren sind Citrullin (Cit, Z), Homocitrullin (HCit, X), Acetyllysin (Lys(Ac), k), Hydroxyprolin (Hyp, p) und Phosphoserin (pSer) (Abbildung 2).

**Abbildung 2:** Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten posttranslational modifizierten Aminosäuren

Viele der Modifikationen können auch durch Enzyme im Organismus hervorgerufen werden. Beispielsweise ist die Aminosäure L-Citrullin einerseits ein natürlich vorkommendes Intermediat im Harnstoffzyklus, andererseits kann Citrullin auch als PTM durch eine enzymatische Umwandlung von Arginin durch Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) katalysiert werden (s. Schema 2)^[52]. Solche citrullinierten Peptide bzw. Proteine können Immunreaktionen hervorrufen^[14] und spielen bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine signifikante Rolle^[13, 15].

**Schema 2:** Enzymatische Umwandlung von Peptidylarginin (31) zu Peptidylcitrullin (32) durch Peptidylarginin-Deiminase (PAD)

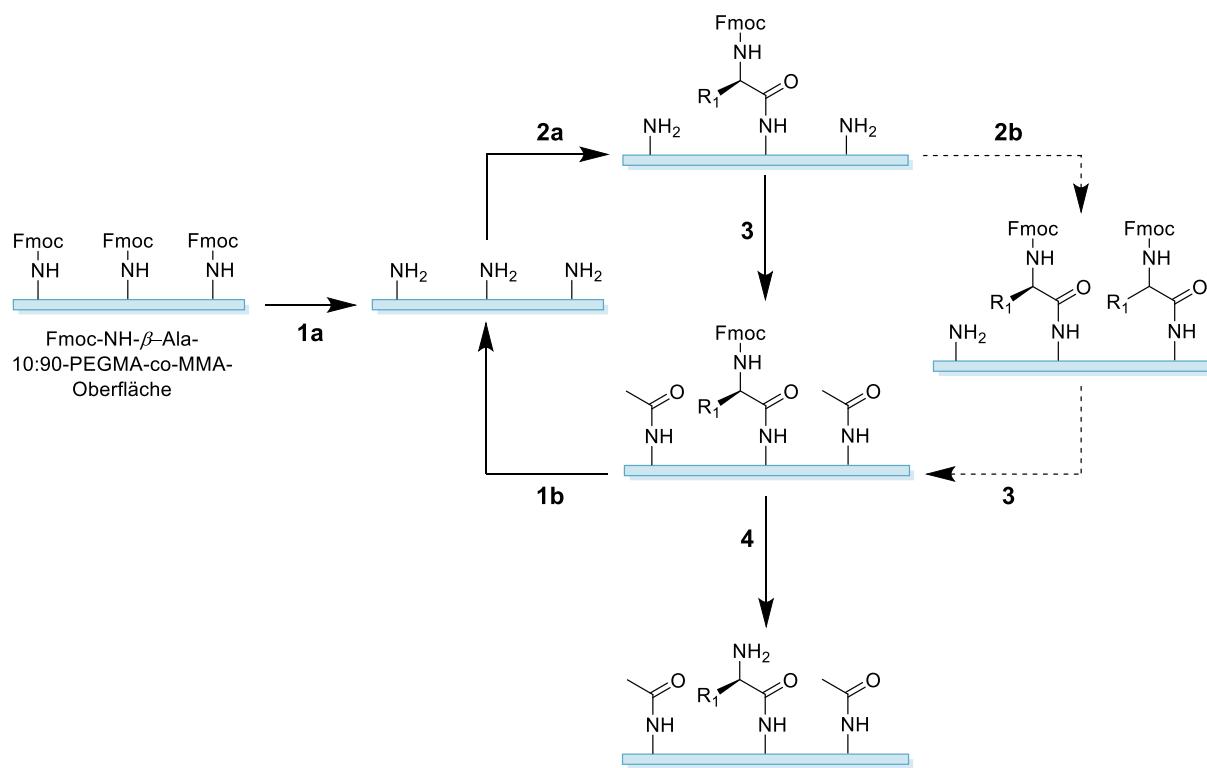
Theoretische Grundlagen

Im Allgemeinen gibt es eine Vielzahl an Methoden, die den Einbau nicht proteinogener Aminosäuren in Peptide und Proteine ermöglichen. Beispielsweise können Peptidsynthetasen^[53], Proteinligation^[54], genetische Reprogrammierung aber auch die „nicht-natürliche“ Peptidsynthese eine Integration von Modifikationen ermöglichen^[55-56].

2.1.3 Chemische Festphasenpeptidsynthese

In der Zelle stellt die Natur zahlreiche Enzyme und Mechanismen für die Synthese von Peptiden und Proteinen bereit, um die natürlichen Aminosäuren zu schützen und unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern^[38]. Bei der chemischen Peptidsynthese sind modifizierte Aminosäuren erforderlich, um unerwünschte Reaktionen an den verschiedenen funktionellen Gruppen zu vermeiden. Hierzu werden spezifische Schutzgruppen eingesetzt, welche die α -Aminogruppe, sowie die funktionellen Gruppen der Seitenketten vor Nebenreaktionen schützen können^[57-58]. Eine Möglichkeit für ein Schutzgruppen System bildet die Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenstrategie. Hier wird die α -Aminogruppe mit der basisch abspaltbaren^[59] Fmoc-Schutzgruppe geschützt^[60-62]. Für die Seitenketten der Aminosäuren werden dagegen oft säurelabile Schutzgruppen wie die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc), Trityl (Trt) oder *tert*-Butyl(*t*Bu)-Schutzgruppe eingesetzt. Der Einsatz von Schutzgruppen, die unter verschiedenen Bedingungen abgespaltet werden können, ermöglicht ihre orthogonale Verwendung in der Peptidsynthese. Diese Strategie wurde von R. B. Merrifield genutzt, um 1963 die Festphasenpeptidsynthese (engl.: *Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)*) zu entwickeln^[58]. Dieses Verfahren wurde 1984 mit einem Nobelpreis ausgezeichnet, da es eine effizientere und schnellere Synthesemöglichkeit im Vergleich zur herkömmlichen Synthese in flüssiger Phase bot. Das Prinzip von Merrifield basiert auf der Verwendung einer festen Phase, welche aus Polystyrolharz mit daran angebrachten Linkern (Chlorbenzylgruppen) besteht. An die freien funktionellen Gruppen können Aminosäuren angeknüpft werden und somit ganze Peptide an der festen Phase synthetisiert werden. Durch geeignete Abspaltungsreagenzien und nachfolgende Aufreinigung entsteht eine effektive Methode zur Herstellung von Peptiden. Dieses Verfahren findet hauptsächlich in der Synthese von Peptidarrays und in der kombinatorischen Chemie Anwendung^[63].

Die kombinatorische SPOT-Synthese von R. Frank^[64] ermöglichte erstmals die getrennte räumliche Synthese von Peptiden im Arrayformat, die anschließend für biologische Anwendungen genutzt werden konnten. Bei dieser Methode werden gelöste, aktivierte Aminosäuren auf eine Oberfläche wie funktionalisierter Cellulose gespottet und das gewünschte Peptid mithilfe der Fmoc-Schutzgruppenstrategie aufgebaut. Diese Strategie wurde auch in einem 2016 entwickelten Laser-basiertem Verfahren von F. Löffler und T. Förtsch *et al.* verwendet, um hochdichte Peptidarrays zu generieren (siehe Kap. 2.1.5)^[6].



Schema 3: Darstellung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Schritt 1a: Fmoc Entschützung der Akzeptoroberfläche. Schritt 2a: Lasertransfer und Kupplung der Aminosäure. Schritt 2b: Erneuter Lasertransfer und Kupplung derselben Aminosäure. Schritt 3: Acetylierung der freien Aminogruppen. Schritt 4: Fmoc-Entschützung und Seitenkettenentschützung

Als feste Phase (Syntheseoberfläche) werden in dieser Arbeit funktionalisierte Glasträger verwendet. Die Funktionalisierung besteht aus einem Co-Polymer aus 10% Polyethylenglycolmethacrylat (PEGMA) und 90% Methylmethacrylat (MMA), welches mit β-Alanin verestert wurden. Die Aminogruppe des β-Alanins ist mit einer Fmoc-Schutzgruppe geschützt, die in Schritt 1a entfernt wird. Anschließend erfolgt der Übertrag der gewünschten Aminosäuren an die freien Aminogruppen, welche anschließend über eine Kondensationsreaktion verknüpft werden (Schritt 2a). Für die Peptidkupplung zweier Aminosäuren werden Aktivierungsreagenzien wie

Theoretische Grundlagen

beispielsweise Carbodiimide (z.B. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)) verwendet^[65-66]. Außerdem kann die Aminosäure vor der Peptidkupplung in einen Aktivester überführt werden, um unerwünschte Nebenreaktionen wie Umlagerungen zu vermeiden. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung von Aminosäuren durch einen Pentafluorophenyl-Ester (OPfp-Ester). Des Weiteren können ebenfalls Hydroxybenzotriazol (HOBt)-Ester, Reagenzien wie O-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat (HBTU) oder (Benzotriazol-1-yloxy)tritypyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) zur Aktivierung verwendet werden. Die Kupplungsausbeute der Aminosäuren in den Spots kann ggf. durch eine Doppelkupplung (Schritt 2b) verbessert werden. Dabei wird dieselbe Aminosäure erneut auf die Oberfläche übertragen und gekuppelt. Durch diesen Schritt kann gewährleistet werden, dass mehr übertragene Aminosäure an die Oberfläche gebunden wird, was zu einer höheren Absättigung führt. Nicht reagierte Aminogruppen werden durch einen Acetylierungs-Schritt (Capping) blockiert, um die Anknüpfung von Aminosäuren in späteren Syntheseschritten zu unterbinden, und somit eine ungewollte Durchmischung von Synthesesequenzen im Spot zu vermeiden (Schritt 3). Die Schritte 1b-3 können beliebig oft wiederholt werden, bis die gewünschte Peptidsequenz erreicht ist. Abschließend werden die Seitenkettenenschutzgruppen, sowie die Fmoc-Schutzgruppe der Aminosäuren entfernt (Schritt 4) und der Array steht für zum Beispiel biologische Anwendungen zur Verfügung.

2.1.4 Immunodetektionen mit Peptidarrays

Seit der Entwicklung der SPOT Synthese konnten Peptidarrays weiterentwickelt und über verschiedene Techniken hergestellt werden. Die Herstellung kann neben der SPOT Synthese auch über photolithographische Methoden^[67] oder Laserdruckverfahren^[68] erfolgen. Durch die stetige Verbesserung können Peptidarrays heutzutage kostengünstig und schnell hergestellt werden, wodurch sie Anwendung in vielseitigen Screenings finden. Zum Beispiel können Bindungsstudien von Antikörpern an Proteine (Antigene) durchgeführt werden, die zur Identifikation des genauen Sequenzabschnitts führen, an dem ein Antikörper bindet (Epitop), sowie einer Untersuchung potenzieller Kreuzreaktivitäten oder Antigen Mimikry^[1-2, 4, 69]. Zur Bestimmung von Epitopen können komplett Proteinsequenzen auf Peptidarrays aufgebracht werden (Abbildung 3A). Dabei wird zunächst die lineare Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Bereichs des Proteins (Antigen)

identifiziert. Dieser Bereich des Proteins wird anschließend in überlappenden Peptidsequenzen im Arrayformat dargestellt. Die darauffolgende Inkubation mit einem Patientenserum und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern ermöglicht die Detektion gebundener Antikörper und die Identifikation ihrer Epitope. Anschließend können, mit Hilfe einer Substitutionsanalyse, die genauen Aminosäuren identifiziert werden, die für die Antikörperbindung relevant sind. Dazu werden von der Peptidsequenz des gefundenen Epitops alle Aminosäuren nacheinander durch alle 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht (Abbildung 3B). Nach einer Serum- und Sekundärantikörperinkubation kann über eine Fluoreszenzanalyse das Bindungsmotiv des Antikörpers bestimmt werden. Neben der Erkennung von Bindungsmotiven von Serumantikörpern können solche Bindungsstudien auch in der Entwicklung neuer Medikamente^[70] oder in der Detektion von Antigenen bei Autoimmunerkrankungen^[71] genutzt werden.

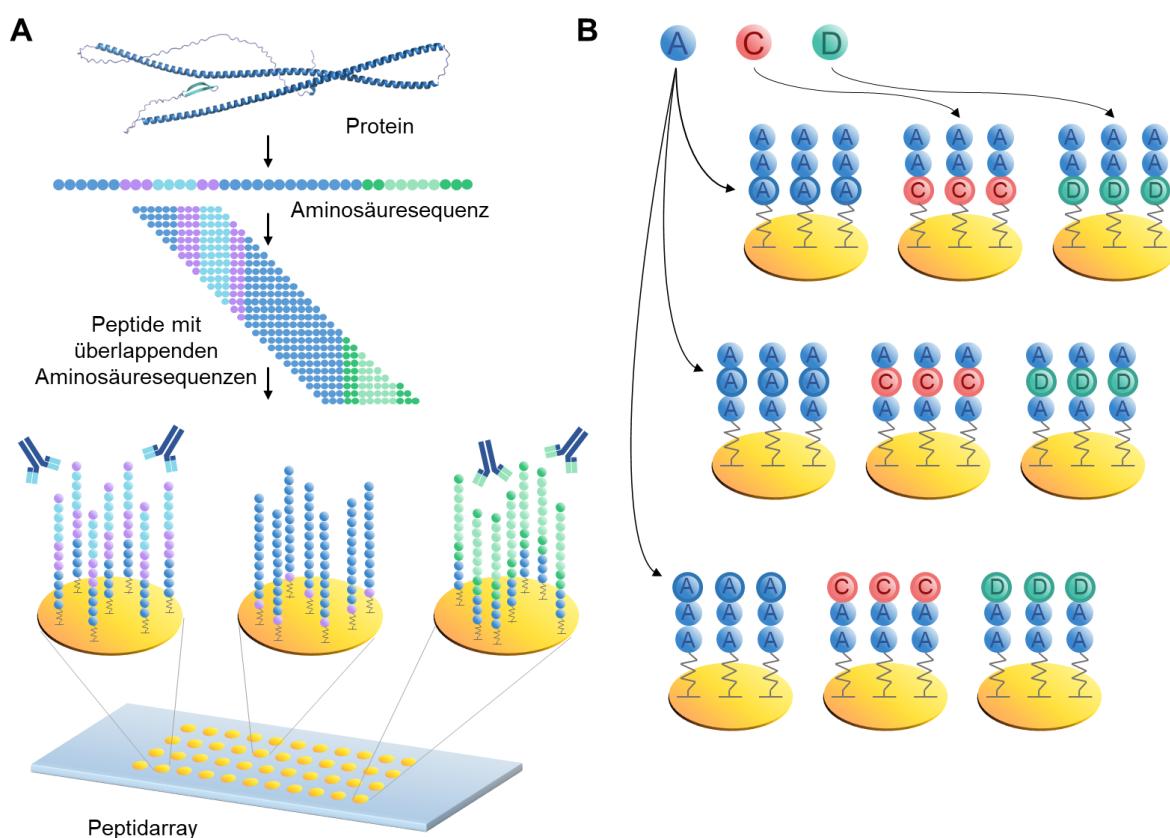


Abbildung 3: Darstellung eines Epitopmappings zur Identifizierung von Antikörperbindungsstellen. **A)** Epitopmapping eines Proteins in überlappenden Peptiden. **B)** Substitutionsanalyse eines Peptids durch Austausch der originalen Aminosäuren eines Peptids nacheinander durch alle proteinogenen Aminosäuren

2.1.5 Herstellung von Peptidarrays über den nano3D-Drucker

Die Herstellung von Peptidarrays über die Festphasenpeptidsynthese kann über die 2016 von F. Löffler und T. Förtsch publizierte Methode des cLIFT (engl.: *combinatorial Laser Induced Forward Transfer*) ermöglicht werden^[6]. Die Abwandlung des ursprünglich publizierten Aufbaus mit einem 405 nm LED-Laser, sowie die Erweiterung durch einen Roboterarm wird in dieser Arbeit zur Synthese der Peptidarrays verwendet (Abbildung 4).

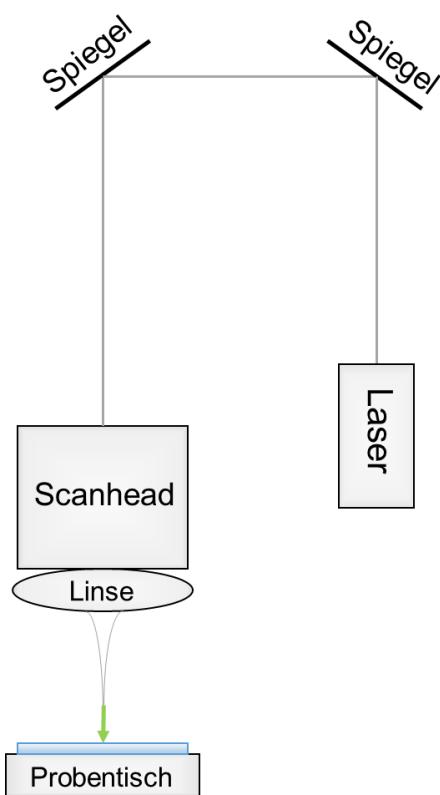


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des nano3D-Druckers. Ein LED-Laser wird über einen Scanhead auf den Probentisch gelenkt.

Dieser Aufbau ermöglicht den Übertrag von kleinen Materialspots auf eine Syntheseoberfläche (Akzeptor) und kann eine Spotdichte von 17.000 Spots/cm² erreichen^[6]. Für den Übertrag der Materialspots werden beschichtete Glasobjektträger, sog. Donoroberflächen benötigt. Diese Glasobjektträger werden in einem ersten Schritt mit einer lichtabsorbierenden Polyimidfolie (Kapton®, DuPont) beklebt. In einem zweiten Schritt wird ein dünner Film aus einer Lösung des zu transferierenden Materials, sowie der Polymermatrix SLEC (modifiziertes Styrol-co-Acryl-Polymer, SLEC-P LT 7552, Sekisui), auf die Polyimidfolie aufgetragen. Die Beschichtung der Donoroberflächen kann hierbei über verschiedene Methoden,

wie die Rotationsbeschichtung (Spin-Coating) oder ein automatisches Filmziehgerät (Rakel) erfolgen. Als Syntheseoberflächen können je nach gewünschtem Array-Typ verschiedene Glasträger, wie beispielsweise Indium-Zinnoxid-beschichtete Glasträger (ITO-Glas) oder herkömmliche Glasobjektträger verwendet werden. Für den Aufbau von Peptidarrays werden Glasträger verwendet, die mit einem Fmoc-NH₂-β-Ala-PEGMA-co-MMA-Polymerfilm funktionalisiert wurden.

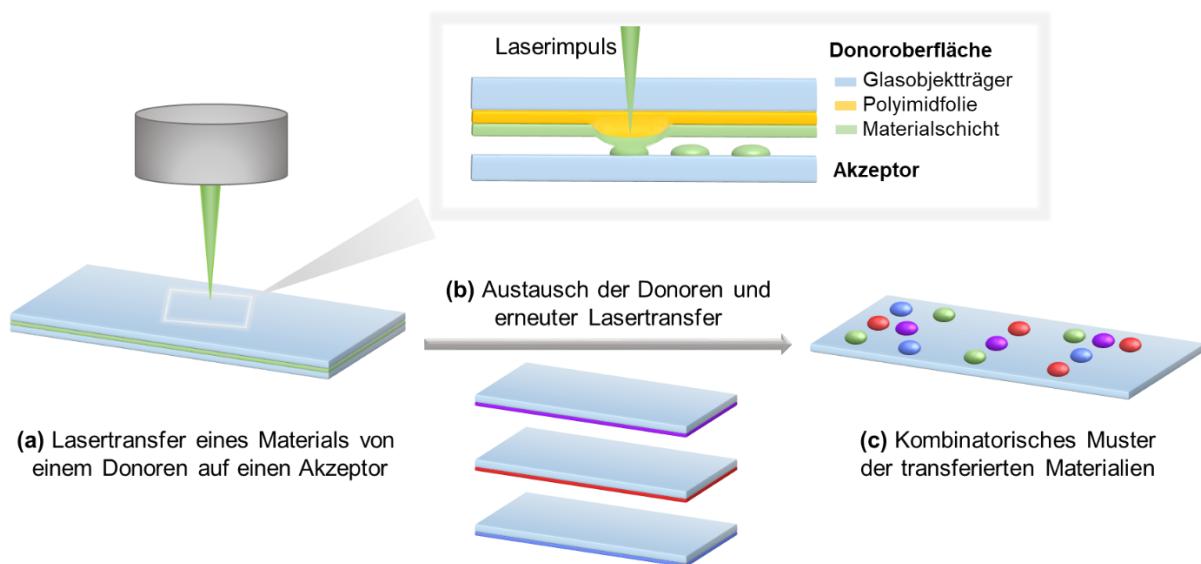


Abbildung 5: Darstellung des Druckverfahrens über cLIFT. a) Transfer einer Aminosäure von einem Donor auf den Akzeptor. b) Austausch der Donoren und erneuter Transfer. c) Kombinatorisches Muster der transferierten Materialien

Für den Lasertransfer wird eine Donoroberfläche mit der beschichteten Seite nach unten mit Hilfe eines Roboterarms auf der Syntheseoberfläche platziert. Die punktuelle Bestrahlung durch einen Laserimpuls induziert den Übertrag der Polymermatrix und des darin eingebetteten Materials (bspw. Aminosäure). Dabei wird der Laserimpuls von der Polyimidfolie absorbiert, welche die Energie in Form von Wärme an das zu transferierende Material weiterleitet. Die thermische Ausdehnung der Polyimidfolie führt zu einem Kontakt der Materialschicht und der Akzeptoroberfläche, wobei das Transfermaterial in Form von nanometerdicken Spots an dem Akzeptor haften bleibt^[7, 72]. Dieser Vorgang kann durch den Austausch von Donoroberflächen (Abbildung 5b) beliebig oft wiederholt werden und somit ein kombinatorisches Arraymuster (Abbildung 5c) der verschiedenen Materialien erzeugt werden. Für die vollständige Synthese eines Peptidarrays wird nach dem kombinatorischen Lasertransfer ein Kupplungs-Schritt durch eine Hitzeeinwirkung auf die Oberfläche vorgenommen. Die

Theoretische Grundlagen

Temperaturerhöhung bewirkt eine Änderung des Aggregatzustands der Polymermatrix in eine viskose Form, wodurch die eingebettete Aminosäure an die Syntheseoberfläche kuppeln kann. Die anschließende chemische Prozessierung sowie ein erneuter Übertrag von beliebigen Donoroberflächen kann für mehrere Syntheselagen wiederholt werden, sodass ein kombinatorischer Aufbau diverser Peptide möglich ist. Bei diesem Prozess können Spotabstände (Pitches) mit einer Mindestgröße von 75,0 µm und Spothöhen von 1,00 bis 80,0 nm generiert werden^[6]. Somit dienen hochdichten Peptidarrays als eine effiziente Methode zur Durchführung biologischer Studien und Analysen. Darüber hinaus ist die Methode des nano3D-Drucks kosteneffizient, da nur minimale Materialmengen für die Beschichtung erforderlich sind. Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen Transferzeit von etwa 5 Minuten pro übertragener Schicht, wodurch ein schneller Aufbau hochdichter Peptidarrays ermöglicht wird. Zusätzlich können mit dem nano3D-Drucker nicht nur die 20 proteinogenen Aminosäuren, sondern auch andere Materialien wie modifizierte Aminosäuren transferiert werden, die ein breites Spektrum an potenziellen Anwendungs- und Analysebereichen wie beispielsweise der Biokonjugation eröffnen.

2.2 Biokonjugation und Chemodetektion an Peptidarrays

2.2.1 Biokonjugation und Bio-Labeling Methoden

Die Biokonjugation beschreibt den Prozess der chemischen Verknüpfung von Biomolekülen, wie Proteinen oder Peptiden, mit anderen Molekülen, um neue Funktionen in diversen Anwendungsbereichen zu schaffen^[73]. Ein weit verbreitetes Beispiel der Biokonjugation ist die Einführung von Fluoreszenzmarkierungen über das grün fluoreszierende Protein (engl.: *green fluorescent protein*, GFP), um dynamische Prozesse von Proteinen in biologischen Organismen *in vivo* zu verfolgen^[74]. Allgemein findet diese Methode häufig Anwendung in der biologischen Forschung, Medizin und Diagnostik, sowie in der Biokatalyse und Nanotechnologie^[75]. Dabei können diverse gezielte Modifizierungen eingebracht werden um beispielsweise spezifische Wechselwirkungen von Proteinen^[76] zu untersuchen oder therapeutische Wirkstoffe zu entwickeln^[77]. Außerdem können durch diese Technik diagnostische Tests verbessert werden, sowie komplexe Enzymfunktionen detektiert werden.

Hierfür werden verschiedene Biomoleküle, wie beispielsweise small molecules (z.B. Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffe)^[78], Antikörper-Wirkstoff Konjugate (ADCs)^[79], Protein-Protein Konjugate^[80-81], sowie Oligosaccharide, Nukleinsäuren und synthetische Polymere^[82] eingesetzt. ADCs werden unter anderem für die gezielte Krebstherapie eingesetzt^[83]. Small molecules wie Biotin werden zur Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie verwendet^[84]. Fluoreszenzfarbstoffe werden zur Markierung von Proteinen für bildgebende Verfahren verwendet^[85]. Einige gängige genutzte Fluoreszenzfarbstoffe der Biokonjugation, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Abbildung 6 dargestellt. Für die Markierung der Aminogruppe des *N*-Terminus werden häufig mit Farbstoffen konjugierte *N*-Hydroxysuccinimidylester (NHS Ester) genutzt. Dazu zählen unter anderem Xanthenfarbstoffe, wie Tetramethylrhodamin (TAMRA) (z.B. TAMRA-NHS Ester (**33**)). Fluoreszenzfarbstoffe wie Cyanine (bspw. Cy3-Farbstoff (**36**)) oder AlexaFluor (AF) (bspw. AF488 (**37**), AF647 (**38**)) können unter anderem zum Labeling von Antikörpern genutzt werden. Zur Markierung von reaktiven, funktionalen Gruppen können bspw. Fluorescein (FAM)-Farbstoffe in Kombination mit Alkinen oder Aziden (z.B. 5-FAM-Alkin (**34**) bzw. -Azid (**35**)) genutzt werden.

Theoretische Grundlagen

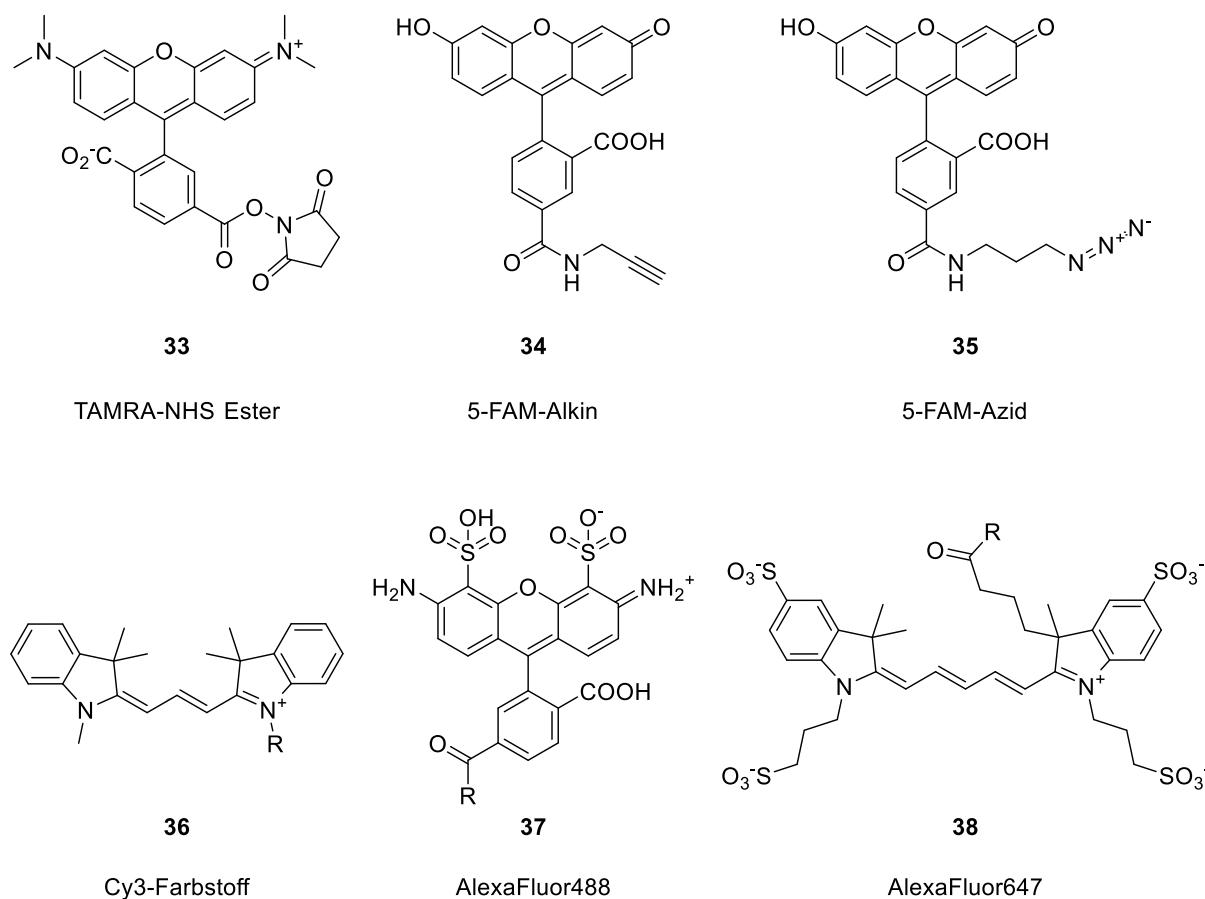
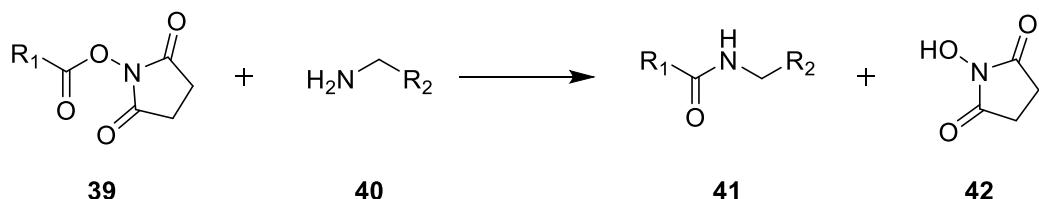


Abbildung 6: Strukturformeln verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die in dieser Arbeit genutzt wurden

2.2.2 Biokonjugation-Reaktionen

Die Methoden der Biokonjugation zeigen ein breites Spektrum von der enzymatischen bis hin zur genetischen und chemischen Konjugation. Bei der enzymatischen Konjugation können beispielsweise verschiedene Enzyme wie Transglutaminasen oder Ligasen verwendet werden, um diverse Moleküle spezifisch miteinander zu verknüpfen^[86]. Darüber hinaus können über die genetische Konjugation modifizierter Aminosäuren in Proteinen integriert werden^[87-88]. Dieser Prozess geschieht beispielsweise während der Translation und ermöglicht dadurch die Einführung spezifischer, chemischer Gruppen. Des Weiteren kann die chemische Konjugation genutzt werden, um reaktive Gruppen wie Amino- und Carboxylgruppen oder Thiole und Aldehyde an funktionelle Gruppen in biologisch aktiven Molekülen gezielt zu binden^[89].

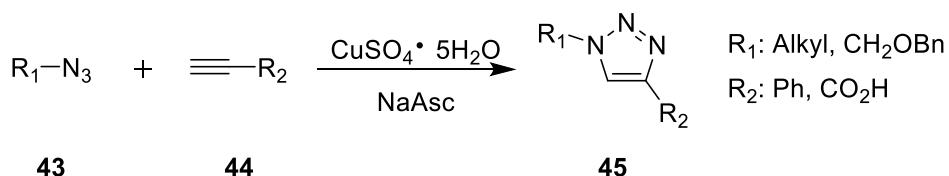
Zu den gängigen Reaktionen in der chemischen Konjugation zählen die Bildung von Peptidbindungen durch Maleimide oder die Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen über NHS-Ester^[90] (Schema 4). Außerdem ist die Einführung von Biotin mittels Sulfo-NHS-Biotin eine essenzielle Reaktion zur Markierung von Proteinen^[91]. Diese Reaktionen werden meist an natürlichen Aminosäuren wie Lysin, Cystein, Tyrosin, sowie dem *N*- und *C*-Terminus eines Peptids durchgeführt^[73, 92].



Schema 4: Reaktion eines NHS-Esters (**39**) mit einem primären Amin (**40**) zu einem Amid (**41**) und NHS (**42**). R₁: Fluorophor mit optionalem Linker. R₂: Bspw. Carboxylgruppe

Die Chemospezifität gestaltet sich bei der Nutzung von rein natürlichen Aminosäuren allerdings als schwierig, da diese in großen Mengen vorhanden sind, wodurch selektive Reaktionen nur begrenzt einsetzbar sind. Daher eröffnet die Einführung von speziellen funktionellen Gruppen an Aminosäuren, sowie die Nutzung von modifizierten Aminosäuren ein breites Spektrum von bioorthogonalen Reaktionen. Ein Beispiel für eine bioorthogonale Reaktion, die in der chemischen Biokonjugation häufig Anwendung findet, ist die Azid-Alkin Click-Reaktion (AAC)^[93]. Zu den bekanntesten Vertretern der AAC zählen die kupfer-katalysierte Azid-Alkin Click-Reaktion (CuAAC) und die Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion (SpAAC).

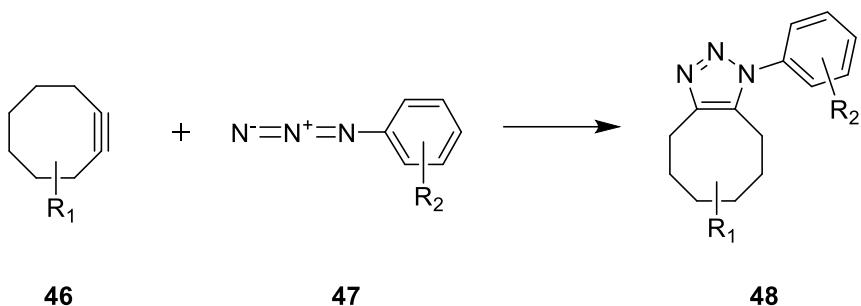
Bei der kupfer-katalysierten Azid-Alkin Click-Reaktion (CuAAC) reagiert ein Azid (**43**) mit einem Alkin (**44**) unter Katalyse eines Kupfer(I)-Salzes und Natriumascorbat zu einem 1,2,3-Triazol Produkt (**45**)^[94].



Schema 5: Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Click Reaktion. Reaktion eines Azids (**43**) mit einem Alkin (**44**) unter Katalyse eines Kupfersulfats und Natriumascorbat zu einem 1,2,3-Triazol (**45**)

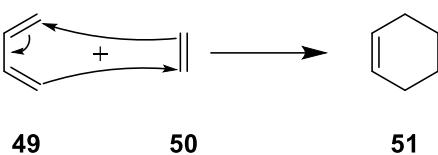
Theoretische Grundlagen

Die vorhandenen Kupferionen bei der CuAAC können jedoch potenziell eine toxische Reaktion aufweisen, weshalb kupferfreie Variante der Click-Reaktion entwickelt wurden^[95-96]. Eine Variante der kupferfreien Click-Reaktionen stellt die Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion (SpAAC) dar^[95]. Hierbei wird die Spannung von Cyclooctynen (**46**) genutzt, um die Reaktion von Aziden (bspw. Phenylaziden (**47**)) zu einem 1,2,3-Triazol (**48**) auszuführen.



Schema 6: Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion. Reaktion eines Cyclooctins (**46**) mit einem Phenylazid (**47**) zu einem 1,2,3-Triazol (**48**)

Des Weiteren können ebenfalls Diels-Alder-Reaktionen für eine katalysatorfreie Click-Reaktion genutzt werden^[97]. Hierbei reagiert ein Dien mit einem Dienophil in einer [4+2]-Cycloaddition^[98]. Ein Beispiel dieser Reaktion ist in **Schema 7** dargestellt, bei der ein 1,3-Butadien (**49**) mit Ethen (**50**) in einer [4+2]-Cycloaddition zu Cyclohexen (**51**) reagiert



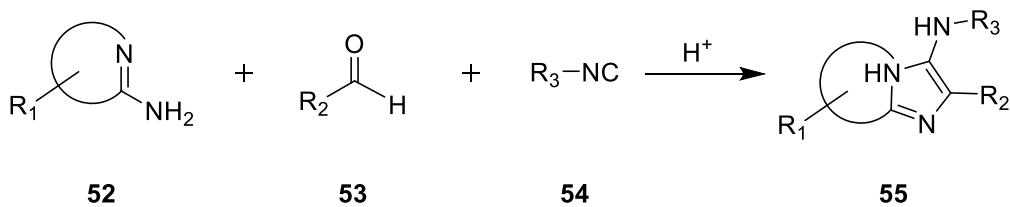
Schema 7: [4+2]-Cycloaddition von 1,3-Butadien (**49**) mit Ethen (**50**) zu Cyclohexen (**51**) als Beispiel der Diels-Alder-Reaktion

Allgemein zeichnen sich die genannten Click-Reaktionen durch eine hohe Selektivität, sowie Effizienz und Schnelligkeit unter milden Bedingungen aus^[99]. Durch die Bioorthogonalität können diese Reaktionen in komplexen biologischen Systemen ohne störende Nebenreaktionen verwendet werden^[100-101].

2.2.3 Chemodetektion

Die Chemodetektion beschreibt die Verwendung chemischer Reaktionen zur Detektion bzw. Analyse von Substanzen in einer Probe. Dabei umfasst sie eine Vielzahl von Methoden und Techniken, darunter spektrophotometrische Analysen, wie zum Beispiel die Ninhydrin-Reaktion zur Detektion von Aminosäuren^[102]. Außerdem können enzymatische Reaktionen wie die Glucosendetektion mit Hilfe von Glucoseoxidases ebenfalls genutzt werden^[103]. Zusätzlich werden auch viele chromatographische Verfahren, wie unter anderem die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, engl.: *High Performance Liquid Chromatography*) zur Auftrennung und Quantifizierung von zum Beispiel Aminosäuren über spezifische Säulen und Detektoren verwendet^[104].

Der Einsatz von Aminosäuren mit verschiedenen Modifikationen in Peptidarrays ermöglicht ein erweitertes Spektrum an möglichen Chemodetektionen. Durch diverse funktionelle Gruppen können beispielsweise Multikomponentenreaktionen wie die Ugi-Reaktion^[105] oder die Groebke-Blackburn-Bienaymé-Reaktion^[106-108] (GBB-Reaktion) zur Chemodetektion verwendet werden. Die GBB-Reaktion ist eine Variante der Ugi-Reaktion, bei der statt linearen Strukturen Heterozyklen gebildet werden. Sie beschreibt eine säurekatalysierte Dreikomponentenreaktion eines heterozyklischen Amidins (**52**) mit einem Aldehyd (**53**) und einem Isocyanid (**54**) zu einem Imidazo[1,2-a]heterozyklen (**55**).



Schema 8: Groebke-Blackburn-Bienaymé-Reaktion (GBB). Reaktion eines heterozyklischen Amidins (**52**) mit einem Aldehyd (**53**) und einem Isocyanid (**54**) zu einem Imidazo[1,2-a]heterozyklen (**55**)

Die GBB-Reaktion bietet ein breites Anwendungsspektrum und konnte bspw. bereits durch M. Stahlberger für die *in vivo* Markierung von steroidalen Aldehyden, sowie zur Wechselwirkung mit doppelsträngiger DNA genutzt werden^[109]. Insgesamt können Chemodetektionen zur Markierung vieler Strukturen und Moleküle genutzt werden. Dadurch bieten sie eine effiziente Möglichkeit der Verknüpfung von chemischen Reaktionen mit biologisch relevanten Strukturen und können bspw. zur Erforschung diverser Abläufe des Immunsystems beitragen.

2.3 Das Immunsystem und Autoimmunerkrankungen

Das humane Immunsystem ist ein komplexes System aus verschiedenen Organen, Zellen und Geweben, das den menschlichen Körper jeden Tag vor einer Vielzahl von Bakterien, Viren und Parasiten schützt. Ein zentraler Teil dieses Systems zur Verteidigung von vielen verschiedenen Krankheitserregern (Pathogene) besteht aus der Produktion von Antikörpern. Antikörper binden gezielt an Antigene und sind wesentlich am Prozess beteiligt, diese unschädlich zu machen^[110]. Die Charakterisierung von Antikörpern und deren Spezifität an körperfremde Pathogene oder an körpereigene Antigene zu binden und Autoimmunkrankheiten auszulösen sind ein aktueller Bestandteil in der Forschung und Medizin.

2.3.1 Das humane Immunsystem

Die Erkennung pathogener Strukturen und dessen initiierte Abwehrmechanismen wird in zwei verschiedene Reaktionen unterteilt: das angeborene (unspezifische) und das adaptive (spezifische) Immunsystem^[111]. Hierbei stellt das angeborene Immunsystem eine erste Verteidigung gegen verschiedene Infektionen und Pathogene dar. Einerseits liefern physikalische und chemische Barrieren wie die Haut, Schleimhäute oder antimikrobielle Peptide eine erste Abwehr des Körpers^[112]. Andererseits zählen auch zelluläre Komponenten und das sogenannte Komplementsystem zu der angeborenen Immunreaktion^[112]. Das Komplementsystem liefert eine erste Reaktion bei bspw. Infektionen, indem es verschiedene Pathogene markiert (Opsonierung) oder diese direkt auflöst (Lyse)^[113]. Die Erkennung der Pathogene erfolgt über keimbahncodierte, unspezifische Muster-Erkennungs-Rezeptoren (engl.: *pattern recognition receptors*, PRRs), deren wichtigsten Vertreter die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: *toll-like receptors*; TLRs) sind^[114]. Die TLRs erkennen die spezifischen Muster auf Pathogenen (engl.: *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) und aktivieren dadurch die Immunantwort. Zu den wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören Phagozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen, sowie antigenpräsentierende Zellen (engl.: *antigen presenting cells*, APCs)^[111]. Zu den Phagozyten zählen insbesondere Granulozyten, Makrophagen und Neutrophile, die zur Infektionszelle wandern, Krankheitserreger über Phagozytose aufnehmen und intrazellulär verdauen. Außerdem setzen sie Signalproteine, sog. Zytokine, frei, welche die Kommunikation zwischen den Zellen fördern und

Entzündungsreaktionen steuern. Die natürlichen Killerzellen erkennen virusinfizierte Zellen, sowie Tumorzellen und töten diese ab. Zu den APCs gehören vor allem dendritischen Zellen, welche Antigene an T-Zellen präsentieren und so die Aktivierung des adaptiven Immunsystems fördern.

Das adaptive Immunsystem wird im Laufe des Lebens gezielt gegen spezifische Pathogene entwickelt und unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem durch die Ausbildung von Gedächtniszellen^[115]. Die Erkennung dieser Antigene erfolgt über spezifische Rezeptoren, die B-Zell-Rezeptoren (engl.: *B-Cell receptors*, BCRs) und T-Zell-Rezeptoren (engl. *T-Cell receptors*, TCRs). BCRs sitzen auf der Oberfläche von B-Zellen und binden freie Antigene. Die TCRs befinden sich auf T-Zellen und erkennen Antigene, die in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentiert werden. T-Zellen werden unter anderem in CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-zytotoxische-T-Killerzellen differenziert^[110, 116]. Hierbei zerstören T-Killerzellen infizierte Zellen, die als körperfremde Antigene einer APC erkannt wurden. T-Helferzellen unterstützen wiederum die Proliferation und Differenzierung von T-Killerzellen und B-Zellen über Zytokinausschüttung. Aktivierte B-Zellen differenzieren sich in Plasmazellen, die Antikörper produzieren, welche wiederum spezifische Antigene binden und Pathogene neutralisieren können. Dabei können B-Zellen ein breites Spektrum an Antikörpern produzieren, wobei eine einzelne B-Zelle nur einen bestimmten Antikörper mit der exakt gleichen Aminosäuresequenz produzieren kann^[117]. Nach einer Immunreaktion des Körpers gegen bspw. eine Infektion verbleiben zudem einige aktivierte B- und T-Zellen als Gedächtniszellen im Körper, die bei erneuter Exposition desselben Pathogens eine schnellere und stärkere Immunantwort ermöglichen^[115]. Diese Gedächtniszellen werden beispielsweise für Impfstoffe ausgenutzt, um eine Immunantwort durch abgeschwächte oder inaktivierte Erreger auszulösen.

2.3.2 Antikörper und Antikörperspezifität

Antikörper bzw. Immunglobuline (Ig) sind Proteine und bestehen aus einer spezifischen Abfolge von Aminosäuren. Strukturell werden Antikörper in jeweils zwei identische schwere und leichte Ketten unterteilt. Zudem besitzen sie variable und konstante Regionen. Die konstante Region aktiviert andere Immunmechanismen, während die variable Region aus spezifischen Bindungsstellen (Paratope) für Antigene besteht^[118-119]. Antikörper werden anhand ihres Aufbau und ihrer Eigenschaften in fünf

Theoretische Grundlagen

verschiedene Klassen (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD) kategorisiert. Die erste, primäre Immunantwort erfolgt über IgM, welche oft als Pentamere aus fünf Y-förmigen Untereinheiten sezerniert werden. Die am häufigsten im Blut vertretene Antikörperklasse sind IgG. Sie besitzen mit 7-16 g/L die höchste Konzentration im Blutserum und sind für eine langfristige Immunantwort verantwortlich^[110-111, 116]. IgA sind vorwiegend in den Schleimhäuten lokalisiert und bieten als Dimere Schutz vor dort angesiedelten Pathogenen. IgE sind an allergischen Reaktionen beteiligt und bieten eine Abwehr gegen vielzellige Parasiten. IgD spielen eine Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen, allerdings ist deren Funktion noch nicht vollständig erforscht^[115, 120].

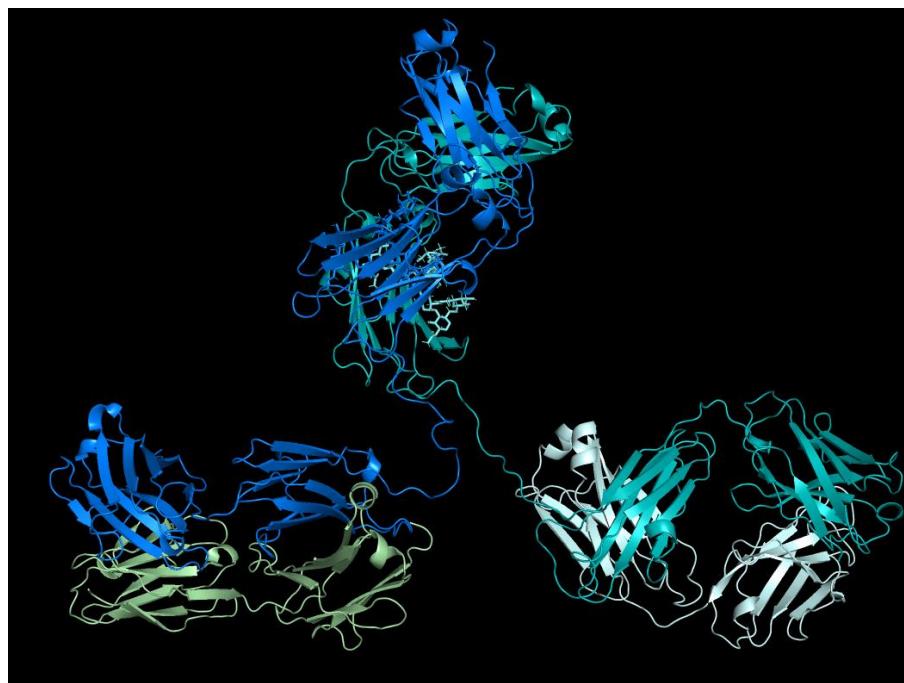


Abbildung 7: 3D Struktur der Immunglobulinklasse IgG (PDB Eintrag: 1IGT) visualisiert mit Pymol.

Allgemein haben Antikörper viele verschiedene Funktionen bei der Immunreaktion. Zum einen binden sie direkt an Pathogene und verhindern deren Eindringen in Zellen. Zum anderen markieren sie Pathogene zur Phagozytose durch Makrophagen oder Neutrophile. Außerdem unterstützen sie die Aktivierung des Komplementsystems zur direkten Lyse von Pathogenen und erkennen bei natürlichen Killerzellen zuvor markierte Zellen. Die Erkennung von körperfremden Strukturen ist die wichtigste Eigenschaft des Immunsystems, allerdings ist das Immunsystem nicht immer in der Lage zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden. Diese unerwünschten Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen können in Autoimmunerkrankungen und Allergien resultieren.

2.3.3 Autoimmunreaktionen

Die Entstehung von Autoimmunerkrankungen beinhaltet einen komplexen Prozess, der durch verschiedene Wechselwirkungen zwischen genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren gekennzeichnet ist. Das Immunsystem kann beispielsweise durch eine Überaktivierung von B-Zellen, die Antikörper gegen körpereigene Antigene produzieren, einen Toleranzverlust und so eine Produktion von Autoantikörpern auslösen. Auch eine Fehlregulation der T-Zellen kann zur Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen führen, die wiederum körpereigene Zellen angreifen. Ebenso kann ein Ungleichgewicht in der Produktion von Zytokinen die Immunantwort beeinträchtigen und so zur Entstehung von Autoimmunitäten beitragen^[121]. Auch Umweltfaktoren wie die Ernährung, Chemikalien oder Medikamente können das Risiko für Autoimmunreaktionen begünstigen. Zudem können auch bestimmte Virusinfektionen die Aktivierung des Immunsystems modulieren und somit Autoimmunreaktion hervorrufen^[122]. Ebenso könnten diese Pathogene ähnliche Strukturen zu körpereigenen Antigenen besitzen, wodurch eine Kreuzreaktion, sog. Molekulare Mimikry, ausgelöst werden kann. Außerdem können auch bestimmte genetische Anfälligkeit (Prädispositionen) bei beispielsweise humanen Leukozyten-Antigenen (engl.: *Human Leukocyte Antigen*, HLA) mit Autoimmunerkrankungen assoziiert werden^[123-124].

Zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen gehören unter anderem die Rheumatoide Arthritis, bei welcher chronische Entzündungen der Gelenke vorliegen oder der Hashimoto-Thyreoiditis, bei welchem das Immunsystem die Schilddrüsenzellen angreift. Auch Systemischer Lupus erythematoses (SLE), Multiple Sklerose (MS) oder Typ-1-Diabetes zählen zu den vorherrschenden Autoimmunkrankheiten^[125]. Die Behandlung dieser und anderer Autoimmunerkrankungen zielt häufig darauf ab, die Immunantwort zu beeinflussen oder die Symptome zu lindern. Zum Beispiel werden verschiedene Immunsuppressiva wie Kortikosteroide verabreicht um Immunreaktionen zu dämpfen. Auch zielgerichtete Therapien gegen spezifische Teile des Immunsystems (Biologika) werden häufig zur Behandlung eingesetzt. Die Verbesserung verschiedener Behandlungsmethoden oder gar Ansätze zur Heilung von Autoimmunerkrankungen sind stetiger Bestandteil der Forschung. Dabei werden unter anderem auch oft posttranskriptionale Veränderungen von Peptiden, die potenziellen Einfluss auf die Pathogenese von Krankheiten haben, untersucht. Zusätzlich zu genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren können

Theoretische Grundlagen

auch Veränderungen in und nach der Proteinbiosynthese auftreten. Zu diesen synthesebedingten Faktoren zählen unter anderem verschiedene posttranslational modifizierte Aminosäuren.

2.3.4 Die Rolle von Posttranslationalen Modifikationen bei Erkrankungen

Diese posttranslationalen Modifikationen sind chemische Modifikationen durch beispielsweise Enzyme, die nach der Translation an Proteinen stattfinden^[126]. Dadurch können verschiedene strukturelle und funktionelle Änderungen bei Proteinen entstehen, welche potenziell eine wichtige Rolle bei diversen biologischen Prozessen wie der Immunantwort spielen^[127-128]. Ein besonderes Beispiel für eine Autoimmunkrankheit mit Assoziation verschiedener PTMs ist die Rheumatoide Arthritis (RA). Rheuma ist die am weitesten verbreitete chronisch entzündliche Arthritis und betrifft ca. 0,80-1,20 % der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland (Stand Oktober 2023)^[129]. In der Forschung konnten bereits viele verschiedene PTMs wie Glykosylierungen, Citrullinierungen, Acetylierungen und Hydroxylierungen mit dieser Erkrankung assoziiert werden. Beispielsweise konnten spezifische Glykosylierungsänderungen von IgG Antikörpern bei Patienten mit RA identifiziert werden, wodurch die Bindung an Antigene beeinflusst wird^[130]. Glykosylierungen treten darüber hinaus bei weiteren Erkrankungen wie unter anderem Diabetes mellitus^[131], Zystischer Fibrose^[132] und Alzheimer^[133] auf.

Die häufigste PTM, die mit RA assoziiert wird, ist die Citrullinierung von verschiedenen Proteinen. Diese stehen in einer engen Verbindung mit anti-citrullinierten Protein-Antikörpern (ACPA), welche spezifische Marker bei der Diagnose von RA sind und oft schon vor dem Auftreten klinischer Symptome nachweisbar sind^[134]. Die Diagnostik von RA über Rheumafaktor(RF)-Antikörper zeigt nur eine mäßige Spezifität für RA^[135], da diese Antikörper ebenso bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, anderen Infektionskrankheiten und bei 3-5 % der gesunden Bevölkerung (10-30 % bei älteren Menschen) gefunden werden können^[136-137]. Daher beeinflusste die Entdeckung spezieller Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide (CCP) die Diagnostik stark^[138]. Anti-CCP treten mit einer Häufigkeit von ca. 80 % der RA Patienten mit einer Spezifität von 98 % auf^[139]. Außerdem treten diese Antikörper häufig in einem frühen Stadium der Erkrankung auf und können Aufschluss über den Verlauf der Krankheit geben^[140]. Viele verschiedene citrullinierte Peptide, wie

beispielsweise Filaggrin^[141-142], Fibrinogen^[143-144] und Vimentin^[145-146] konnten schon mit RA in Verbindung gesetzt werden. Daher besteht eine potenzielle Bedeutung von Citrullin in der Pathogenese von Rheumatoider Arthritis, sowie als möglicher Biomarker. Allgemein werden in der Medizin sog. Biomarker als charakteristische biologische Merkmale zur Beobachtung und Messung verschiedener Prozesse und Krankheitszustände verwendet^[42]. Citrullinierungen werden nicht nur in RA beobachtet, sondern auch in verschiedenen weiteren Krankheiten, wie unter anderem SLE^[147], dem Sjögrens Syndrom^[148] oder Psoriasis-Arthritis^[149]. Auch die posttranskriptionale Modifikation Homocitrullin kann in verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Rheuma, SLE^[150] und dem Sjögrens Syndrom^[151] gefunden werden. Homocitrullin wird typischerweise über eine Carbamylierung von Lysin in Proteine eingebaut. Die Detektion erfolgt beispielsweise bei RA über anti-carbamylierte Protein (anti-CarP) Antikörper, welche bei ca. 45 % der frühen RA Patienten gefunden werden können^[152-153]. Ebenso können auch Acetylierungen von Lysin bei verschiedenen Proteinen wie Fibrinogen oder Vimentin bei Patienten mit RA detektiert werden^[154]. Auch in weiteren Erkrankungen, wie Neurodegenerativen Krankheiten bestehen Zusammenhänge mit Acetylierungen, wie bspw. die Acetylierung von Histonen^[155]. Außerdem werden auch Hydroxylierungen, wie die Hydroxylierung von Prolin bei Kollagen Typ 2 bei Patienten mit RA assoziiert^[156]. Des Weiteren treten Hydroxylierungen auch in der Signalkette bei Sauerstoffmangel von Kardiovaskulären Krankheiten auf^[157].

Eine weitere PTM, die mit Rheuma assoziiert wird, sind Phosphorylierungen, welche im Kontext mit Signalwegen auftreten können^[158]. Außerdem können phosphorylierte Aminosäuren auch mit verschiedenen Krankheiten, wie Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert werden. Zum Beispiel treten Phosphotyrosin und Phosphoserin häufig in Krebszellen auf, wodurch sie zur Aktivierung von Signalwegen zum Zellwachstum oder der Metastasierung beitragen können. Ebenso konnte ein Kontext bei der Alzheimer Krankheit und Phosphoserin identifiziert werden, bei welchem charakteristische β -Amyloid-Plaques im Gehirn gebildet wurden^[159-160]. Des Weiteren kann bei der Pathogenese von Parkinson eine erhöhte Konzentration von Phosphotyrosin an $\alpha\beta$ -Synuclein festgestellt werden, wodurch eine Verbindung zur Regulation von Proteinen besteht, die an der Funktion von Dopamin-Neuronen beteiligt sind^[161]. Auch bei der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose kann ein Zusammenhang mit oxidativen Phosphorylierungen von pro- und

Theoretische Grundlagen

anti-inflammatorische B-Zellen und damit eine Disregulierung der Zytokinausschüttung festgestellt werden^[162].

Außerdem können auch diverse Zusammenhänge von Phosphorylierungen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) festgestellt werden. Das Hepatitis B Virus ist ein DNA-Virus, der eine Leberinfektion verursacht und in einer chronischen Hepatitis resultieren kann. Hepatitis B ist eine der am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten, die 22.990 Menschen in Deutschland (Stand 2023) betreffen^[163]. Die Virusreplikation besteht aus mehreren Schritten: der Anknüpfung an die Wirtszelle über spezifische Rezeptoren, die Freisetzung des Kapsids in die Wirtszelle, die Umwandlung, Transkription und Translation der viralen Gene, sowie die Zusammensetzung und Freilassung der neuen Viren aus der Zelle. Das HBV Genom ist dabei aus mehreren Komponenten aufgebaut, welche in vier Hauptgene aufgeteilt werden: S (Oberflächenproteine, engl.: *surface proteins*), C (Kapsidprotein, engl.: *capsid protein*), P (Polymerase) und X (regulatorische Proteine). Durch die Vielfalt an genetischen Komponenten, sowie des generellen Mechanismus der Virusreplikation bestehen viele Möglichkeiten zum Einbau von Phosphorylierungen, wobei beispielsweise Phosphorylierungen von Serin bei HBC Proteinen gefunden werden konnten^[164]. Ebenso konnten Phosphorylierungen an strategischen Stellen von HBs Proteinen entdeckt werden, wodurch ein möglicher Zusammenhang in der Virionenbildung oder dem Zelleintritt bestehen könnte^[165].

Die genannten Beispiele für posttranskriptionale Modifikationen an einer Vielzahl von Proteinen spielen bei diversen Krankheiten eine potenzielle Rolle in verschiedenen Aspekten der Pathogenese. Zudem können einige weit verbreitete Krankheiten wie Rheumatoide Arthritis und Hepatitis B mit verschiedenen PTMs assoziiert werden. Die Erforschung von PTMs als potenzielle Ursachen oder Biomarkern ist daher von großer Bedeutung. Die Integration von PTMs in Hochdurchsatztechnologien, wie bspw. Peptidarrays möglicherweise kann einen Aufschluss über verschiedene Mechanismen der Pathogenese verschiedener Krankheiten geben.

3. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen verschiedene modifizierte Aminosäuren mit der Hilfe des nano3D-Druckers übertragen und in verschiedenen chemischen und biologischen Anwendungen eingebracht werden. Hierfür werden in dem ersten Teil der Arbeit nicht proteinogene Aminosäuren, darunter auch posttranskriptionale modifizierte Aminosäuren, mit dem nano3D-Drucker transferiert und die dafür benötigten Transferparameter optimiert. Zudem werden ebenfalls verschiedene Methoden zur Verifizierung der funktionalen Gruppen der Seitenketten der Aminosäuren angewandt, um diese für diverse Anwendungen nutzen zu können. Anschließend werden ausgewählte modifizierte Aminosäuren in Methoden und Reaktionen der Biokonjugation und Chemodetektion verwendet und in Peptidarrays angewandt. Als Beispiel der Biokonjugation werden die hocheffizienten, spezifischen und untere milden Bedingungen ablaufenden Click-Reaktionen, wie (i) die kupferkatalysierte und (ii) die Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion eingesetzt. Darüber hinaus wird auch die Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaktion als *proof-of-concept* der Chemodetektion angewandt. Über die Kombination der modifizierten Aminosäuren mit chemischen Reaktionen sollen mit Hilfe des nano3D-Druckers biokompatible Nachweisreaktionen für beispielsweise schwer zugänglichen biologische Proteine, wie Membranproteine, etabliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die zuvor übertragenen, posttranskriptionale modifizierten Aminosäuren in Peptidarrays integriert und für die biologische Untersuchung von verschiedenen Krankheitsbildern verwendet. Hierbei werden einerseits Bindungsstudien zu der Autoimmunkrankheit der rheumatoïden Arthritis und dem Sjögren-Syndrom durchgeführt. Es werden mögliche Bindungsmotive detektiert, die gegebenenfalls eine posttranskriptionale Modifikation als relevante Aminosäure für die Bindung eines Antikörpers besitzen. Somit sollen potenziell ähnliche Antikörper in verschiedenen Patientenserien erkannt werden, die charakteristisch für die entsprechenden Krankheiten sind. Die Entstehung dieser Antikörper könnte auf gemeinsame Ursachen innerhalb der einzelnen Krankheiten, wie posttranskriptionale Modifikationen an Aminosäuren zurückzuführen sein. Zusätzlich werden Bindungsstudien zu posttranskriptionalen Modifikationen von Peptiden des Hepatitis B Virus durchgeführt. Diese sollen dazu dienen, neue Ansätze zur Induktion der Toleranz gegen den Virus oder zur Entwicklung therapeutischer Strategien zu identifizieren.

4. Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Proteine weisen in der Natur diverse Modifikationen an Aminosäuren auf, die ausschlaggebend für verschiedene Abläufe und Reaktionen sein können. Beispielsweise wurden bei der Autoimmunerkrankung der rheumatoiden Arthritis mit großer Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang der Erkrankung mit der posttranslational modifizierten Aminosäure Citrullin nachgewiesen^[138-140, 154, 166]. Bisher wurde der nano3D-Drucker überwiegend zur Herstellung von Peptidarrays und Peptoiden (*N*-substituierte Polyglycine) verwendet^[7]. Zudem konnte der Anwendungsbereich des Lasersystems über verschiedene Click Reaktionen wie die Kupferkatalysierte Azid-Alkin Click-Reaktion (CuAAC)^[167], die Spannungsgesteuerte Azid-Alkin Click-Reaktion (SpAAC) und Thiol-/in Reaktion erweitert werden^[7]. Die verwendeten modifizierten Aminosäuren wurden dabei hauptsächlich in einer Lösung mit Kupplungsreagenzien an die Oberfläche angebracht, wobei zum Teil auch modifizierte Aminosäuren lasertransferiert werden konnten. In dieser Arbeit soll das Spektrum an posttranslational modifizierten Aminosäuren und nicht proteinogenen Aminosäuren, vor allem unter Nutzung des Lasertransfers, erweitert und nachgewiesen werden. Diese Aminosäuren sollen dazu dienen die Anwendungspalette von Peptidarrays zu erweitern und zum Beispiel neue mögliche Biomarker über Modifikationen zugänglich zu machen. Zur Detektion und Reaktion an verschiedenen funktionellen Gruppen werden diverse Methoden der Biokonjugation, sowie Reaktionen der Chemodetektion verwendet. Diese Reaktionen sollen einerseits eine selektive Reaktion für verschiedene Modifikation ermöglichen. Andererseits sollen chemische Reaktionen mit biologischen Molekülen verknüpft werden, um in der Zukunft chemische Nachweissysteme in biologischen Molekülen zu entwickeln.

4.1 Übertrag und Nachweis von modifizierten Aminosäuren

In der Vergangenheit wurden mit dem 2016 entwickelten cLIFT-System überwiegend Peptidarrays mit voraktivierten, proteinogenen Aminosäuren hergestellt^[6]. Zudem wurde bereits durch die Arbeit von D. Mattes am cLIFT-System der Transfer nicht proteinogener Aminosäuren, sowie der Einfluss der dafür benötigten Aktivierungsreagenzien gezeigt^[7]. Durch die stetige Weiterentwicklung und Optimierung des ursprünglichen Systems wurde ebenfalls der Wechsel zu einem 405 nm OLED-Laser vorgenommen. Durch die Beschichtung der Donoroberfläche mit

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

einer Polyimid-Folie wurde ein verändertes Absorptionsverhalten des Laserimpulses festgestellt, wodurch ein erneuter Transfer, sowie Optimierung eingesetzter Stoffe notwendig war. Die Erforschung des Einflusses verschiedener diverse Parameter wie der Transferenergie, der Materialmenge, der Donoroberflächen Beschichtung und der Häufigkeit des Materialtransfers haben, wurden von A. Klinkusch unter anderem an Fmoc-Glycin-OPfp untersucht^[168]. Die Optimierung der proteinogenen Aminosäuren, sowie deren Implementierung in Peptidarrays wurden in meiner vorangegangenen Masterarbeit durchgeführt^[169]. Für die Optimierung der Aminosäuren wurden verschiedene Parameter, wie die Fluoreszenzemission, der Spotdurchmesser, die Transferhöhe, sowie die Konzentration der Aminosäure in der Beschichtungslösung betrachtet. Ebenfalls wurde ein Übertrag auf die Syntheseoberfläche mittels vertikaler Scanning-Interferometrie (VSI) verifiziert. Ein Beispiel des optimierten Übertrags von Fmoc-Alanin-OPfp aus der vorangegangenen Masterarbeit ist in Abbildung 8 dargestellt.

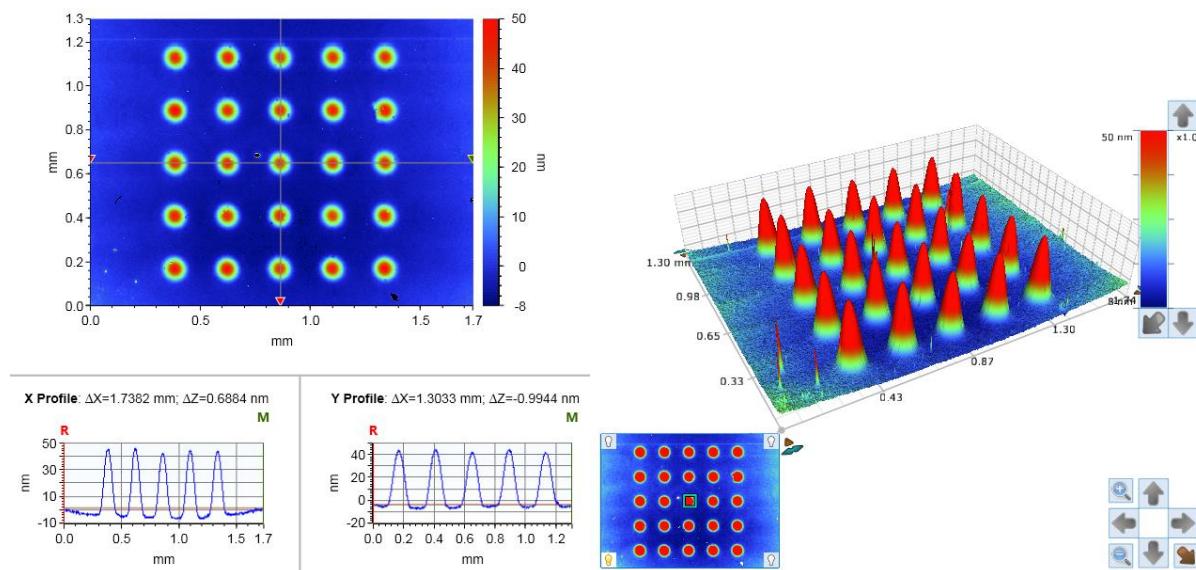


Abbildung 8: Darstellung eines Transfers über Detektion mit VSI am Beispiel von Alanin aus der vorangegangenen Masterarbeit^[169]. Transferparameter: 140 mW und 10,0 ms. Transferhöhe: 41,2 nm (Bereich: 45,8–37,6 nm). 2D Profil in X und Y Richtung (links), sowie 3D Darstellung (rechts)

Als optimale Parameter zur Peptidsynthese wurden jegliche Parameter ausgewählt, die einen Spotdurchmesser von ~200 µm, sowie eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von ~20.000 a.u. nach der Kupplung an die Syntheseoberfläche sowie der TAMRA-NHS Inkubation des N-Terminus aufwiesen. Die Wahl genau dieser Parameter erfolgte basierend darauf, eine Synthese von Peptiden mit mindestens 15 Aminosäuren, mit möglichst geringer Verminderung des Spotdurchmessers, sowie

einer ausreichenden Menge an Aminosäure innerhalb eines Spots zu gewährleisten. Als geeignete Konzentration der Aminosäuren wurde 30,0 µmol der eingesetzten Aminosäuren ermittelt. Die optimierten Parameter für den Transfer mit dem nano3D-Drucker, sowie die benötigten Einwaagen zur Beschichtung der Donoroberflächen sind in Tabelle 22 (Anhang, Seite 179) und Tabelle 19 (Anhang, Seite 177) zu entnehmen.

In dieser Arbeit sollen nicht proteinogene Aminosäuren mit dem nano3D-Drucker übertragen und optimiert werden, um diese im Anschluss für Reaktionen der Biokonjugation und Chemodetektion zu verwenden. Für dieses Vorhaben wurden, sofern nicht anders deklariert, die Transferparameter mit einer Laserleistung von 200-100 mW ($\Delta=10,0$ mW), sowie der Laserzeit von 16,0-8,00 ms ($\Delta=1,00$ ms) verwendet (s. Abbildung 9). Der verwendete Spotabstand (Pitch) beträgt für alle folgenden Versuche 250 µm. Zudem wurden die etablierten Parameter aus der vorangegangenen Masterarbeit von ~200 µm, sowie einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von ~20.000 a.u. nach einer TAMRA-NHS Inkubation des N-Terminus angestrebt. Die verwendeten Einwaagen zur Herstellung der Donoroberflächen sind aus Tabelle 20 (Anhang, Seite 178) zu entnehmen.

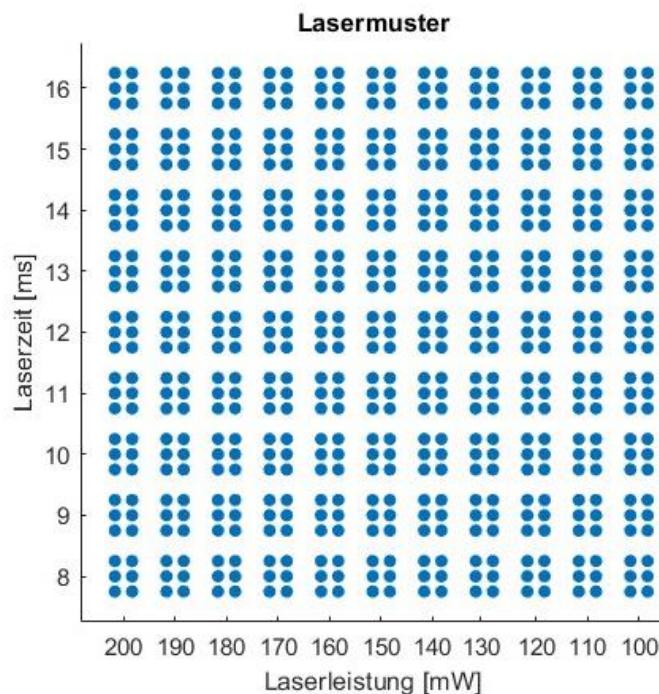


Abbildung 9: Darstellung des verwendeten Lasermusters zur Optimierung der Aminosäuren und den angewandten Click Reaktionen. Transferparameter: Laserleistung: 200-100 mW ($\Delta=10,0$ mW). Laserzeit: 16,0-8,00 ms ($\Delta=1,00$ ms). Pitch: 250 µm

4.1.1 Posttranslational modifizierte Aminosäuren

Citrullin, Homocitrullin und Acetyllysin

Die posttranslational modifizierten Aminosäuren Citrullin (Cit), Homocitrullin (HCit) und Acetyllysin (Lys(Ac)) zählen unter anderem zu den am häufigsten in der Natur vorkommenden Modifikationen an Proteinen^[170]. Der Transfer und die Optimierung dieser Aminosäuren in voraktivierter Form (Fmoc-Cit-OPfp, Fmoc-HCit-OPfp und Fmoc-Lys(Ac)-OPfp) wurde ebenfalls in meiner vorangegangenen Masterarbeit durchgeführt^[169]. Hierfür wurde die Fmoc-Entschützung einer Syntheseoberfläche mit einer Lösung aus Piperidin in *N,N*'-Dimethylformamid (DMF), sowie ein anschließender laserbasierter Übertrag (Lasermuster Abbildung 8) vorgenommen. Danach wurde eine Kupplung an die Syntheseoberfläche und eine Acetylierung mit einer Lösung aus Essigsäureanhydrid und *N,N*'-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF durchgeführt. Nach einer erneuten Fmoc-Entschützung, wurde eine TAMRA-NHS Inkubation des *N*-Terminus durchgeführt. Ein Ausschnitt des Ergebnis aus der vorangegangenen Masterarbeit ist beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt.

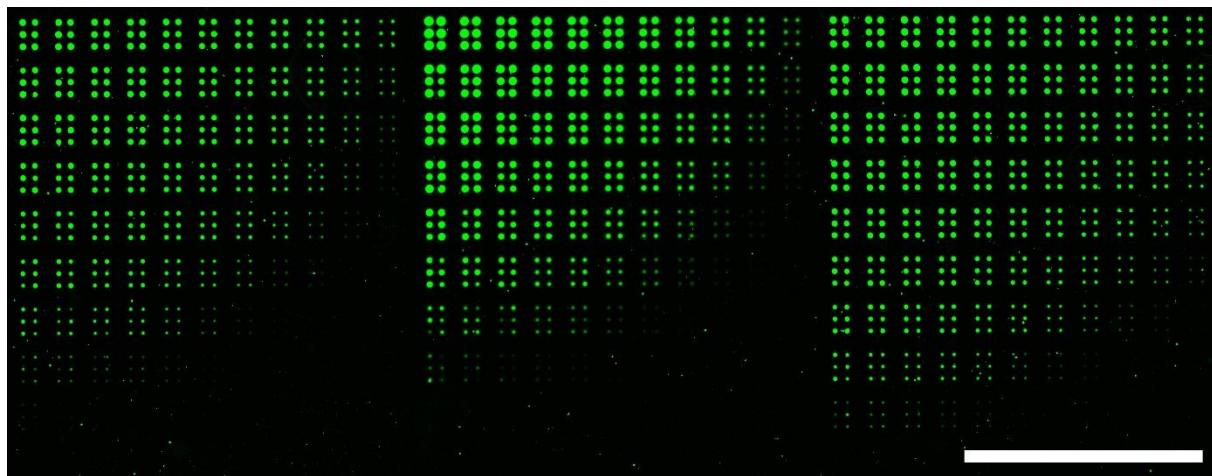
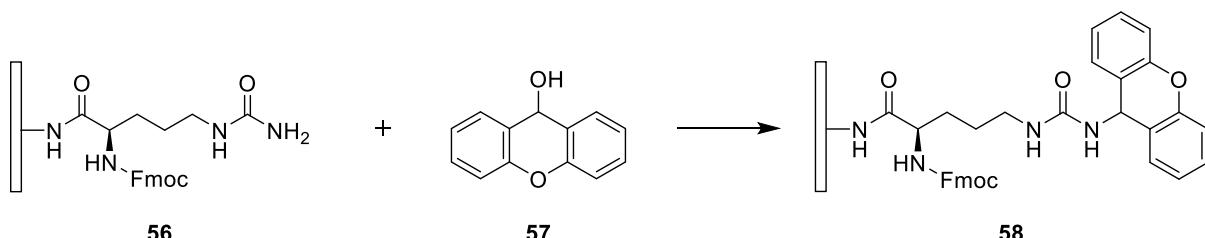


Abbildung 10: Ausschnitt des Fluoreszenzscan der Optimierung von Citrullin, Homocitrullin und Acetyllysin (von links nach rechts) aus der vorangegangenen Masterarbeit^[169]. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm. PMT: 1,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm

Diese optimierten, posttranslationalen Aminosäuren sollen in dieser Arbeit ebenfalls in biologischen Anwendung verwendet werden. Dafür sollen, sofern möglich, die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren über fluoreszierende Kupplungsreaktionen verifiziert werden. Eine mögliche Form des Nachweises von Harnstoffderivaten ermöglicht die Reaktion dieser mit Xanthydrol (9H-xanthen-9-ol).

Xanthydrol reagiert allgemein unter anderem mit Harnstoffderivaten, Indolen, Phenolen und diversen primären Amiden^[171]. Somit soll getestet werden, ob es als spezifischer Nachweis der Seitenketten von Citrullin und Homocitrullin geeignet ist. Ein Beispiel der Reaktion von oberflächengebundenem Fmoc-Citrullin (**56**) mit Xanthydrol (**57**) zu **58** ist in Schema 9 dargestellt.



Schema 9: Reaktion von oberflächengebundenem Fmoc-Citrullin (**56**) mit Xanthydrol (**57**) zu Konjugat **58**

Für die Reaktion der Seitenketten von Citrullin und Homocitrullin mit Xanthydrol wurde zunächst ein laserbasierter Transfer mit anschließender Kupplung von Fmoc-Cit-OPfp und Fmoc-HCit-OPfp durchgeführt. Nach erfolgter Acetylierung wurde eine Inkubation mit einer 200 mM Xanthydrol Reaktionslösung durchgeführt.

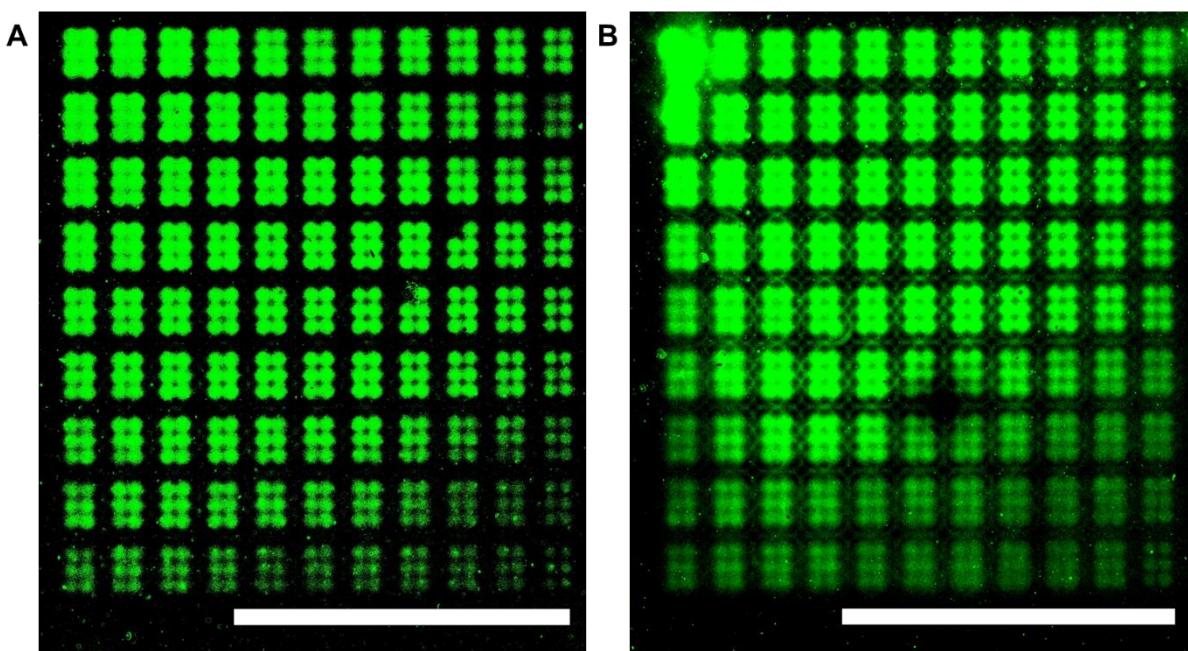


Abbildung 11: Fluoreszenzscan der Xanthydrol Reaktion an Citrullin (A) und Homocitrullin (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm. PMT: 6,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Die Auswertung des Fluoreszenzscans (Abbildung 11) zeigt eine eindeutige Fluoreszenzemission von 2.000 a.u. und somit einen erfolgreiche fluoreszierende Verifizierung der Seitenketten von Citrullin (A) und Homocitrullin (B). Die leicht verschwommenen Spots sind auf die Auflage der Donoroberfläche auf die Syntheseoberfläche beim Lasertransfer zurückzuführen. Hierbei könnte eine Verunreinigung in Form von Staubpartikeln zwischen die Auflageflächen gekommen sein, wodurch Donor- und Akzeptoroberflächen nicht mehr optimal auflagen und der Transfer leicht beeinträchtigt wurde.

Da generell der selektive Nachweis für die Seitenketten von Citrullin und Homocitrullin durch Xanthydrol getestet werden soll, wurde ebenfalls ein weiterer Versuch mit Serin und Cystein durchgeführt. Da Xanthydrol nicht nur mit Harnstoffderivaten, sondern allgemein mit Nukleophilen reagiert, soll die Thiolgruppe von Cystein, sowie die Hydroxylgruppe von Serin als Test zur Selektivität dienen. Hierfür wurde ein laserbasierter Transfer von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp und Fmoc-Ser(tBu)-OPfp, sowie eine Kupplung an die Syntheseoberfläche durchgeführt. Nach erfolgter Acetylierung wurde eine Entschützung der Seitenkettenschutzgruppen mit einer Lösung aus Trifluoressigsäure (TFA) und Triisopropylsilan (TIPS) in Dichlormethan (DCM) durchgeführt.

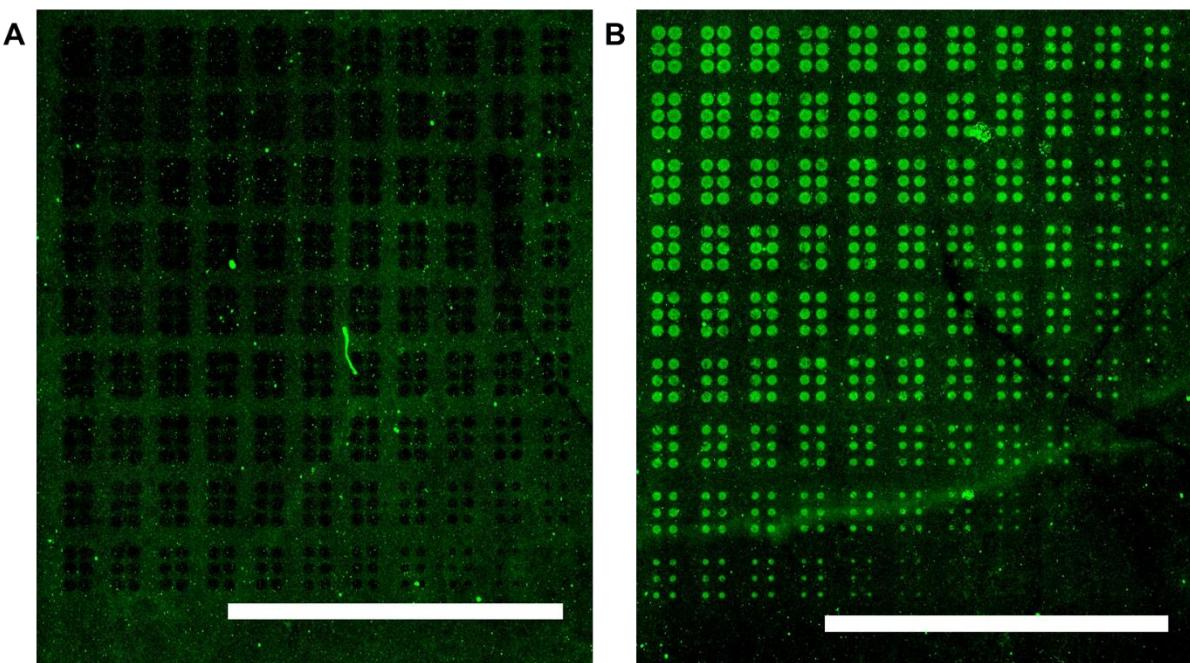


Abbildung 12: Fluoreszenzscan der Xanthydrol Reaktion an Serin (A) und Cystein (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 6,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

Anhand des Fluoreszenzscans ist ein erfolgreicher Nachweis der Thiolgruppe des Cysteins (Abbildung 12B) zu erkennen. Die Fluoreszenzemission beträgt 1.500 a.u. und ist somit in einem ähnlichen Bereich zu der Reaktion der Citrullin und Homocitrullin Seitenketten. Die Reaktion an der Hydroxylgruppe des Serins (Abbildung 12A), zeigt keine sichtbaren Intensitäten. Insgesamt kann somit von keiner spezifischen Nachweisreaktion von Xanthydrol an den Seitenketten von Citrullin und Homocitrullin ausgegangen werden, da Xanthydrol ebenfalls eine Reaktion mit der nukleophilen Thiolgruppe des Cysteins eingeht. Allerdings konnte durch die Anknüpfung des Xanthydrols eine generelle Verifizierung einer fluoreszierenden Kupplung nachgewiesen werden.

Eine fluoreszenzbasierte Verifizierung der Seitenkette von Acetyllysin wurde in dieser Arbeit nicht erbracht, da ein spezifischer chemischer Nachweis aufgrund der weiteren Amidbindungen im Peptid für Acetamide zu komplex ist. Alternativ könnte ein spezifischer Nachweis ebenso über ein Anti-Acetyllysin Antikörper erfolgen. Diese spezifischen Antikörper wurden allerdings zwecks den hohen Kosten nicht erworben und für einen Nachweis nicht in Betracht gezogen. Allerdings wurde als zusätzliche analytische Nachweismethode die Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) mit der Flugzeitanalyse (engl. *time of flight*, TOF) zur Massenspektrometrie verwendet. Über MALDI-TOF soll der laserbasierte Transfer der Aminosäuren nachgewiesen, sowie einen Zerfall oder Abspaltung und mögliche Nebenreaktionen ausgeschlossen werden. Hierfür wurden Fmoc-Cit-OPfp, Fmoc-HCit-OPfp und Fmoc-Lys(Ac)-OPfp auf eine Glasoberfläche lasertransferiert (Tabelle 23, Anhang S.180). In einer zweiten Schicht wurde die MALDI-Matrix, 2,5-Dihydroxybenzoësäure, über die Aminosäuren transferiert. Ebenso wurde für jede Aminosäure eine Referenz auf eine Glasoberfläche gespottet und massenspektrometrisch vermessen. Die hierbei detektierten Massen des laserbasierten Transfers entsprachen den Massen der Referenz: m/z (Cit) = [M+Na]⁺ : 585,7; m/z (HCit) = [M+Na]⁺ : 599,9; m/z (Lys(Ac)) = [M+Na]⁺ : 597,7.

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Hydroxyprolin

Hydroxyprolin (Hyp) ist ein wichtiger Bestandteil der Synthese und Stabilität von Kollagen und liegt in zwei Isomeren, *trans*-4-Hydroxy-L-prolin und *trans*-3-Hydroxy-L-prolin, vor^[172-173]. Einige Kollagenmodifikationen stehen pathologisch mit erblichen Krankheiten wie dem Ehlers-Danlos-Syndrom (Bindegewebserkrankung), der Epidermolysis bullosa (Hauterkrankung) und der Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit) sowie nicht-erblichen Krankheiten wie Skorbut, Diabetes und Arthritis in Verbindung^[174-179]. Daher könnte die Verwendung von Hydroxyprolin als Biomarker wichtige Informationen zur biomedizinischen Forschung beitragen und soll deshalb ebenfalls für die Verwendung in Peptidarrays nachgewiesen und optimiert werden. Für dieses Vorhaben wurde zunächst ein laserbasierter Transfer, sowie Kupplung von Fmoc-Hyp(tBu)-OH an eine Syntheseoberfläche vorgenommen. Nach erfolgter Acetylierung und erneuter Fmoc-Entschützung wurde eine Kupplung eines Aminohexansäure(Ahx)-Spacers vorgenommen, um eine mögliche sterische Hinderung zu umgehen. Anschließend wurde eine Seitenkettenentschützung, Fmoc-Entschützung, sowie eine TAMRA-NHS Inkubation zur Visualisierung des N-Terminus vorgenommen.

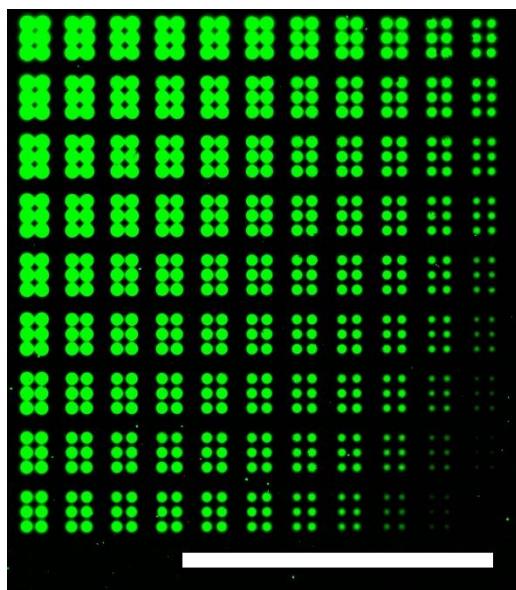


Abbildung 13: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an Hydroxyprolin. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm. PMT: 0,60. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.

Die Auswertung des Fluoreszenzscans mit einer maximalen Fluoreszenzemission von 35.000-40.000 a.u. zeigt einen erfolgreichen Transfer, sowie Anknüpfung an die Syntheseoberfläche von Hydroxyprolin. Zusätzlich zur Fluorophor-Anknüpfung an den N-Terminus, sollte ebenfalls ein Nachweis der Hydroxylseitenkette erfolgen. Hierzu wurde zunächst ein laserbasierter Transfer von Fmoc-Hyp(tBu)-OH, sowie eine Kupplung an die Syntheseoberfläche durchgeführt. Nach einer Acetylierung über Nacht, sowie nachfolgender Seitenkettenentschützung wurde die Hydroxylgruppe der Seitenkette mit TAMRA-NHS visualisiert.

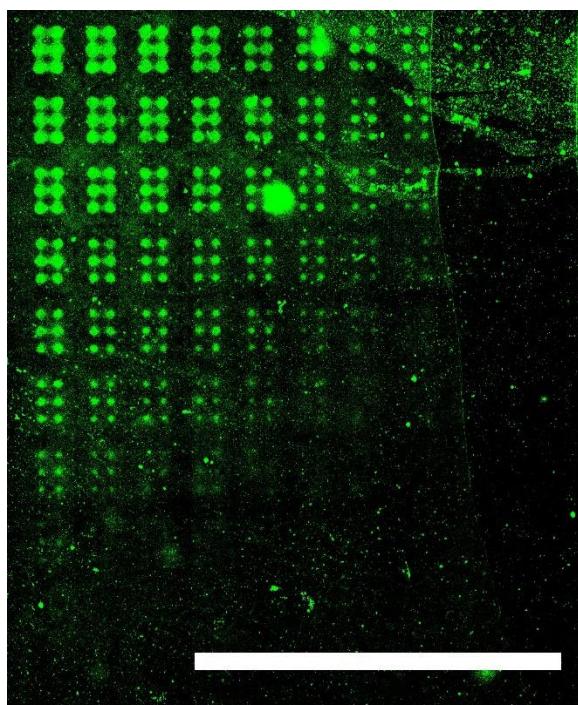


Abbildung 14: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an der Seitenkette von Hydroxyprolin. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 7,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

Der Fluoreszenzscan in Abbildung 14 zeigt eine erfolgreiche Anknüpfung des TAMRA-NHS Fluorophors an die Hydroxyprolin Seitenkette. Die Fluoreszenzemission fällt mit einem Maximum von 2.500-3.000 a.u. deutlich geringer aus, als die Anknüpfung an den N-Terminus. Diese Gegebenheit liegt zum einen an der deutlich höheren Selektivität des NHS-Esters für die Aminogruppe. NHS-Ester können ebenfalls mit anderen Nukleophilen, wie die verwendete Hydroxylgruppe, aber auch Thiolgruppen reagieren^[180]. Die daraus resultierenden Ester (bzw. Thioester) sind allerdings deutlich instabiler, wodurch vermutlich ebenfalls die Fluoreszenzemission in diesem Experiment niedriger ausfällt. Ein weiterer Grund für die stärkere Fluoreszenzemission in Abbildung 13 könnte die simultane Anknüpfung des

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

TAMRA-NHS Esters an die Amino- und Hydroxylgruppe sein. Ebenfalls könnte die Kupplung des Ahx-Spacers zu einer stärkeren Intensität beigetragen haben, da dadurch die sterische Hinderung der Aminogruppe deutlich geringer ist, als die der Hydroxylgruppe.

Für einen weiteren analytischen Nachweis wurde ebenfalls eine Detektion über MALDI-TOF durchgeführt. Hierfür wurde Fmoc-Hyp(tBu)-OH auf eine Glasoberfläche lasertransferiert (Tabelle 23, Anhang S.180). In einer zweiten Schicht wurde die MALDI-Matrix, 2,5-Dihydroxybenzoësäure, über die Aminosäuren transferiert. Ebenso wurde eine Referenz für Hydroxyprolin auf eine Glasoberfläche gespottet und massenspektrometrisch vermessen. Die hierbei detektierten Massen des laserbasierten Transfers entsprachen den Massen der Referenz: m/z (Hyp) = [M+Na]⁺ : 431,3.

Phosphoserin/-threonin/-tyrosin

Die posttranslational phosphorylierten Aminosäuren Phosphoserin (pSer), -threonin (pThr) und -tyrosin (pTyr) spielen potenziell eine wichtige Rolle bei verschiedenen Krankheiten, wie Krebs^[181] und neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer^[182] oder Parkinson^[183]. Somit besteht ein besonderes Interesse diese Aminosäuren für biologische Anwendungen und Studien in bspw. Peptidarrays verwenden zu können. Für dieses Vorhaben soll für die Aminosäuren Fmoc-Ser(PO(OBzl))-OH, Fmoc-Thr(PO(OBzl))-OH und Fmoc-Tyr(PO(OBzl))-OH ein laserbasierter Transfer, sowie eine anschließende Kupplung an eine Syntheseoberfläche erfolgen. Nach der Durchführung einer Acetylierung und Fmoc-Entschützung wurde eine TAMRA-NHS Inkubation der Aminogruppen vorgenommen. Als Positivkontrollen wurde Fmoc-Gly-OPfp und Fmoc-Gly-OH verwendet. Die Verwendung dieser Kontrollaminosäuren soll zum einen als eine Referenz zur Fluoreszenzemission dienen. Zum anderen soll durch die Aktivierung von Fmoc-Gly-OH mit N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) eine fehlerhafte Aktivierung der phosphorylierten Aminosäuren ausgeschlossen werden. Allerdings konnte keine Fluoreszenzemission bei den phosphorylierten Aminosäuren detektiert werden. Daher wurde in einem zweiten Experiment der Transfer der Aminosäuren, sowie der Kontrolle wiederholt. Zusätzlich wurde nach der Acetylierung und Fmoc-Entschützung ein Aminohexansäure(Ahx)-Spacers angeknüpft, um eine mögliche sterische Hinderung

der Aminogruppen zu vermeiden. Abschließend wurde eine Seitenkettenentschützung, Fmoc-Entschützung, sowie TAMRA-NHS Inkubation durchgeführt. Auch bei dieser Variante des Transfers konnte keine Fluoreszenzemission der phosphorylierten Aminosäuren detektiert werden.

Als weitere Möglichkeit wurde eine Variation des Matrixpolymers in Betracht gezogen. Hierfür wurde bereits durch Hannah Altenbach in ihrer Masterarbeit eine Optimierung des Transfers der proteinogenen Aminosäuren auf verschiedene Polymere durchgeführt^[184]. Dabei wurden die Polymere Polybenzylmethacrylat (PBMA), FB1518 (Dianal1518), Polycaprolactondiol, Polyvinylpyrrolidone (PVP10), Polystyrol und FINE-TONE® T-382ES (FTES) untersucht, wobei sich FB1518 und FTES als geeignete Alternativen zu SLEC erwiesen. Diese zwei Polymere wurden alternativ zu SLEC in gleicher Konzentration zur Beschichtung der Donoroberflächen verwendet. Für den laserbasierten Transfer wurden alle phosphorylierten Aminosäuren in den verschiedenen Polymeren SLEC, FB1518 und FTES übertragen. Zudem wurde ein mehrfacher (vierfach) laserbasierter Transfer, sowie Kupplung der Aminosäuren vorgenommen, um die Konzentration der Aminosäure innerhalb eines Spots zu erhöhen. Zusätzlich wurden erneut dieselben Positivkontrollen transferiert. Nach der Acetylierung und Fmoc-Entschützung wurde die Anknüpfung eines Ahx-Spacers vorgenommen, um eine mögliche sterische Hinderung der Aminogruppen zu vermeiden. Abschließend wurde eine Seitenkettenentschützung, Fmoc-Entschützung, sowie eine TAMRA-NHS Inkubation durchgeführt. Jedoch konnte auch in dieser Variante keine Fluoreszenzemission detektiert werden. Daher soll ein Transfer außerhalb der Fokusebene des Lasers vorgenommen werden, wodurch die eingetragene Energie auf der Oberfläche abnimmt. Für dieses Experiment wurde somit ein laserbasierter Transfer mit anschließender Kupplung der phosphorylierten Aminosäuren, sowie den Positivkontrollen 10,0 mm außerhalb der Fokusebene vorgenommen. Zusätzlich wurde auch hier eine vierfache Wiederholung des Transfers und der Kupplung vorgenommen. Außerdem wurden alle Aminosäuren erneut in den verschiedenen Polymeren SLEC, FB1518 und FTES transferiert. Nach der Acetylierung und Fmoc-Entschützung erfolgte die Anknüpfung eines Ahx-Spacers, um eine mögliche sterische Hinderung der Aminogruppen zu vermeiden. Abschließend wurde eine Seitenkettenentschützung, Fmoc-Entschützung, sowie eine TAMRA-NHS Inkubation durchgeführt. Allerdings konnte auch durch diese Variationen keine Fluoreszenzemission der phosphorylierten Aminosäuren detektiert werden.

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Aufgrund der vorangegangenen Transferversuche liegt die Vermutung nahe, dass die phosphorylierten Aminosäuren entweder bei dem Transferprozess selbst beschädigt werden oder keine Kupplung der Aminosäure an die Oberfläche möglich ist. Um auszuschließen, dass die Aminosäuren beschädigt sind, wurde eine Kupplung aus Lösung von Phosphoserin ohne laserbasierten Transfer vorgenommen. Hierfür wurde eine Kupplung von Fmoc-Ser(PO(OBzl))-OH mit DIC in DMF an eine Syntheseoberfläche vorgenommen. Anschließend wurde eine Fmoc-Entschützung, sowie eine TAMRA-NHS Inkubation vorgenommen. In einem zweiten Versuch wurde die Kupplung und Fmoc-Entschützung analog durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Fmoc-Ahx-Spacer angeknüpft, erneut die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und eine TAMRA-NHS Inkubation durchgeführt. Als dritte und vierte Variante wurden die ersten beiden Ansätze wiederholt, jedoch wurde bei der Anknüpfung des Phosphoserins eine katalytische Menge von 0,40 Äq. DIPEA hinzugefügt, wodurch eine bessere Stabilität und Reaktivität erzeugt werden sollte^[185]. Außerdem wurde bei jeder Fmoc-Entschützung eine Beladungsmessung durchgeführt, um die Menge der angeknüpften Aminosäure zu quantifizieren.

Tabelle 1: Beladungsmessungen (Extinktion) der Fmoc-Entschützungen der Syntheoberflächen, sowie nach der Kupplung aus Lösung von Phosphoserin und ggf. eines Ahx-Spacers

	Variante 1 (Standard)	Variante 2 (Ahx)	Variante 3 (DIPEA)	Variante 4 (DIPEA + Ahx)
Oberfläche	0,104	0,131	0,123	0,100
Nach pSer	0,198	0,203	0,101	0,104
Nach Ahx	-	0,040	-	0,217

Anhand der Beladungsmessungen können keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden. Die Extinktion der Oberflächen nach der ersten Fmoc-Entschützung liefert bei allen vier Varianten ähnliche Ergebnisse im Bereich von ca. 0,10-0,13. Nach der Anknüpfung des Phosphoserins werden bei Variante 1 und 2 deutlich höhere Extinktionen von 0,198 und 0,203 gemessen. Die Variante 3 zeigt mit 0,101 einen leicht niedrigeren Wert, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Anknüpfung des pSer mit 82,3 % zur ursprünglichen Beladung erfolgreich war. Variante 4 zeigt mit 0,104 einen fast identischen Wert zur vorherigen Beladungsmessung und liegt mit 104 % bei einer optimalen Beladung. Der leicht erhöhte Wert kann Messungenauigkeiten zugrunde liegen, da der Messbereich

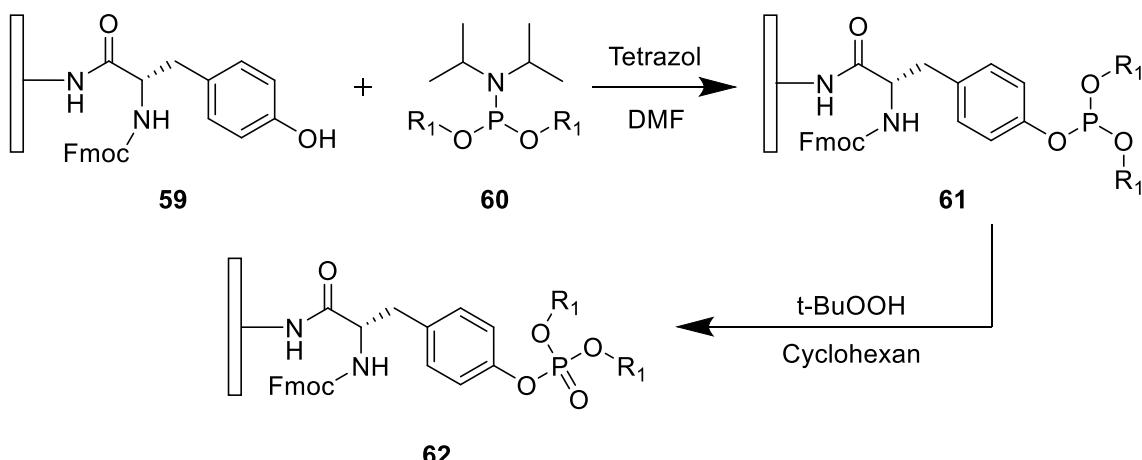
begrenzt ist und durch die geringe Oberflächengröße nur wenig Moleküle in der Entschützungslösung vorliegen. Den Varianten 2 und 4 erfolgte eine Ahx-Spacer Anknüpfung. Variante 2 besitzt nach der letzten Entschützung mit 0,40 einen deutlich niedrigeren Extinktionswert von 30,5 % der ursprünglichen Beladung. Hier könnte die Anknüpfung des Spacers nicht optimal verlaufen sein. Nach der TAMRA-NHS Inkubation konnte auch nahezu keine Fluoreszenzemission detektiert werden. Ebenso konnten bei den Varianten 1 und 3 keine ausreichende Fluoreszenzemission detektiert werden. Bei allen drei Varianten lag die Emission bei ca. 1.000 a.u.. Im Vergleich zu einer durchgeführten TAMRA-NHS Inkubation von gekuppeltem Fmoc-Gly-OH mit einer Emission von ca. 30.000-40.000 a.u., liegen die ersten drei Varianten bei 2,50-3,30 % der Referenzreaktion. Variante 4 zeigte nach der Entschützung des Ahx-Spacer eine Extinktion von 0,217. Dieser Wert entspricht 217 % der ursprünglichen Beladung. Allerdings musste hier mit einer frisch angesetzten Entschützungslösung der Nullwert bestimmt werden, wodurch massive Abweichungen entstehen können. Daher können hier keine genauen Aussagen getroffen werden und es wurde hauptsächlich die Fluoreszenzemission nach der TAMRA-NHS Inkubation betrachtet. Diese betrug ca. 10.000-15.000 a.u. und liegt somit ca. zwischen 25,0-42,8 % der Referenzreaktion. Somit ist Variante 4 mit der katalytischen Menge DIPEA, sowie der Ahx Anknüpfung die einzige Methode, die in Betracht gezogen werden konnte, um eine laserunterstützen Versuch durchzuführen. Hierfür wurden zwei verschiedene Varianten getestet: Die erste Variante besteht aus der Addition von 0,40 Äq. DIPEA zu der Beschichtungslösung des Donors der phosphorylierten Aminosäure. Die zweite Variante besteht aus der Herstellung eines separaten DIPEA Donors und dessen Übertrag auf die zuvor transferierte Aminosäure. Nach dem laserbasierten Transfer und der Kupplung wurde eine Acetylierung und erneute Fmoc-Entschützung durchgeführt. Nach der Anknüpfung eines Ahx-Spacer wurde eine Seitenkettenentschützung, eine Fmoc-Entschützung, sowie eine TAMRA-NHS Inkubation durchgeführt. Dieser Versuch wurde mit einem einfachen Transfer, anschließender Kupplung, sowie einem vierfachen Transfer und vierfacher Kupplung ausgeführt. Allerdings konnte auch hier bei jeglicher Variante des Experiments keine Fluoreszenzemission detektiert werden.

Da bei der Kupplung aus Lösung von Phosphoserin eine Kupplung, sowie Fluoreszenzemission nachgewiesen werden konnte, wurde eine MALDI Messung zum massenspektrometrischen Nachweis nach dem laserbasierten Transfer

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

vorgenommen. Hierfür wurden Fmoc-Ser(PO(OBzl))-OH, Fmoc-Thr(PO(OBzl))-OH und Fmoc-Tyr(PO(OBzl))-OH auf eine Glasoberfläche lasertransferiert (Tabelle 23, Anhang S.180). In einer zweiten Schicht wurde die MALDI-Matrix, 2,5-Dihydroxybenzoësäure, über die Aminosäuren transferiert. Ebenso wurde jeweils eine Referenz auf eine Glasoberfläche gespottet und massenspektrometrisch vermessen. Hierbei konnten lediglich die Massen der Referenzen detektiert werden: m/z (pSer) = 497,2; m/z (pThr) = 511,6; m/z (pTyr) = [M+H]⁺ : 574,6. Daher konnte zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen werden, dass die phosphorylierten Aminosäuren beim Transfer beschädigt werden und ggf. zerfallen. Hierfür könnte gegebenenfalls eine HPLC Messung der transferierten Aminosäuren durchgeführt werden, um diese These zu bestätigen. Die Messungen wurden wiederholt, wobei die Massen der Referenzen, sowie der zu untersuchenden Aminosäuren detektiert werden konnten. Die hierbei detektierten Massen des laserbasierten Transfers entsprachen den Massen der Referenz: m/z (pSer) = [M+Na]⁺ : 519,6; m/z (pThr) = [M+Na]⁺ : 533,6; m/z (pTyr) = [M+Na]⁺ : 593,6.

Allerdings konnte bei dem Transfer auf eine Syntheseoberfläche mit nachfolgender Kupplung und TAMRA-NHS Inkubation erneut keine Fluoreszenzintensität detektiert werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Kupplung der Aminosäuren an die Oberfläche nicht stattfindet. Somit wurde an einer Alternativlösung gearbeitet, um phosphorylierte Aminosäure in Peptidarrays einzubringen. Hierfür sollen die Aminosäuren Fmoc-Ser(*t*Bu)-OPfp, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OPfp und Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OPfp regulär in Peptidarrays eingebaut werden und nach der abgeschlossenen Synthese phosphoryliert werden. Die Reaktion sollte zunächst exemplarisch an Tyrosin erfolgen und mit einem spezifischen Phosphotyrosin Antikörper nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung besteht hierbei aus zwei Reaktionsschritten, der Phosphinylierung und einer anschließenden Oxidation^[186-187]. Für den ersten Reaktionsschritt wird oberflächengebundenes Tyrosin (**59**) mit einem Phosphoramidit (**60**) und Tetrazol in DMF umgesetzt und phosphinyliertes Tyrosin (**61**) erhalten. Anschließend erfolgt eine Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid in Cyclohexan, wodurch phosphoryliertes Tyrosin (**62**) erhalten wird (Schema 10).



Schema 10: Phosphorylierung von oberflächengebundenem Fmoc-Tyrosin (**59**) durch Phosphinylierung mit einem Phosphoramidit (**60**) zu phosphiniertem Fmoc-Tyrosin (**61**) und Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid zu oberflächengebundenem Fmoc-Phosphotyrosin (**62**)

Für die Phosphinylierung sollen verschiedene Phosphoramidite eingesetzt werden, um den Einfluss der Schutzgruppen auf die Stabilität zu testen und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Reaktion zu erhöhen. Die Reagenzien, die zur Reaktion verwendet wurden, sind Di-*tert*-Butyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (*t*Bu-PhAm) (**63**), Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (Bz-PhAm) (**64**), Bis[2-(trimethylsilyl)ethyl]-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (TMS-PhAm) (**65**). Phosphoramidit *t*Bu-PhAm und Bz-PhAm wurden für diesen Versuch kommerziell erworben, wohingegen das Phosphoramidit TMS-PhAm synthetisiert wurde.

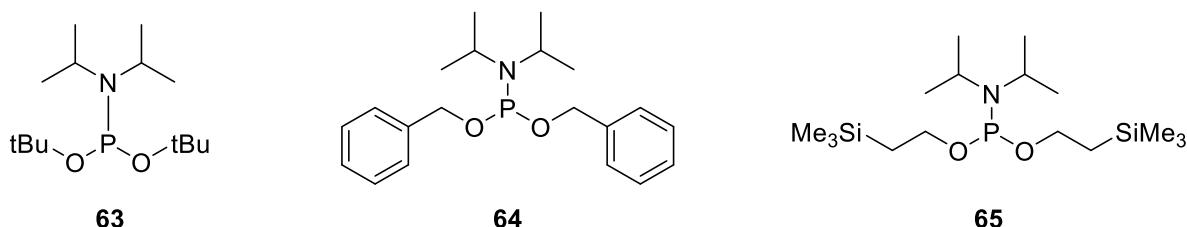
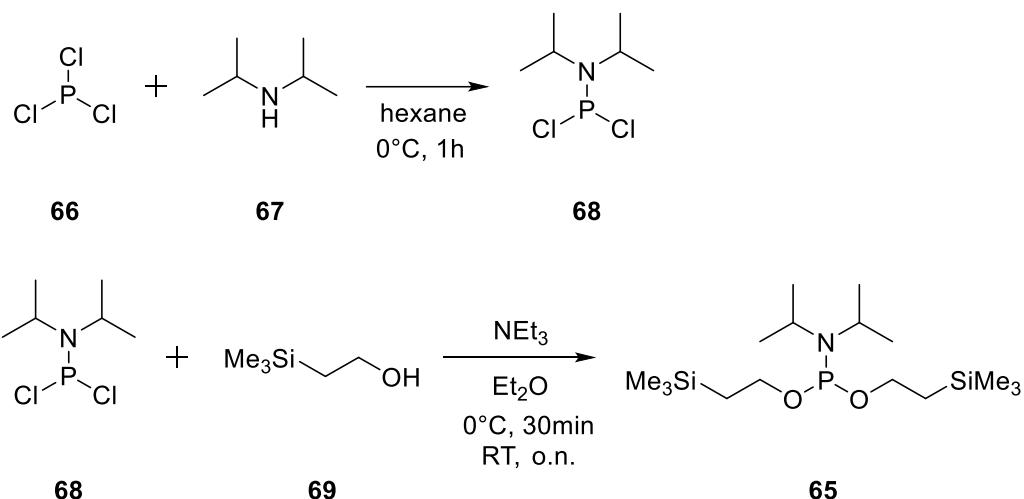


Abbildung 15: Strukturformeln von Di-*tert*-Butyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (*t*Bu-PhAm) (**63**), Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (Bz-PhAm) (**64**), Bis[2-(trimethylsilyl)ethyl]-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (TMS-PhAm) (**65**)

Zur Synthese des TMS-PhAm wurde Phosphortrichlorid (**66**) mit Diisopropylamid (**67**) in Hexan umgesetzt und nach erfolgter Destillation 78 % *N,N*-Diisopropylaminodichlorophosphin (**68**) erhalten. Im Anschluss wurde das zuvor erhaltene Phosphin mit (Trimethylsilyl)ethanol (**69**) und Triethylamin in Diethylether umgesetzt. Nach erfolgter Destillation wurde 74 % des TMS-PhAm (**65**) erhalten (Schema 11).

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren



Schema 11: Synthese von Bis[2-(trimethylsilyl)ethyl] N,N-diisopropylphosphoramidit (**65**)

Zur Phosphorylierung von oberflächengebundenem Tyrosin wurde zunächst ein laserbasierter Transfer von Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OPfp, sowie eine Kupplung an eine Syntheseoberfläche vorgenommen. Nach der Acetylierung wurde eine Seitenkettenentschützung durchgeführt. Die freigelegten Hydroxylgruppen wurden mit drei verschiedenen Phosphoamiditen (*t*Bu-PhAm, Bz-PhAm, TMS-PhAm) phosphoryliert und anschließend oxidiert. Nach der Phosphorylierung wurde erneut eine Seitenkettenentschützung durchgeführt. Abschließend wurde eine Inkubation mit einem gelabelten Phosphotyrosin Antikörper (Anti-pTyr-AF647) durchgeführt.

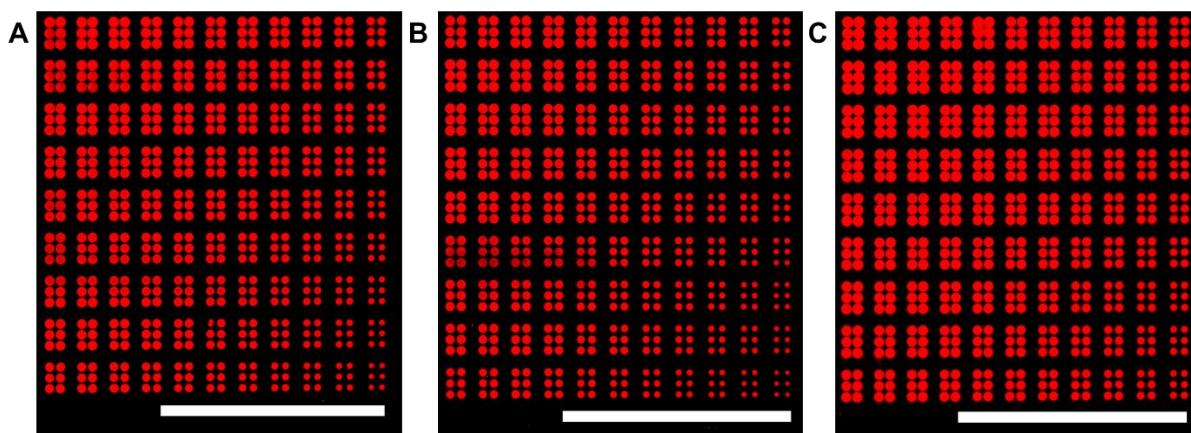


Abbildung 16: Fluoreszenzscan der Anti-pTyr-AF647 Inkubation an phosphoryliertem Tyrosin. Phosphorylierung mit A) *t*Bu-PhAm. B) Bz-PhAm. C) TMS-PhAm. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: $677 \text{ nm} \pm 22,5 \text{ nm}$. PMT: 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Die Auswertung der Fluoreszenzscans in Abbildung 16 zeigt eine erfolgreiche Phosphorylierung durch alle drei Phosphoamidite von Phosphotyrosin. Die detektierten Fluoreszenzemissionen aller drei Varianten befinden sich in einem ähnlichen Bereich von 25.000-30.000 a.u.. Somit wurde eine geeignete Alternative zur Implementierung von Phosphoaminoäure in Peptidarrays gefunden. Ebenfalls wurde durch die Detektion mit einem Phosphotyrosin Antikörper ein spezifischer Nachweis der phosphorylierten Seitenketten erbracht. Eine entsprechende Reaktion von Phosphoserin und Phosphothreonin wurde im Rahmen dieser Arbeit aus Zeit und Kostengründen der Antikörper nicht durchgeführt. Die Reaktion sollte jedoch analog an den Hydroxylgruppen von Serin und Threonin erfolgen können.

Insgesamt konnten somit Citrullin, Homocitrullin, Acetyllysin, Hydroxyprolin, sowie die phosphorylierte Variante von Tyrosin (sowie Serin und Threonin) für eine Verwendung in Peptidarrays nachgewiesen und in zukünftigen Experimenten verwendet werden.

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

4.1.2 Modifizierte Aminosäuren

Zusätzlich zu posttranslational modifizierten Aminosäuren, sollten ebenfalls verschiedene weitere modifizierte Aminosäuren übertragen werden. Dabei sollten zum einen beispielhaft für D-Aminosäuren, D-Asparaginsäure (**76**), D-Cystein (**77**) und D-Prolin (**78**) übertragen werden. Des Weiteren sollen Aminosäuren mit diversen Modifikationen (Aminobutylglycin (Abg, **74**), Trimethoxybenzylglycin (**75**), Asparginsäure-4-Allylester (Asp-ae, **73**)) getestet werden. Für die weitere Verwendung zur Chemodetektion sollten die Aminosäuren Allysinethylenacetal (Aea, **70**), Propargylglycin (Pra, **72**) und Azidolysin (Lys(N₃), **71**) übertragen werden.

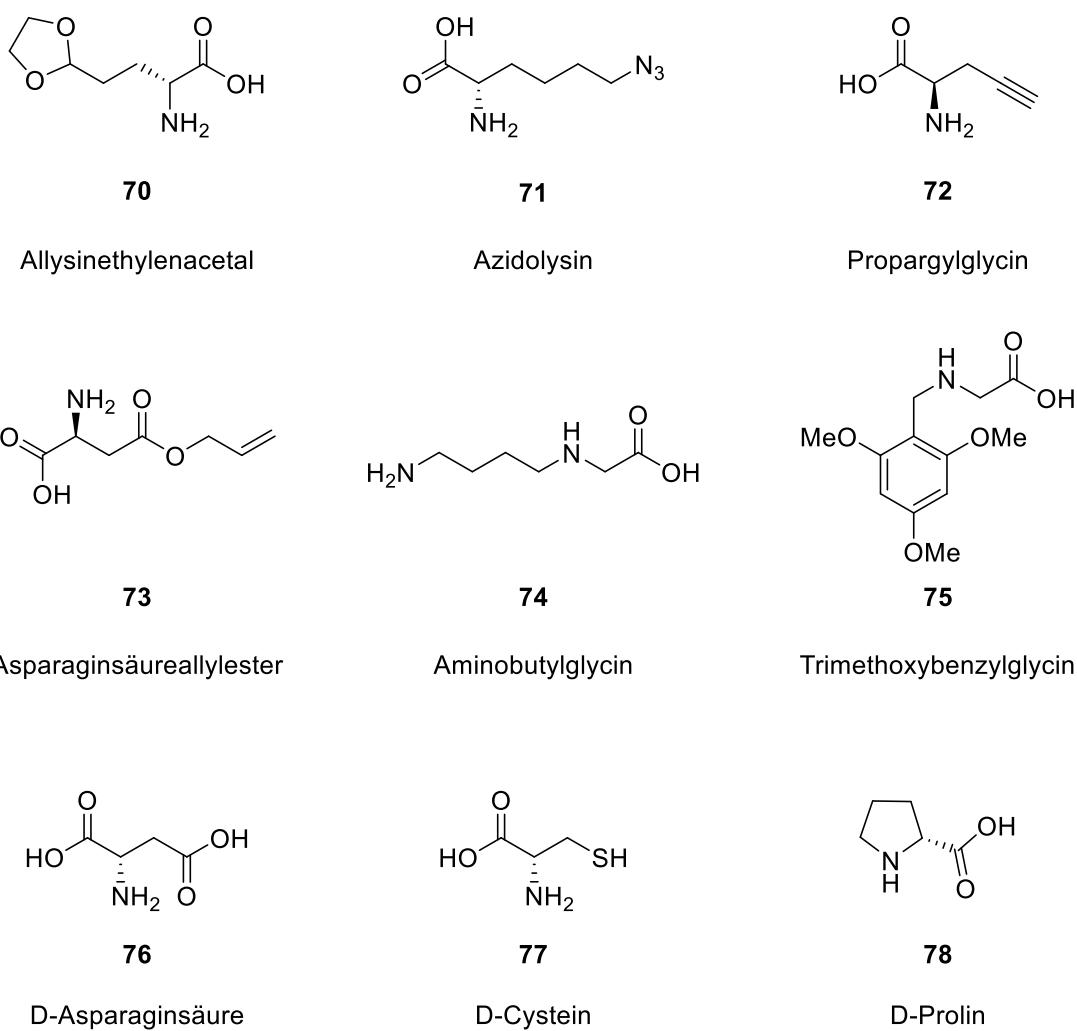


Abbildung 17: Alle in dieser Arbeit verwendeten weiteren modifizierten Aminosäuren

Hierfür wurde zunächst ein laserbasierter Transfer, sowie Kupplung von Fmoc-Abg(Boc)-OH, Fmoc-Aea-OH, Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-D-Cys-OH*H₂O, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Tmb-OH und Fmoc-Asp-4-Allylester an eine Syntheseoberfläche vorgenommen. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls Fmoc-Gly-OH

transferiert und gekuppelt. Nach erfolgter Acetylierung und erneuter Fmoc-Entschützung wurde eine Kupplung eines Aminohexansäure(Ahx)-Spacers vorgenommen, um eine mögliche sterische Hinderung zu umgehen. Nach erneuter Fmoc-Entschützung, sowie Seitenkettenentschützung wurde eine TAMRA-NHS Inkubation zur Visualisierung der *N*-Termini vorgenommen.

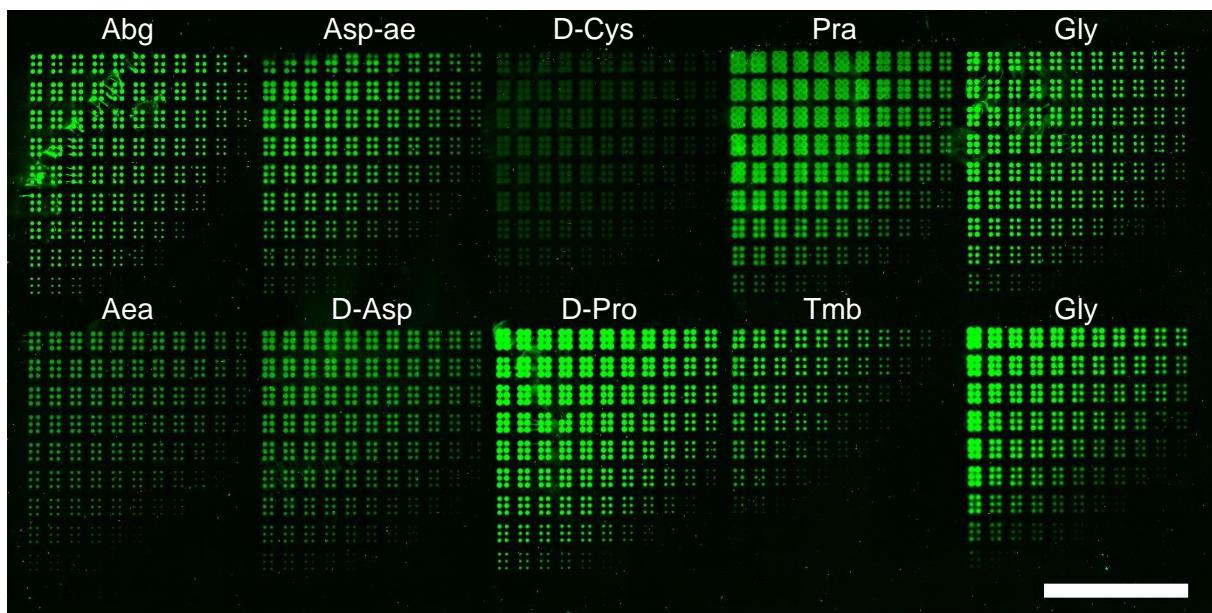


Abbildung 18: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an modifizierten Aminosäuren. Oben (von rechts nach links): Abg, Asp-ae, D-Cys, Pra, Gly. Unten (von links nach rechts): Aea, D-Asp, D-Pro, Tmb, Gly. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm. PMT: 1,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.

Anhand des Fluoreszenzscans (Abbildung 18) kann ein erfolgreicher Transfer und Kupplung aller getesteten modifizierten Aminosäuren gezeigt werden. Im Allgemein kann hierbei die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission und des Spotdurchmessers der verschiedenen Aminosäuren von der Laserpower und Laserzeit betrachtet werden. Die Fluoreszenzemission ist bei den Aminosäuren Asp-ae, Aea, D-Asp, Pra und Tmb mit einer Intensität von ca. 10.000-15.000 a.u. in einem sehr ähnlichen Bereich. Ebenfalls zeigen die Aminosäuren Abg, D-Pro, sowie die Referenzen Gly-OH eine ähnliche Fluoreszenzemission von 25.000-30.000 a.u.. Auffällig ist besonders D-Cystein, da hier die Intensität von ca. 2.000 a.u. deutlich unter dem Wert der anderen Aminosäuren liegt. Diese Gegebenheit könnte einerseits an der Konzentration der Aminosäure in der Beschichtungslösung liegen. Andererseits könnte ebenfalls das Kupplungsverhalten von D-Cys sich von den anderen Aminosäuren unterscheiden. Hierfür könnte möglicherweise eine Doppelkupplung die

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Konzentration von D-Cys innerhalb der Spots erhöhen. Jedoch wird D-Cys nicht in weiteren Versuchen dieser Arbeit verwendet, wodurch ein Nachweis des Transfers ohne Optimierung für den Beweis des Prinzips ausreichend ist. Propargylglycin zeigt ebenfalls eine Auffälligkeit beim laserbasierten Übertrag auf die Syntheseoberfläche, welche in Form von ringähnlichen Strukturen bei höheren Transferparametern erkenntlich wird. Eine mögliche Begründung könnte die Ausdehnung der Polyimidfolie beim Transfer sein, sowie die Eigenschaften der Aminosäure. Dieser Effekt konnte ebenfalls bei hohen Laserparametern von anderen eingesetzten Stoffen beobachtet werden und kann durch die Anpassung auf niedrigere Parameter ausgeglichen werden. Zusätzlich zu dem fluoreszenzbasierten Nachweis wurde ebenfalls eine Detektion über MALDI-TOF durchgeführt. Hierfür wurden die Aminosäuren Fmoc-Abg(Boc)-OH, Fmoc-Aea-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Tmb-OH und Fmoc-Asp-4-Allylester auf eine Glasoberfläche lasertransferiert (Tabelle 23, Anhang S.180). In einer zweiten Schicht wurde die MALDI-Matrix, 2,5-Dihydroxybenzoësäure, über die Aminosäuren transferiert. Ebenso wurde jeweils eine Referenz aller Aminosäuren auf eine Glasoberfläche gespottet und massenspektrometrisch vermessen. Die hierbei detektierten Massen des laserbasierten Transfers entsprachen den Massen der Referenz: m/z (Abg) = [M+Na]⁺ : 490,6; m/z (Aea) = [M+Na]⁺ : 433,7; m/z (Pra) = [M+Na]⁺ : 357,2; m/z (Tmb) = [M+Na]⁺ : 499,7; m/z (Asp-ae) = [M+Na]⁺ : 417,9.

Azidolysin

Die Aminosäure Azidolysin wurde getrennt von den anderen Aminosäuren übertragen, um zusätzlich einen Einfluss einer weiteren Polyimidfolie (schwarz) zu testen. Diese könnte durch die schwarze Einfärbung ein anderes Verhalten in der Absorption des Laserimpulses zeigen. Die schwarze Folie sollte zusätzlich getestet werden, um einen potenziellen Zerfall der Azidgruppe zu vermeiden. Hierzu wurde ein laserbasiertter Transfer von Fmoc-Lys(N₃)-OH mit anschließender Kupplung an die Syntheseoberfläche vorgenommen. Nach erfolgter Acetylierung und erneuter Fmoc-Entschützung wurden die gekuppelten Aminosäuren über eine TAMRA-NHS Inkubation an die Aminogruppen durchgeführt.

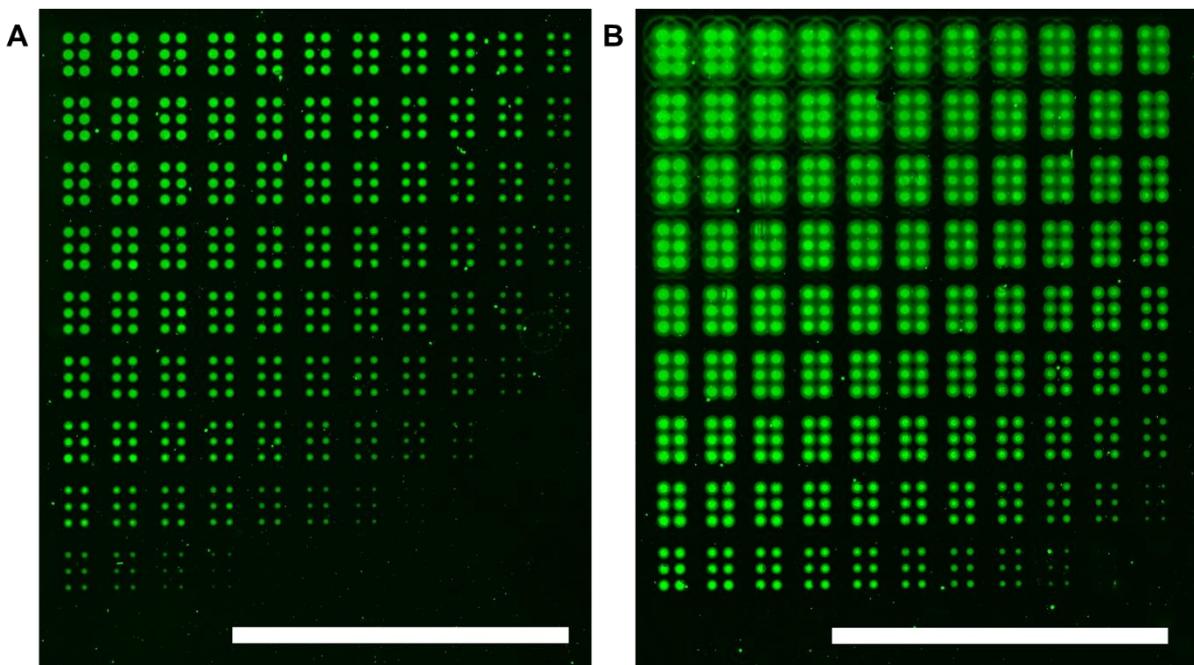


Abbildung 19: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an Azidolysin mit orangen Kapton (A) und schwarzem Kapton (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

Die Auswertung des Fluoreszenzscans ergibt für beide verwendeten Polyimid Folien einen erfolgreichen Transfer, sowie Kupplung an die Syntheseoberfläche. Die Fluoreszenzemission der schwarzen Polyimid Folie ist mit ca. 5.000 a.u. 50,0 % geringer gegenüber der Standardvariante (ca. 10.000 a.u.). Außerdem ist bei der schwarzen Folie ein deutlicher Effekt von verschwommenen und ineinanderlaufenden Spots bei höheren Laserparametern zu erkennen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die stärkere Absorption der Polyimid-Folie und dadurch auch die vermutlich stärkere Ausdehnung der Folie beim Transferprozess zurückzuführen. Ebenfalls könnte eine andere Beschaffenheit des Klebers zu einer veränderten Ausdehnung der Folie führen. Daher könnte die schwarze Folie eine Möglichkeit zur Optimierung für größere Spotdurchmesser und andere Anwendungen darstellen, allerdings wurde die Option in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, da die bisher verwendete Folie bereits auf alle Aminosäuren etabliert wurde. Zusätzlich zu dem fluoreszenzbasierten Nachweis wurde ebenfalls eine Detektion über MALDI-TOF durchgeführt. Hierfür wurde Fmoc-Lys(N_3)-OH auf eine Glasoberfläche lasertransferiert (Tabelle 23, Anhang S.180). In einer zweiten Schicht wurde die MALDI-Matrix, 2,5-Dihydroxybenzoësäure, über die Aminosäure transferiert. Ebenso wurde eine Referenz auf eine Glasoberfläche gespottet und massenspektrometrisch vermessen. Die hierbei

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

detektierten Massen des laserbasierten Transfers entsprachen den Massen der Referenz: m/z (Lys(N₃)) = [M+Na]⁺ : 416,6.

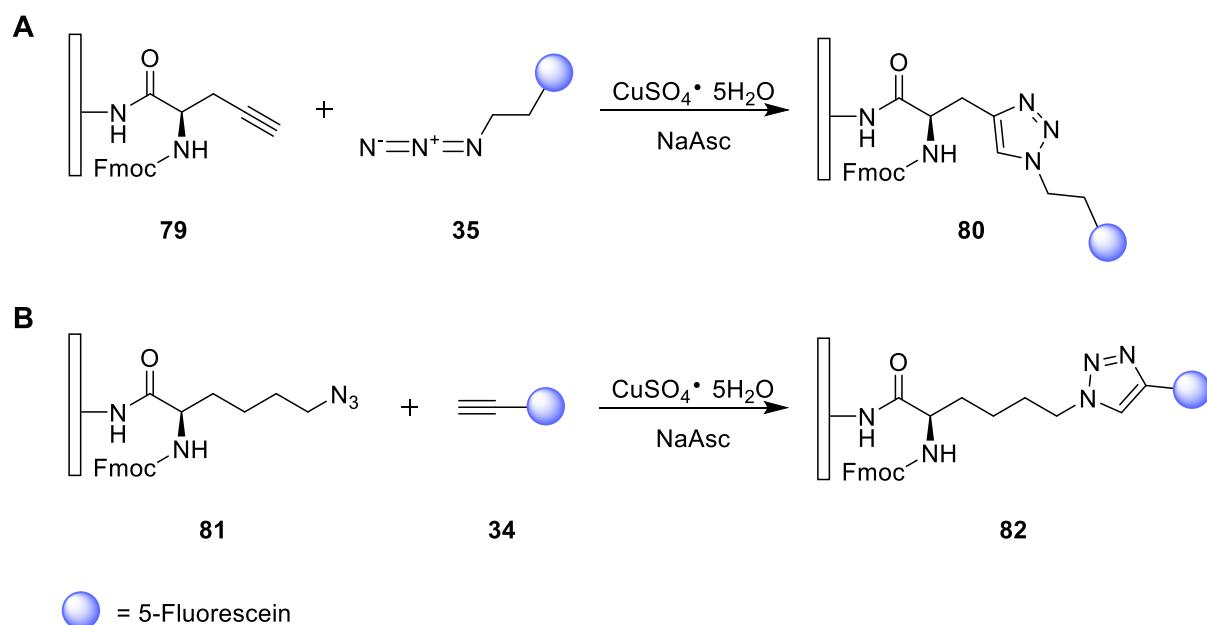
Insgesamt konnten alle transferierten, modifizierten Aminosäuren über die Fluoreszenzemission durch eine TAMRA Anbindung an die Aminogruppe nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte für die nicht proteinogenen Aminosäuren Aminobutylglycin, Trimethoxybenzylglycin, Asparginsäure-Allylester, sowie den Aminosäuren zur weiteren Verwendung über Biokonjugation, Allysinethylenacetal, Propargylglycin und Azidolysin ein massenspektrometrischer Nachweis erbracht werden.

4.2 Click-Reaktionen

Der vorangegangene erfolgreiche Transfer und die Anknüpfung an eine Syntheseoberfläche von Propargylglycin und Azidolysin sollte im Folgenden dafür genutzt werden die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Click-Reaktion (CuAAC), sowie die Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion durchzuführen. Diese Kombination an biologischen Molekülen (Aminosäuren) mit chemischen Reaktionen (Click-Reaktionen) sollen zur Einbringung von Bio-Labeling Methoden in Peptidarrays dienen. Durch die fluoreszenzbasierte Markierung modifizierter Aminosäuren können orthogonale Reaktionen, sowie schnelle und effiziente Hochdurchsatz-Screenings an Arrays mit biologisch relevanten Peptiden durchgeführt werden. Alle folgenden Reaktionen zur Biokonjugation und Chemodetektion wurden in Zusammenarbeit mit Jannik Schlindwein durchgeführt.

4.2.1 Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Click-Reaktion

Anhand der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Click-Reaktion soll ein Fluoreszenznachweis der CuAAC an den modifizierten Aminosäuren Propargylglycin (Pra) und Azidolysin (Lys(N_3)) durchgeführt werden. Hierfür soll eine Reaktion an oberflächengebundenem Propargylglycin (**79**) mit 5-Fluorescein(FAM)-Azid (**35**), sowie eine Reaktion an oberflächengebundenem Azidolysin (**81**) mit 5-FAM-Alkin (**34**) durchgeführt werden (s. Schema 12).



Schema 12: CuAAC von A) oberflächengebundenem Propargylglycin (**79**) mit 5-FAM-Azid (**35**) zu Konjugat **80** sowie B) oberflächengebundenem Azidolysin (**81**) mit 5-FAM-Alkin (**34**) zu Konjugat **82**

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Zur Durchführung der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Click-Reaktion sollte zunächst ein laserbasierter Transfer von Fmoc-Pra-OH und Fmoc-Lys(N₃)-OH, sowie eine Kupplung an einer Syntheseoberfläche vorgenommen werden. Nach erfolgter Acetylierung wurde die Reaktionslösung aus Kupfer(I)-sulfat, Natriumascorbinsäure (NaAsc) und dem jeweiligen Alkin- bzw. Azid-Farbstoff (5-FAM-Alkin bzw. -Azid) über Nacht auf der Oberfläche inkubiert.

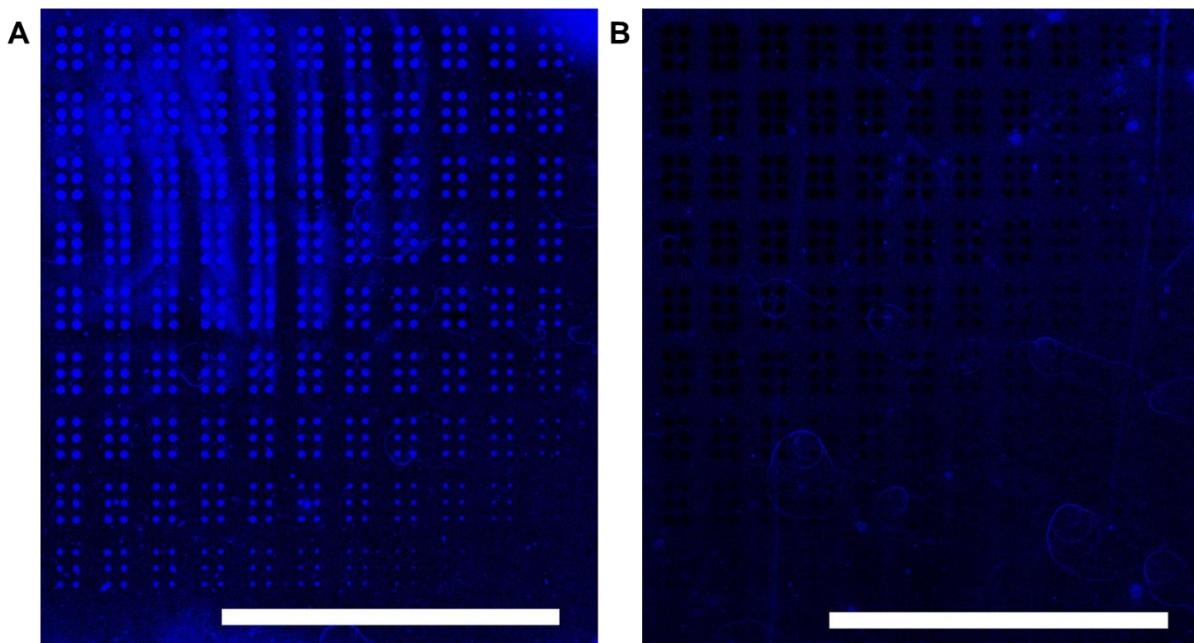
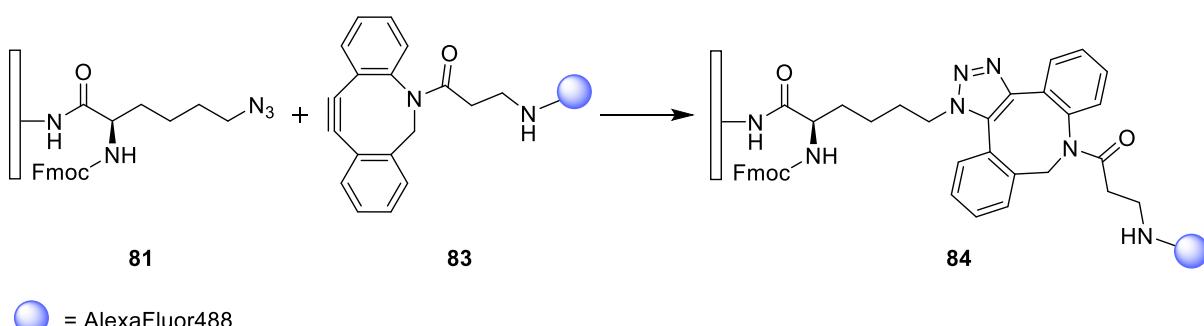


Abbildung 20: Fluoreszenzscan der laserunterstützten CuAAC Reaktion an Propargylglycin (A) und Azidolysin (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 520 nm ± 2,50 nm. PMT: 7,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.

Dieses Experiment zeigt eine erfolgreiche CuAAC Reaktion von lasertransferiertem Fmoc-Pra-OH mit 5-FAM-Azid (Abbildung 20A) mit einer maximalen Fluoreszenzemission von ca. 1.500 a.u.. Allerdings zeigt die CuAAC Reaktion von Fmoc-Lys(N₃)-OH mit 5-FAM-Alkin (Abbildung 20B) keine nachweisbare Fluoreszenz. Eine mögliche Begründung hierfür könnte der Zerfall der Azid Seitenkette des Lysins sein. Nach dem laserbasierten Transfer liegt die Seitenkette ungeschützt vor und könnte somit unter Stickstoff-Abspaltung zu einem Amin zerfallen. Für eine Wiederholung des Experiments könnte die Zusammensetzung der Reaktionslösung, sowie die Reaktionsbedingungen zur CuAAC optimiert werden. Da jedoch die CuAAC mit Propargylglycin erfolgreich war und vorangegangene Arbeiten bereits gezeigt haben, dass diverse CuAAC möglich sind^[7, 167], wurde auf eine Wiederholung der CuAAC an Azidolysin verzichtet und an Alternativen in Form einer kupferfreien Azid-Alkin Click-Reaktion weitergearbeitet.

4.2.2 Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion

Für die Reaktion einer kupferfreien Azid-Alkin Click-Reaktion zur geeigneteren Anwendung in biologischen Zielstrukturen soll die Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion (SpAAC) über die Reaktion von Azidolysin mit Dibenzocyclooctin (DBCO), welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft ist, nachgewiesen werden. Für dieses Vorhaben soll eine Verknüpfung von oberflächengebundenes Azidolysin (**81**) mit DBCO-AlexaFluor(AF)488 (**83**) durchgeführt werden.



Schema 13: SpAAC von oberflächengebundenem Azidolysin (**81**) und DBCO-AF488 (**83**) zu Konjugat (**84**)

Dazu wurde zunächst ein laserbasierter Transfer von Fmoc-Lys(N_3)-OH, sowie die Kupplung an einer Syntheseoberfläche vorgenommen. Nach erfolgter Acetylierung wurde eine Inkubation mit einem DBCO-AF488 Fluorophor durchgeführt.

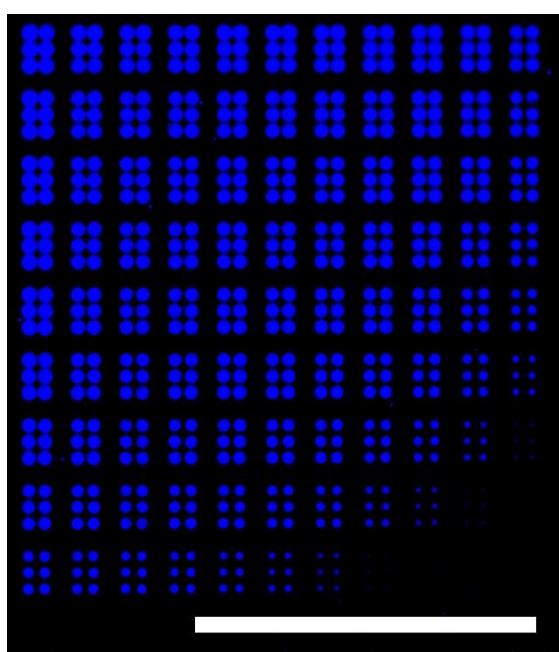


Abbildung 21: Fluoreszenzscan der laserunterstützen SpAAC Reaktion Azidolysin und Dibenzocyclooctin. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: $520 \text{ nm} \pm 2,50 \text{ nm}$. PMT: 7,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Die Auswertung des Fluoreszenzscans (Abbildung 21) zeigt eine erfolgreiche laserunterstützte SpAAC von Azidolysin und DBCO. Die detektierte Fluoreszenzemission von ca. 15.00-20.000 a.u. zeigt eine ausreichende Menge an oberflächengebundenen Azidolysinen zum visuellen Nachweis der SpAAC Reaktion. Dadurch kann ein genereller Reaktionsnachweis erbracht werden, allerdings können ohne zusätzliche Analysemethoden keine Aussagen über die Ausbeute und Effizienz der Reaktion erbracht werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine CuAAC, sowie eine SpAAC an einer lasertransferierten Aminosäure möglich ist, sollte dieser Nachweis ebenfalls in einer Peptidsynthese angewandt werden. Hierzu wurde das Tetrapeptid G-Lys(N₃)-G-S auf einer Syntheseoberfläche synthetisiert. Nach der Fertigstellung der Synthese, des zu diesem Zeitpunkt N-terminal geschützten Peptids, wurde eine SpAAC mit einem DBCO-AF488 Fluorophor an der Azid-Seitenkette des Azidolysins durchgeführt. Zur Gewährleistung eines intakten N-Terminus wurde anschließend die Fmoc-Schutzgruppe des Tetrapeptids entfernt und eine abschließende TAMRA-NHS Färbung durchgeführt.

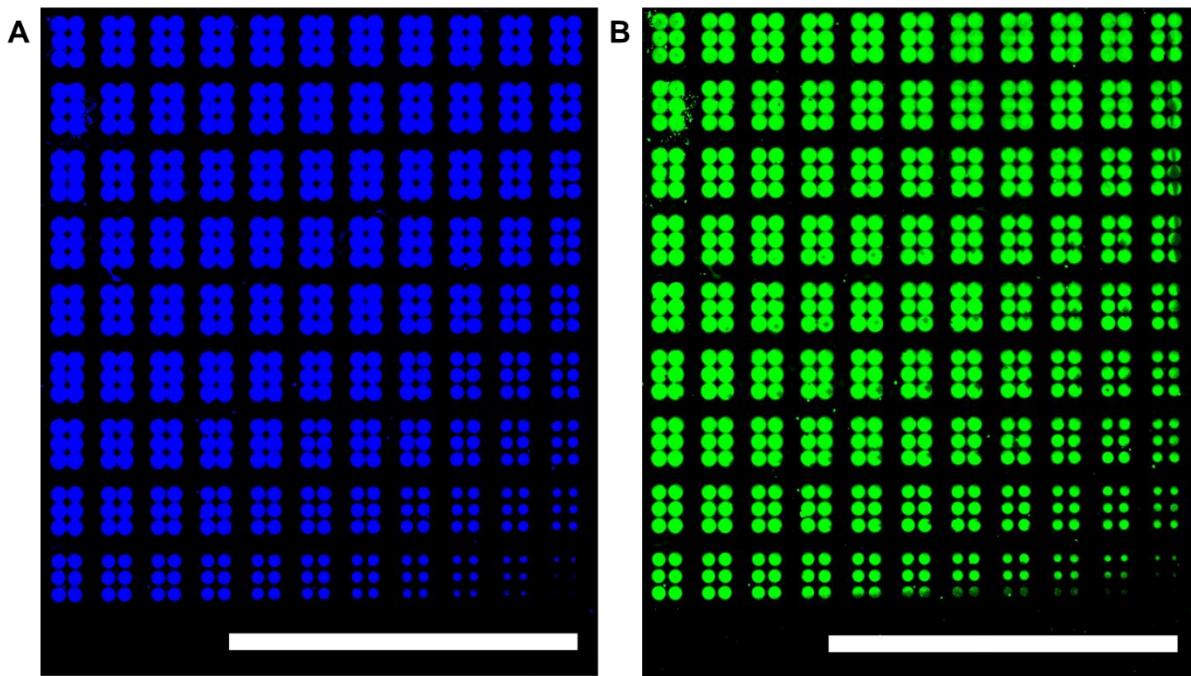


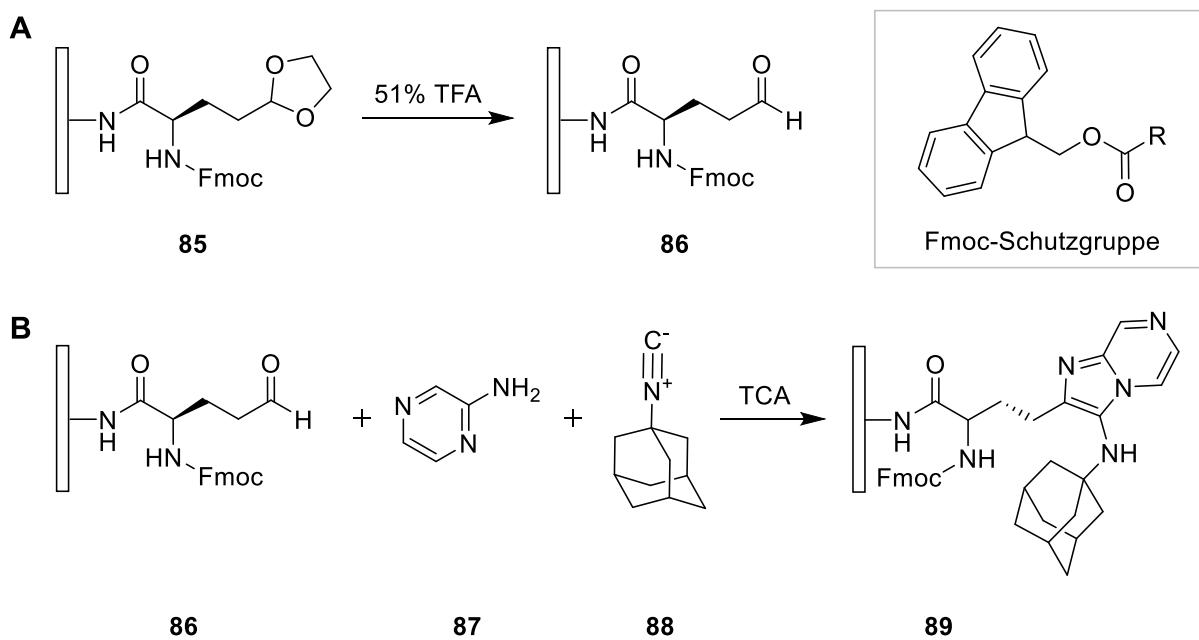
Abbildung 22: Fluoreszenzscan der laserunterstützten Peptidsynthese, sowie SpAAC Reaktion an Azidolysin. A) Visualisierung der SpAAC Reaktion durch DBCO-AF488. B) Visualisierung des Peptids durch TAMRA-NHS. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm (A) und 532 nm (B). Emissionsfilter: 520 nm ± 2,50 nm (A) und 582 nm ± 37,5 nm (B). PMT: 6,00 (A) und 1,00 (B). Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.

Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Die laserbasierte Synthese des Tetrapeptids G-Lys(N₃)-G-S (Abbildung 22, B), sowie die SpAAC an der funktionellen Seitenkette des Azidolysins (Abbildung 22, A) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Anhand der max. Fluoreszenzintensitäten von ca. 3.000 a.u. (A) und ca. 6.000 a.u. (B) konnte gezeigt werden, dass modifizierte Aminosäuren mit Hilfe eines Laserimpulses transferiert und zur Synthese eines Peptids verwendet werden können. Ebenso sind diese auch nach der Implementierung in ein Peptid dazu in der Lage Reaktionen zur Biokonjugation, wie durch die SpAAC gezeigt, einzugehen.

4.3 GBB-Reaktion an Allysinethylenacetal

Neben den Click Reaktionen, soll durch die Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaktion ein weiterer Reaktionstyp zum Nachweis bestimmter funktioneller Gruppen von Aminosäuren analysiert werden. Diese Mehrkomponentenreaktion ermöglicht den Einsatz von Aldehyden als funktionelle Gruppen, beispielsweise durch die Aminosäure Allysinethylenacetal. Dadurch kann ein selektiver Aufbau an Aminosäuren über kovalente Verknüpfungen von chemischen Molekülen durchgeführt werden. Für die laserbasierte Durchführung der GBB-Reaktion, soll zunächst Fmoc-Aea-OH transferiert werden. Nach erfolgter Acetylierung, sowie Seitenkettenenschutzung wurden anschließend in Zusammenarbeit mit Jannik Schlindwein die Reaktanden der GBB-Reaktion, bestehend aus Adamantylisocyanid, 2-Aminopyrazin und Trichloressigsäure (TCA) lasertransferiert. Nach erfolgter Kupplung über Nacht im Ofen bei 100° C wurde die Syntheseoberfläche mit Ammoniak gewaschen.



Schema 14: Darstellung der durchgeföhrten GBB-Reaktion. A) Seitenkettenentschützung von oberflächengebundenem Allysinethylenacetal (**85**) mit Trifluoressigsäure (TFA). B) GBB-Reaktion des oberflächengebundenen Allysins (**86**) mit 2-Aminopyrazin (**87**) und Adamantylisocyanid (**88**) zu dem GBB-Produkt (**89**)

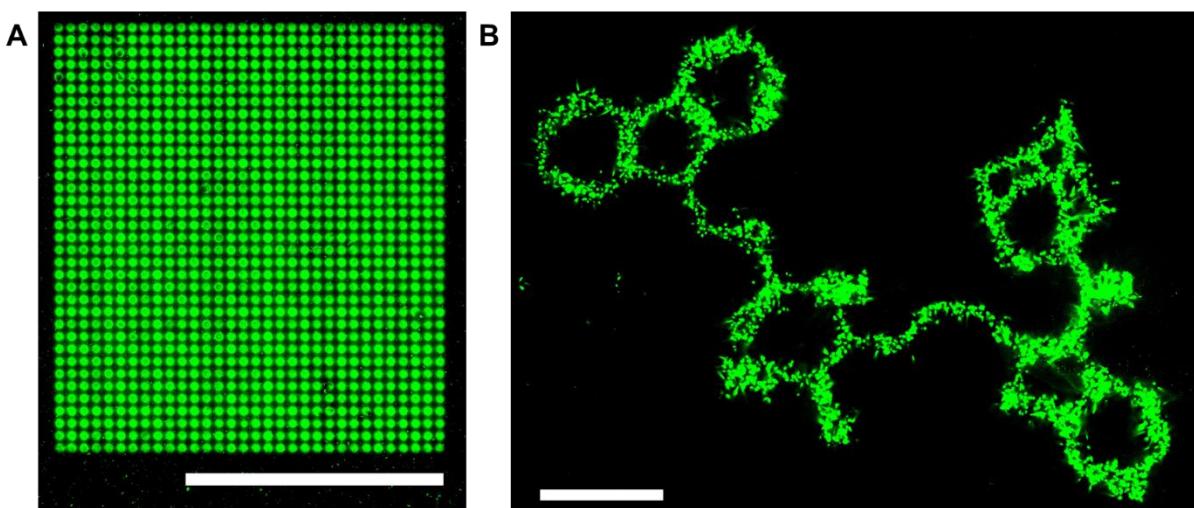


Abbildung 23: Fluoreszenzscan der laserunterstützten GBB Reaktion an Allysinethylenacetal. Darstellung als größere Reaktionsfläche (A) und Strukturformel des Produkts (B) Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Die Auswertung der Fluoreszenzscans aus Abbildung 23 zeigt eine erfolgreiche Durchführung der GBB-Reaktion an Allysinethylenacetal. Die detektierte Fluoreszenz von ca. 20.000 a.u. zeigt einen ausreichenden Ablauf der Reaktion. Zudem kann anhand der Verteilung der Emission ebenfalls von einer gleichmäßig stattfindenden Reaktion ausgegangen werden. Die Reaktion mit der Darstellung der Strukturformel kann ebenfalls als erfolgreich angesehen werden, wobei die Strukturformel nicht mehr vollständig zu erkennen ist. Ursache hierfür ist leichte Auskristallisation der Reaktion, sowie die sehr geringen Spotabstände durch die Erstellung der Strukturformel mit dem Programm MatLab.

Durch die Fluoreszenzemission beider Reaktionsvarianten kann ein genereller Nachweis der Reaktion bestätigt werden, jedoch können ohne weitere Analysemethoden keine exakten Ausbeuten der Reaktion erbracht werden. Die genauen Analysen der Reaktanden der GBB-Reaktion sind durch Jannik Schlindwein in seiner Dissertation erbracht worden. Insgesamt konnte durch die GBB-Reaktion an Allysinethylenacetal eine weitere Multikomponentenreaktion zur Chemodetektion an Aminosäuren gezeigt werden. Durch die GBB-Reaktion und weitere andere Reaktionstypen, sowie modifizierte Aminosäuren dieser Art können in Zukunft diverse Reaktionen zur Chemodetektion zur Anwendung in biologischen Screenings zugänglich gemacht werden.

5. Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Die Erforschung einer Vielzahl an Erkrankungen ist ein täglicher Bestandteil der Arbeit von Wissenschaftlern und Medizinern. Darunter fallen auch viele Autoimmunerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis (RA) oder das Sjögrens Syndrom (SjS). Die rheumatoide Arthritis zählt dabei zu den am weitesten verbreiteten chronisch entzündlichen Erkrankungen^[129]. Allerdings sind viele Mechanismen und die genauen Ursachen dieser und vieler anderer Krankheiten bisher unklar. Eine Möglichkeit die Mechanismen und Ursachen der Krankheiten zu erforschen, ist die Integration von posttranslationalen Modifikationen in Peptidarrays. Diese könnten einerseits als diagnostischer Marker für Krankheiten dienen, indem spezifische Antigen-Antikörperbindungen zwischen einer PTM und einem Antikörper eingegangen werden. Somit könnten zum Beispiel Autoimmunerkrankungen ggf. bereits im Frühstadium eindeutiger erkannt, diagnostiziert und behandelt werden. Andererseits könnte das Vorkommen von einer oder mehreren PTMs auch ein Indikator für die Ursache und Entwicklung der (Autoimmun-)Krankheit sein, da verschiedene Modifikationen in spezifischen Stadien und Reaktionsmechanismen von Erkrankungen auftreten und möglicherweise die Entwicklung von Autoantikörpern begünstigen können.

Im Kontext dieser Forschungsfragen sollen Peptidarrays mit den zuvor optimierten posttranslationalen Aminosäuren hergestellt und für biologische Anwendungen verwendet werden. Hierfür sollen einerseits Citrullinierungen, Carbamoylierungen, Acetylierungen und Hydroxylierungen mit Hilfe des nano3D-Druckers in Peptide integriert werden und mit Patientenserien der rheumatoide Arthritis inkubiert werden. Diese Modifikationen konnten unter anderem schon in vielen Bereichen der rheumatoide Arthritis detektiert werden^[154, 156, 188], weshalb sie in verschiedene Peptide aus der Literatur, sowie Kollagen Typ 2 und Vimentin integriert werden sollen. Anschließend sollen Inkubationen mit Seren von Patienten mit RA durchgeführt werden, um Antigene in Form von Peptidsequenzen (Epitope) durch Antikörperbindungen zu identifizieren. Des Weiteren soll im Anschluss eine genaue Analyse des Epitops über eine Substitutionsanalyse erfolgen, um die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Bindung des Antikörpers verantwortlich sind. Ebenfalls sollen analog Inkubationen mit Seren von Patienten mit dem Sjögrens Syndrom an-

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

citrulliniertem Kollagen Typ 2 und Vimentin erfolgen, um dieselben Antikörper Bindungsstudien durchzuführen. Hierbei sollen vor allem potenziell identische oder ähnliche Bindungsmotive untersucht werden, da das Sjögrens Syndrom häufig mit rheumatischen Erkrankungen einhergeht, weshalb das Auftreten potenziell identischer Antigenbindungsstellen bzw. Antikörperstrukturen naheliegt.

Auch im Falle von Virusinfektionen wie Hepatitis B (HBV) könnten Phosphorylierungen eine wichtige Rolle spielen. Diese sollen daher in Peptidarrays integriert und für die biologische Anwendung genutzt werden. Einerseits soll dadurch eine weitere posttranskriptionale Modifikation zugänglich gemacht werden. Andererseits soll hier untersucht werden, welche Antigen-Antikörperbindungen durch die Inkubation mit einem Anti-HBs Serum (engl.: *surface*, S Gen) entstehen. Die Phosphorylierungen dieser Bindungsstellen könnten eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung darstellen, ob virale DNA in die Viruspartikel eingebaut wird oder nicht. Die (De-) Phosphorylierungen während der Virusreplikation steuern die homöostatische Ladung die für die Stabilität der Virushüllen, sowie das Verpacken der prägenomischen, viralen RNA verantwortlich ist^[189]. Dadurch könnten die leeren Virushüllen immunmodulatorische Funktionen besitzen und zur Induktion von Toleranz gegenüber HBV im Wirt beitragen. Diese Toleranz könnte durch die Interaktion mit regulatorischen B-Zellen (Bregs) gefördert werden, die durch die Internalisierung der leeren Virushüllen aktiviert werden. Infolgedessen könnte das HBV versuchen, das Immunsystem zu beeinflussen, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden und chronische Infektionen zu begünstigen. Diese Untersuchungen könnten dazu beitragen, ein besseres Verständnis der Rolle von Phosphorylierung in der Immunantwort auf HBV zu erlangen und möglicherweise neue Ansätze zur Induktion von Toleranz oder zur Entwicklung therapeutischer Strategien zu identifizieren.

5.1 Generierung von Peptidarrays für Bindungsstudien zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis

Zunächst soll ein Screening eines breiten Spektrums von Peptiden aus der Literatur vorgenommen werden, wobei die Aminosäuren Citrullin, Homocitrullin, Acetylysin und Hydroxyprolin integriert werden sollen. Mittels Screening verschiedener Peptidsequenzen aus diversen Proteinen soll zunächst untersucht werden, welche Epitope von Antikörpern verschiedener Patientenserien mit rheumatoider Arthritis erkannt werden. Mit Hilfe von Substitutionsanalysen sollen die genauen Bindungsmotive der Antigen-Antikörper Bindungsstellen identifiziert werden, um im Optimalfall identische Bindungsmotive bei verschiedenen Patientenserien zu finden. Bei identischen oder sehr ähnlichen Motiven besteht eine Wahrscheinlichkeit, dass die Antikörper in den Seren einen ähnlichen strukturellen Aufbau besitzen und somit ein Gemeinsamkeiten bei der Entstehung des Antikörpers bestehen. Diese Gemeinsamkeiten könnten möglicherweise die Ausbildung von Autoimmunantikörpern durch verschiedene Faktoren, wie genetische Prädispositionen, Antigen Mimikry, Fehler in der Immunregulation, Umweltfaktoren oder Virusinfektionen sein. Weiterhin soll durch die Integration von PTMs untersucht werden, ob diese ebenfalls in (mehreren) Bindungsmotiven auftreten. Infolgedessen könnten eventuell die posttranslationalen Modifikationen die Ursache für die Ausbildung von Autoantikörpern sein.

Für die Integration der PTMs wurde zunächst ein laserbasierter Übertrag, sowie eine Optimierung dieser Aminosäuren vorgenommen (siehe Kap.4.1). Nach dem erfolgten Nachweis zum Übertrag und der Kupplung an die Syntheseoberfläche wurden für alle benötigten Aminosäuren Lasertransferparameter gewählt, die einen Spotdurchmesser von ca. 200 µm und ca. 20.000 a.u. detektierte Fluoreszenzemission betragen (Anhang S. 179, Tabelle 22). Die Peptide wurden aus diversen Quellen der Literatur gewählt, wobei primär auf die mögliche Relevanz von modifizierten Aminosäuren geachtet wurde. Hierbei wurden vor allem citrullinierte Varianten der Peptide Filaggrin^[141-142, 190], Fibrinogen^[142-145, 154, 191], Vimentin^[142, 145-146, 154], α -Enolase^[142, 145, 154, 192], Apolipoprotein (A-C, E)^[142, 145, 192], sowie diverse weitere Peptide^[142, 145, 192] gewählt. Die Liste der untersuchten Peptidsequenzen, welche in Doppelspots synthetisiert wurden, sind im Anhang (Tabelle 28, Seite 182) einzusehen. Als Peptidlänge wurde eine Länge von 15 Aminosäuren gewählt, wobei zu kurze

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Sequenzen mit einem Glycin-Spacer aufgefüllt wurden. Als Positivkontrollen wurde Rahmen aus Influenza-Hämaggglutinin(HA)-Peptiden (Sequenz: YPYDVPDYAG) synthetisiert. Für die Synthese wurde zunächst ein Syntheseträger Fmoc-Entschützt. Anschließend wurden die jeweiligen Aminosäuren per Lasertransfer übertragen und an die Oberfläche des Syntheseträgers gekuppelt. Nach einem Acetylierungsschritt wurden die Fmoc-Entschützung, der Transfer und die Kupplung, sowie die Acetylierung so lange wiederholt, bis die gewünschte Peptidlänge von 15 Aminosäuren erreicht wurde. Am Ende der Synthese wurden die Seitenketten der Peptide entschützt, sowie eine letzte Fmoc-Entschützung durchgeführt, bevor die fertigen Peptidarrays für eine Serum Inkubation verwendet wurden. Die Verdünnung der verwendeten Rheumaseren RA1-13 betrug für dieses Experiment jeweils 1:100. Die Seren wurden anonymisiert erhalten, wobei einige Informationen über Konzentrationen von Antikörpern wie bspw. Anti-CCP oder Anti-RF, sowie teilweise das Geschlecht und Alter der Patienten in Tabelle 25 (Anhang, Seite 181) einzusehen sind. Zusätzlich wurde eine Inkubation mit zwei Seren von gesunden Individuen durchgeführt (Seren hC1 und hC2, engl.: *healthy control*, hC). Dies soll dazu dienen, die Epitope, die durch die Rheumaseren identifiziert werden mit gesunden Seren abzugleichen, um lediglich Epitope zu wählen, die für Rheumaseren spezifisch sind. Abschließend wurden die Peptidarrays zur Visualisierung gebundener Serumantikörper mit dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647, sowie dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 inkubiert.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

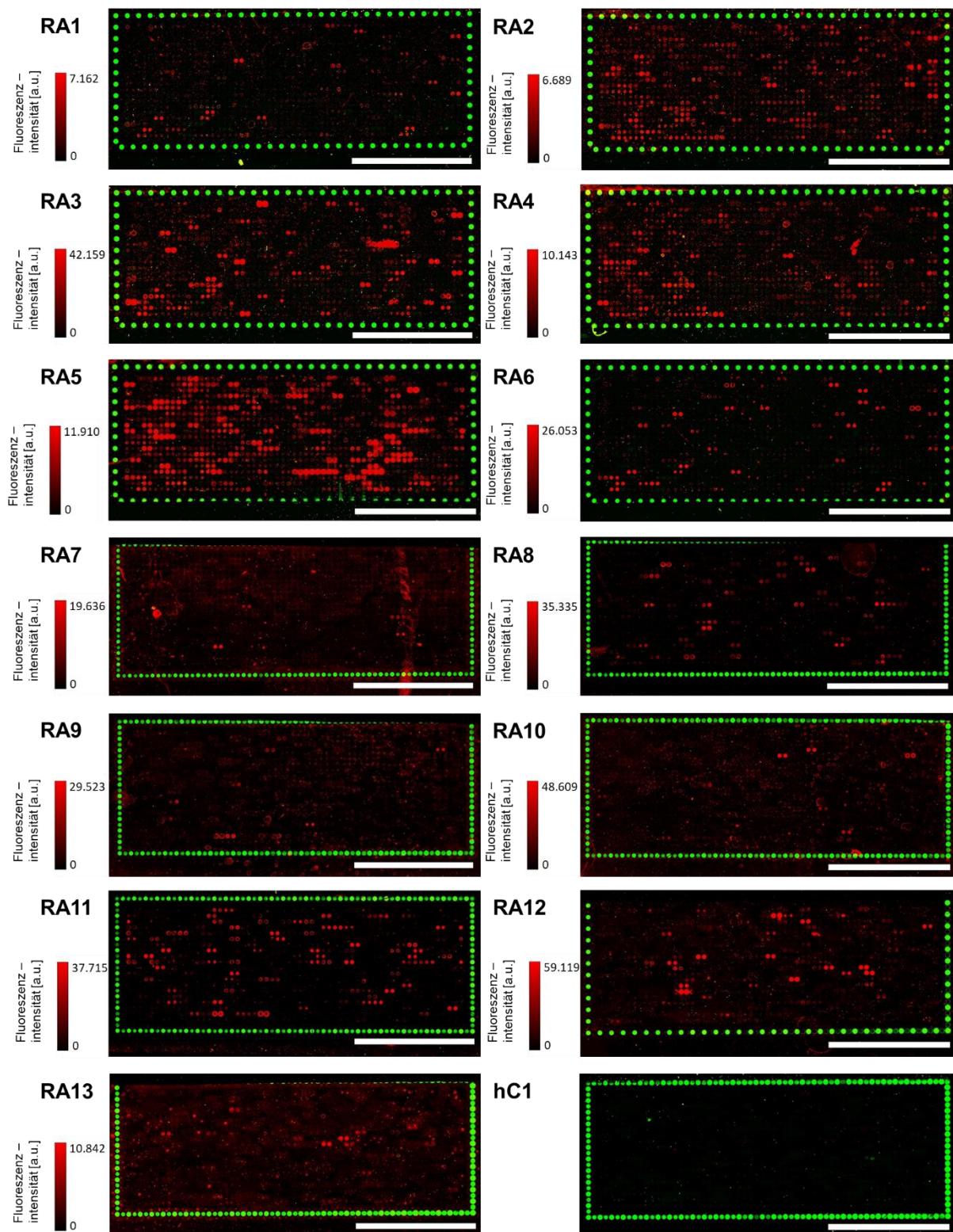


Abbildung 24: Fluoreszenzscan der Synthese von Peptiden aus der Literatur nach Rheumaseren und Kontrollserum (hC1) Inkubation (RA1-13) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: $582 \text{ nm} \pm 37,5 \text{ nm}$ und $677 \text{ nm} \pm 22,5 \text{ nm}$. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Abbildung 24 zeigt die Fluoreszenzscans der Peptidarrays nach den Serum- und Antikörper-Inkubationen. Der Kontrollrahmen aus HA-Peptiden zeigt eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von ca. 30.000-40.000 a.u., wodurch ein genereller Syntheseerfolg der Peptidarrays verzeichnet werden kann. Vereinzelt sind einige Spots der Kontrollrahmen an einer Kante nicht zu erkennen, was auf eine fehlerhafte Auflage der Dichtung bei der Inkubation zurückzuführen ist. Die Peptide zur Analyse der Seren von Patienten mit RA sind hiervon nicht betroffen. Allgemein kann eine unterschiedliche Anzahl der fluoreszierenden Peptidspots bei den Seren beobachtet werden. Serum RA2, RA4, RA5 und RA11 besitzen dabei die höchste Anzahl an fluoreszierenden Peptidspots. Die Anzahl der Peptidspots nimmt bei den Seren RA1, RA3, RA6, RA8 und RA12 im Vergleich leicht ab, jedoch sind trotzdem diverse Signale detektierbar. Die geringste Anzahl an fluoreszierenden Peptidspots besitzen die Seren RA7, RA9, RA10 und RA13. Im Allgemein ist ebenfalls eine starke Variation in der maximalen Fluoreszenzintensität zu beobachten, welche keinen Einfluss auf die Anzahl der detektierten Spots hat. Insgesamt zeigen alle Seren zwar eine variable Anzahl an den erhaltenen Signalen, jedoch konnten bei allen Seren fluoreszierende Peptidspots detektiert werden, wodurch im Folgenden eine genaue Auswertung und Vergleich der gebundenen Peptide stattfindet. Die Inkubation der Kontrollseren hC1 und hC2 ergab keine detektierbaren Fluoreszenzemissionen der untersuchten Peptidsequenzen. Daher werden diese Fluoreszenzscans nicht weiter diskutiert und sind im Anhang (Abbildung 55) dargestellt. Somit wird geschlussfolgert, dass alle erhaltenen Signale der Inkubation mit den Rheumaseren 1-13 potenziell für RA relevant sein könnten.

Für die weitere Auswertung der erhaltenen Fluoreszenzemissionen wurden zunächst jeweils die Mittelwerte aus den Duplikaten gebildet, sowie alle Signale eines Serums auf dessen Intensitätsmaximum normiert. Dieses Vorgehen wurde für jedes Serum angewandt, um anschließend die Fluoreszenzemissionen aller Seren untereinander zu vergleichen. Zur besseren Visualisierung der Signale wurde eine sog. Heatmap („Wärmebild“) in Abhängigkeit der normierten Fluoreszenzintensitäten erstellt, wodurch zusätzlich die Bindung der Antikörper an identische Peptide besser betrachtet werden kann. Ebenfalls wurde zur Reduzierung von Hintergrundsignalen als Mittelwert der angelegten Farbskala das Quantil von 95 % verwendet.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

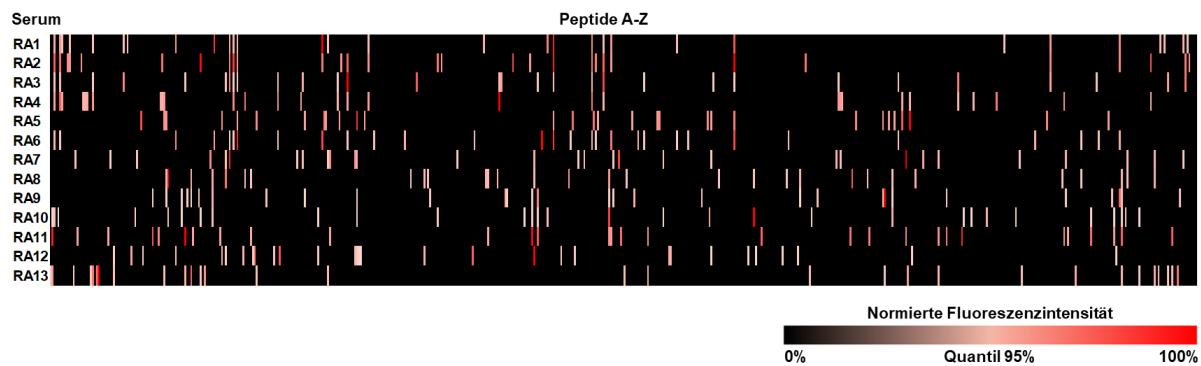


Abbildung 25: Heatmap der synthetisierten Peptide aus der Literatur sowie Inkubation mit Rheumaseren. Die Fluoreszenzintensitäten wurden normierten auf das Intensitätsmaximum des jeweiligen Serums.

Insgesamt ist eine relativ breite Verteilung der Signale über alle Peptide zu erkennen, wobei einige Seren die identischen Peptide binden. Mit Hilfe der Heatmap konnten 37 Peptide identifiziert werden, die von mindestens 3 verschiedenen Seren gebunden wurden. Davon wurde 1 Peptid von sechs Seren, 10 Peptide von mindestens 5 Seren und 18 Peptide von mindestens 4 Seren gebunden. Als Auswahlkriterien zu weiteren Analysen wurde primär die Anzahl der Seren, die an eine gleiche Peptidsequenz binden betrachtet, da hier eine potenziell gleiche oder ähnliche Antikörperstruktur vorliegen könnte. Außerdem könnten dadurch ggf. gleiche Bindungsmotive gebunden werden, wodurch eine Gemeinsamkeit bei der Entstehung des (Rheuma) Antikörpers bestehen könnte. Zudem wurde auch die Intensität der Fluoreszenzemission berücksichtigt, um eine potenzielle hohe Bindungsspezifität von Antikörpern einzubeziehen. Basierend auf diesen Aspekten wurden 11 Peptidsequenzen, welche von mindestens vier Seren gebunden wurden, ausgewählt (Tabelle 2).

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Tabelle 2: Bindung der Seren RA1-13 an ausgewählte Peptidsequenzen 1-11. Die Bindung eines Serums wurde in hellblau dargestellt.

		Serum (RA)												
Peptidsequenz	Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AEFTGZHDAHLNGKG	1	x	x	x	x		x			x				
ALGHLDLSGNZLRKG	2	x	x	x	x		x							
EEQEVSWTQYTQZKG	3	x	x	x			x	x						
EFPSRGKSSYSKQF	4	x	x	x	x		x							
EGAEZGLSAIRGGGG	5	x	x	x		x	x							
KIHAREIFDSRGNPT	6			x						x	x	x		
LETTZLTRKGGGGGG	7	x	x	x		x	x							
LTTNGZFREHNAKGG	8	x	x	x	x		x							
MAZHLREYQDLLNVK	9								x	x	x	x		
PLTSFZQRKGGGGGG	10	x	x	x		x	x							
YLQYTDETFZTTIEK	11					x		x	x	x	x			x

Die Peptidsequenzen AEFTGZHDAHLNGKG (1), ALGHLDLSGNZLRKG (2), EEQEVSWTQYTQZKG (3), EFPSRGKSSYSKQF (4), EGAEZGLSAIRGGGG (5), LETTZLTRKGGGGGG (7), LTTNGZFREHNAKGG (8) und PLTSFZQRKGGGGGG (10) zeigen eine primäre Bindung der Seren RA1-6. Die drei Peptidsequenzen KIHAREIFDSRGNPT (6), MAZHLREYQDLLNVK (9) und YLQYTDETFZTTIEK (11) zeigen die primäre Bindung der Seren RA8-11. Des Weiteren ist ein häufiges Auftreten von Citrullin (Z) in neun der elf Sequenzen auffällig. Die Zuordnung der Sequenzen zu den ursprünglichen Proteinen sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3: Ausgewählte Peptidsequenzen mit Zuordnung zum Ursprungsprotein sowie der Position des substituierten Arginins durch Citrullin

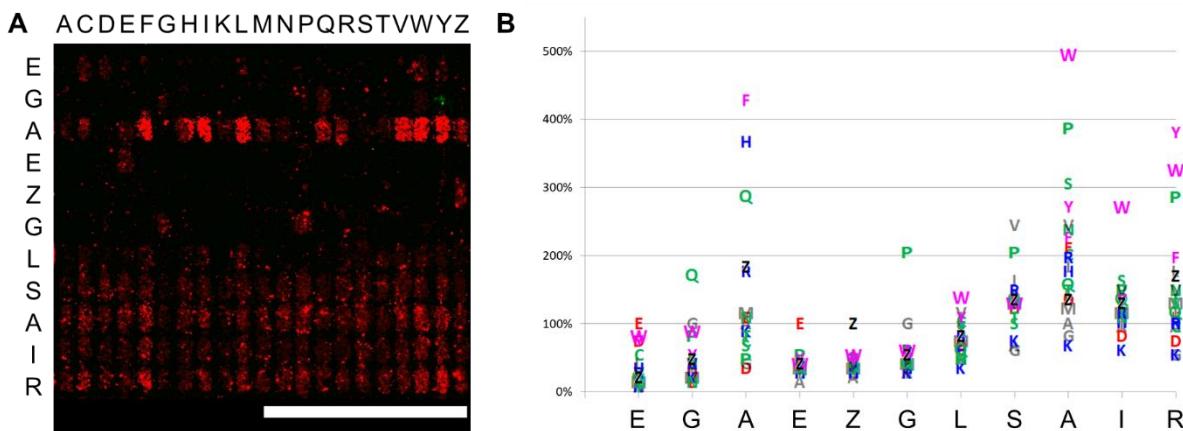
Peptidsequenz	Nr.	Originalsequenz	Protein	Position Cit
AEFTGZHDAHLNGKG	1	AEFTGZHDAHLNGK	Apolipoprotein B	R3020
ALGHLDLSGNZLRKG	2	ALGHLDLSGNZLRK	Alpha-2-Globulin	R175
EEQEVSWTQYTQZKG	3	EEQEVSWTQYTQZK	Rho-GTPase activating protein 4	R486
EFPSRGKSSYSKQF	4	EFPSRGKSSYSKQF	Fibrinogen alpha-Kette	R573
EGAEZGLSAIRGGGG	5	EGAEZGLSAIR	Apolipoprotein E	R190
KIHAREIFDSRGNPT	6	KIHAREIFDSRGNPT	Alpha-Enolase	-
LETTZLTRKGGGGGG	7	LETTZLTRK	Apolipoprotein B	R3386
LTTNGZFREHNAKGG	8	LTTNGZFREHNAK	Apolipoprotein B	R1689
MAZHLREYQDLLNVK	9	MAZHLREYQDLLNVK	Vimentin	R373
PLTSFZQRKGGGGGG	10	PLTSFZQRK	Lamin-B-Rezeptor	R61
YLQYTDETFZTTIEK	11	YLQYTDETFZTTIEK	Ceruloplasmin	R81

Substitutionsanalysen

Um spezifische Rückschlüsse zu erhalten, welche Aminosäuren für die Bindung eines oder mehrerer Antikörper essenziell sind und ob Gemeinsamkeiten in den Motiven bestehen, wurden Substitutionsanalysen durchgeführt. Dabei soll vor allem auf identische oder ähnliche Bindungsmotive geachtet werden, da durch ein ähnliches Bindungsmotiv ein ähnlicher Antikörper in verschiedenen Seren vorhanden sein könnte. Ebenfalls könnte dann eine Gemeinsamkeit bei der Entstehung des Antikörpers in der Immunantwort bestehen. Außerdem könnte auch eine gleiche genetische Mutation oder, in diesem Fall, eine posttranskriptionale Modifikation die Ursache für die Gemeinsamkeit der Antikörper sein. Falls eine PTM für die Bindung des Antikörpers essenziell ist, könnte diese die Ursache dafür sein, dass eine Bildung von Antikörpern gegen körpereigenes Gewebe induziert wurde. Unter Berücksichtigung dieser Ansätze wurden Substitutionsanalysen der Peptide 1-11 durchgeführt. Hierbei wurde nacheinander jede Aminosäure der Peptidsequenz gegen alle proteinogenen Aminosäuren und Citrullin ausgetauscht. Die Arraysynthese mit den HA (Sequenz: YPYDVPDYAG) und Polio (Sequenz: KEVPALTAVETGAT) Kontrollpeptiden wurde von der Firma PEPperPRINT GmbH durchgeführt. Diese Peptide dienen häufig als Kontrollpeptide zur Validierung der Synthese, da monoklonale Antikörper gegen HA Peptide kommerziell erhältlich sind, wohingegen die Mehrheit der humanen Seren bereits Polio Antikörper aufgrund von Impfungen erhalten. Die bereits entschützten Peptidarrays wurden mit den Seren RA1-6 bzw. RA8-11 und RA13 (jeweils 1:100 Verdünnung) und anschließend mit dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647 und dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 inkubiert. Dabei wurden die Substitutionsanalysen der Peptide 1-5, 7-8 und 10-11 mit den Seren RA1-6 inkubiert und die Substitutionsanalysen der Peptide 6, 9 und 11 mit den Seren RA8-11 und RA13. Im Folgenden werden die Substitutionsanalysen gezeigt, welche ein potenzielles Bindungsmotiv (Epitop) der Antikörper zeigen. Die Inkubationen der Peptidsequenzen 1-4, 8 und 10 zeigten keine charakteristischen Fluoreszenzmuster und werden daher in der folgenden Auswertung nicht diskutiert. Die vollständigen Fluoreszenzscans sind im Anhang (Abbildung 56-Abbildung 58, Seite 187-Seite 188) dargestellt.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

a) Sequenz 5: EGAEZGLSAIR



Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Bei der Inkubation der Sequenz EGAEZGLSAIR mit Serum RA1 kann gezeigt werden, dass die Aminosäuren Glutaminsäure an Position 4 und Citrullin an Position 5 essenziell für die Bindung des Antikörpers sind. Die ursprüngliche Aminosäure Glycin an Position 6 der Sequenz zeigt zusätzlich eine starke Bindung von Prolin mit einer relativen Intensität von ca. 200 %, wodurch beide Aminosäuren als essenziell betrachtet werden können. Alle anderen Aminosäuren der Sequenz können durch nahezu alle Aminosäuren beliebig ersetzt werden und sind daher irrelevant für die Bindung des Antikörpers. Somit könnte ein mögliches Bindungsmotiv E-Z-G/P für einen Antikörper sein. Die Bindung der relevanten Aminosäuren ist zur besseren Übersicht ebenfalls in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz EGAEZGLSAIR für Serum RA1. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz											
	E	G	A	E	Z	G	L	S	A	I	R	
RA7	x	x	x	E	Z	G,P	x	x	x	x	x	

Allerdings ist dieses Motiv mit drei Aminosäuren ein sehr kurzes Motiv, wodurch die Wahrscheinlichkeit für ein spezifisches Motiv eventuell geringer sein könnte. Typischerweise liegt die Anzahl der am Epitop beteiligten Aminosäuren im Bereich von 5-15 Aminosäuren^[115]. Dieser Bereich kann allerdings variieren, weshalb ein kleineres Motiv nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. In einigen Fällen können die Epitope auch eine größere Anzahl von Aminosäuren umfassen, insbesondere bei komplexen Strukturen oder dreidimensionalen Epitopen, wodurch sie auch mehrere Bereiche umfassen können. Die anderen eingesetzten Seren zur Inkubation zeigten keine charakteristischen Fluoreszenzmuster. Um eine Beurteilung über die Bindungseigenschaften von einem oder mehreren Antikörper zu diskutieren, werden zunächst die Inkubation der weiteren Sequenzen betrachtet.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

b) Sequenz 6: KIHAREIFDSRGNPT

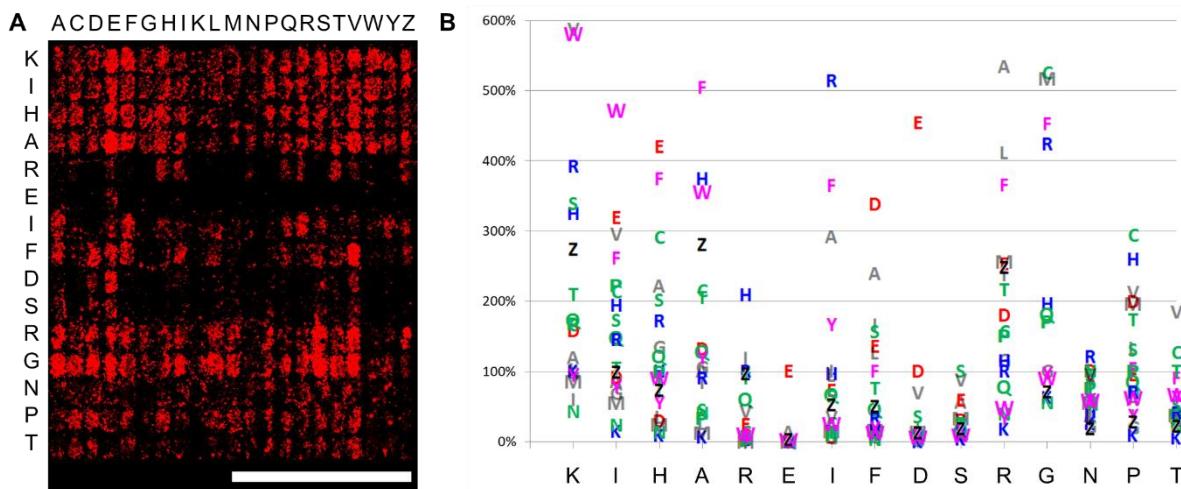


Abbildung 27: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids KIHAREIFDSRGNPT nach Inkubation mit Serum RA11 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids KIHAREIFDSRGNPT (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Substitutionsanalyse der Sequenz KIHAREIFDSRGNPT zeigt ein charakteristisches Fluoreszenzmuster bei der Inkubation mit Serum RA11 (Abbildung 27A). Allgemein sind die Signale der Substitutionsanalyse schwerer zu erkennen und weist unregelmäßige Strukturen der Spots auf, wodurch lediglich vage Aussagen über das Bindungsmotiv getroffen werden können. Dies könnte einerseits an der Qualität der Arraysynthese liegen oder einer Kontamination der Inkubation, sowie an der Konzentration und möglichen schlechten Spezifität des Antikörpers. Die Auswertung des Aminosäuren-Plots (Abbildung 27B) zeigt eine hohe relative Fluoreszenzintensität der Positionen 1-4, 7-8 und 11-15, sowie eine Anbindung von nahezu allen Substitutionsvarianten. Lediglich die Aminosäuren Lysin, Glycin und Citrullin an den Positionen 13-15 und die Aminosäuren Lysin, Methionin und Leucin an Position 4 verhindern eine Bindung des Antikörpers. Die ursprüngliche Aminosäure Arginin an Position 5 kann durch die Aminosäuren Threonin, Citrullin, Isoleucin und Histidin substituiert werden. Glutaminsäure an Position 6 besitzt keine möglichen Substitutionsvarianten und kann daher als essenziell betrachtet werden. Asparaginsäure an Position 9 kann lediglich durch Valin und Glutaminsäure ersetzt werden. Serin an Position 10 kann durch Alanin, Glutaminsäure und Valin substituiert werden.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Die Darstellung dieses möglichen Bindungsmotivs T/Z/R/I/H-E-x-x-V/D/E-A/E/V/S ist ebenfalls in Tabelle 5 zusammengefasst. Die anderen eingesetzten Rheumaseren zeigten keine charakteristischen Fluoreszenzmuster dieser Sequenz.

Tabelle 5: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz KIHAREIFDSRGNPT für Serum RA11. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz																
	K	I	H	A	R	E	I	F	D	S	R	G	N	P	T		
RA11	x	x	x	!KML	TZRIH	E	x	x	VDE	AEVS	!WY		!KGZ	!KGZ	!KGZ		

c) Sequenz 7: LEGTTZLTRK

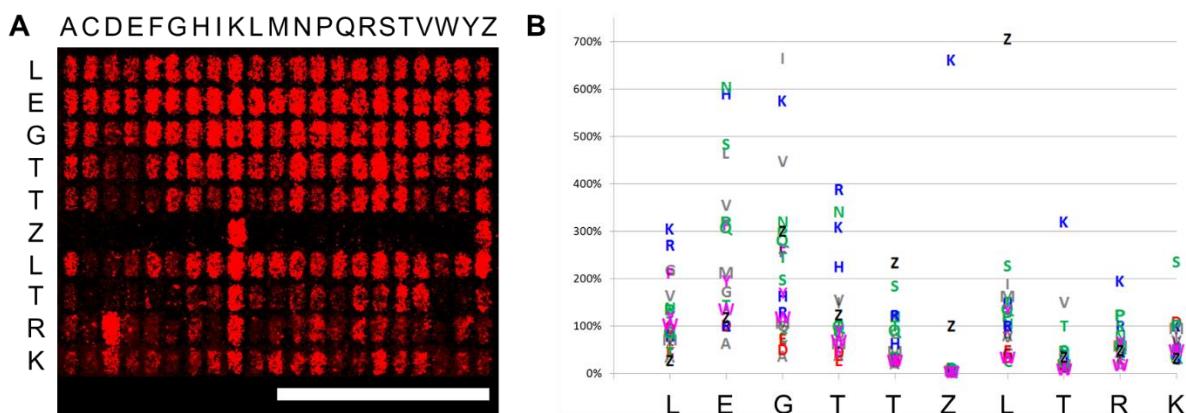


Abbildung 28: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids LEGTTZLTRK nach Inkubation mit Serum RA2 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids LEGTTZLTRK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Substitutionsanalyse der Sequenz LEGTTZLTRK zeigt bei der Inkubation mit Serum RA2 und RA6 ein charakteristisches Fluoreszenzmuster. Der Fluoreszenzscan der Inkubation mit Serum RA2 (Abbildung 28A) zeigt vermutlich ein Motiv in der Mitte der Sequenz. Die genau Analyse über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 28B) bestätigt die visuelle Vermutung. Die Aminosäure Citrullin an Position 6 ist essenziell für die Bindung des Antikörpers und kann lediglich durch Lysin substituiert werden. Die

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Aminosäure Threonin an Position 8 kann lediglich durch Valin und Lysin ersetzt werden. Die Positionen 1-5, 7, 9 und 10 besitzen eine deutliche Fluoreszenzintensität bei allen Substitutionsvarianten. Daher könnte ein mögliches Bindungsmotiv Z/K-x-T/V/K sein könnte, welches tabellarisch in Tabelle 6 mit der Inkubation von Serum RA6 zusammengefasst ist.

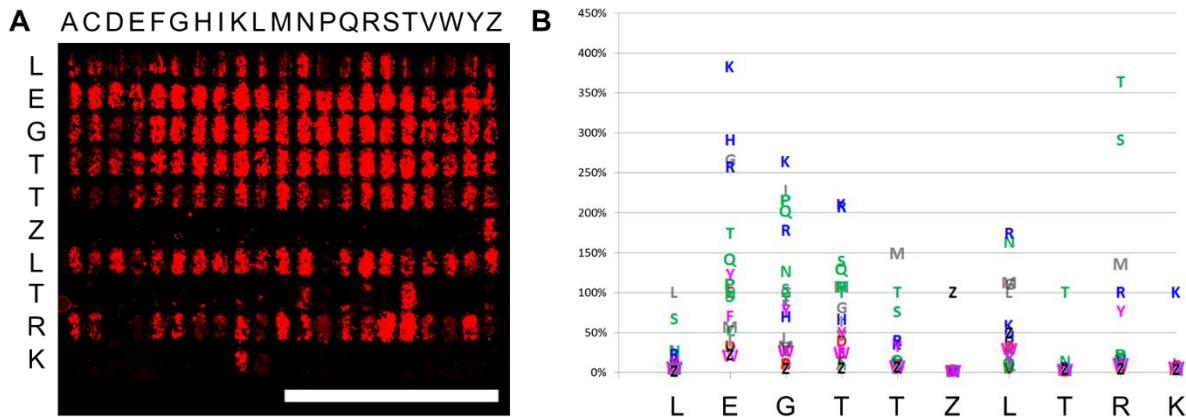


Abbildung 29: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids LEGTTZLTRK nach Inkubation mit Serum RA6 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids LEGTTZLTRK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Serum RA6 besitzt ebenfalls ein charakteristisches Fluoreszenzmuster bei der Substitutionsanalyse der Sequenz LEGTTZLTRK (Abbildung 29A). Visuell ist ebenfalls ein Bindungsmotiv in der Mitte bzw. am Ende der Sequenz zu erkennen. Die Analyse des Aminosäuren-Plots (Abbildung 29B) bekräftigt die Annahme durch die alleinige Bindung der Aminosäuren Citrullin an Position 6, Threonin an Position 8 und Lysin an Position 10. Die Positionen 1-4 und 7 zeigen keine spezifischen Bindungspräferenzen, wobei in Position 7 die Antikörperbindung durch Prolin verhindert wird. Die ursprüngliche Aminosäure Threonin an Position 5 kann im Aminosäuren-Plot durch Methionin und Serin substituiert werden, wobei die Signale der Peptidspots im Fluoreszenzscan ebenfalls einige deutlich sichtbare Substitutionsvarianten zeigen. Position 9 weist ein ähnliches Verhalten mit der Bindung der Aminosäuren Arginin, Methionin, Serin, Threonin und Tyrosin auf. Allerdings besteht in diesem Fall auch die Vermutung, dass die Bindungsspezifität eher niedrig ausfällt. Somit ergibt die

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Inkubation mit RA6 ein potenzielles Bindungsmotiv: (T/M/S)-Z-x-T-(R/M/S/T/Y)-K. Die Darstellung des Bindungsmotivs ist zum Vergleich mit dem Motiv von Serum RA2 in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz LEGTTZLTRK für Serum RA2 und RA6. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz										
	L	E	G	T	T	Z	L	T	R	K	
RA2	x	x	x	x	x	ZK	x	TVK	x	x	
RA6					STM	Z	!P	T	YRMST [!DE]	K	

Anhand der tabellarischen Darstellung zeichnen sich Gemeinsamkeiten in den Bindungsmotiven bei den Aminosäuren Z in Position 6, sowie T in Position 8 ab. Die Varianz in den Aminosäuren des möglichen Epitops sind vermutlich auf die hohe Antikörpervielfalt zurückzuführen, die durch die somatische Rekombination der Gensegmente der Antikörper entsteht^[111, 119]. Zusätzlich kann durch die somatische Hypermutation der kombinierten Gene, welche Mutationen durch Veränderung einzelner Basen einführt, das Antikörperrepertoire erweitert werden^[193]. Diese hohe Varianz begünstigt die hohe Antikörpervielfalt, sowie kleine Veränderungen der Antikörperbindungsstellen. Bei der Betrachtung beider Motive, könnte ein mögliches gemeinsames Bindungsmotiv Z-x-T-x-(K) sein.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

d) Sequenz 9: MAZHLREYQDLLNVK

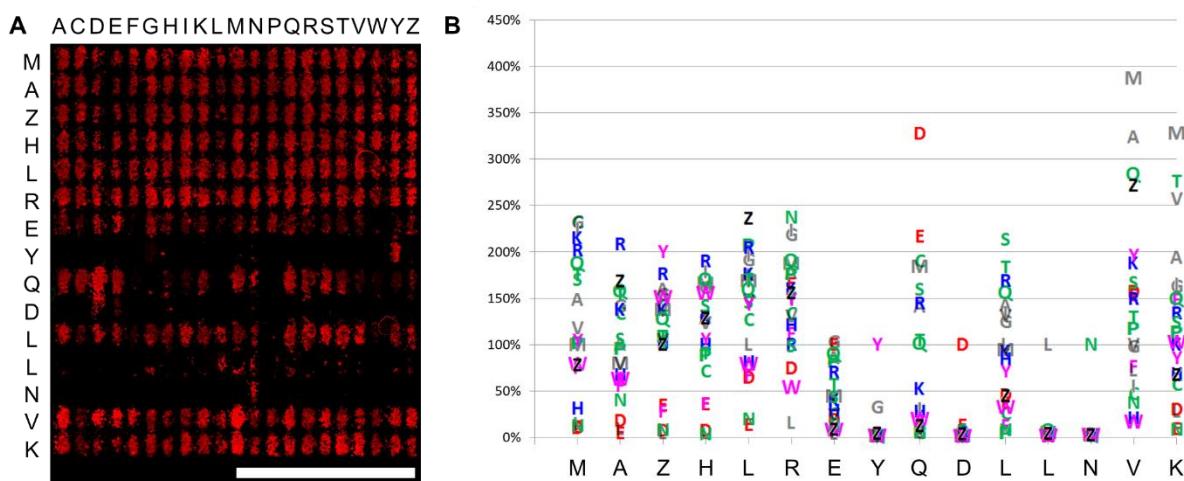


Abbildung 30: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids MAZHLREYQDLLNVK nach Inkubation mit Serum RA10 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids MAZHLREYQDLLNVK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Inkubation der Substitutionsanalyse der Sequenz MAZHLREYQDLLNVK mit Serum R10 besitzt visuell ebenfalls ein charakteristisches Muster für ein Bindungsmotiv in der Mitte der Sequenz (Abbildung 30A). Die Analyse über den Aminosäuren-Plot in Abbildung 30B zeigt ebenfalls eine Bindung aller Peptidvarianten an den Positionen 1-7, sowie 9,11 und 14-15. Die ursprünglichen Aminosäure Tyrosin an Position 8 hat eine alleinige Fluoreszenzemission bei der originalen Aminosäure, ebenso wie Asparaginsäure an Position 10, Leucin an Position 12 und Asparagin an Position 13. Dadurch könnten hier eventuell auch weitere Aminosäuren substituiert werden. Trotzdem ergibt sich ein mögliches Bindungsmotiv: Y-x-D-x-L-N, welches in der nachfolgenden Tabelle dargestellt ist.

Tabelle 7: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz MAZHLREYQDLLNVK für Serum RA10. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

	M	A	Z	H	L	R	E	Y	Q	D	L	L	N	V	K
Serum	x	x	x	x	x	x	x	Y	x	D	x	L	N	x	x
RA10	x	x	x	x	x	x	x	Y	x	D	x	L	N	x	x

e) Sequenz 11: YLQYTDETFZTTIEK

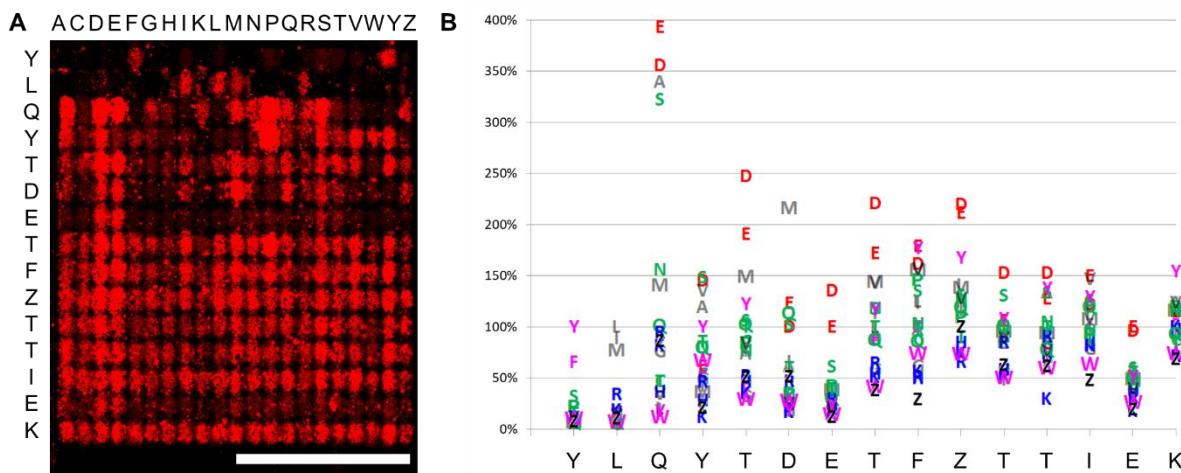


Abbildung 31: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids YLQYTDETFZTTIEK nach Inkubation mit Serum RA1 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids YLQYTDETFZTTIEK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Substitutionsanalyse der Sequenz YLQYTDETFZTTIEK zeigen bei der Inkubation mit Serum RA1 und RA6 ein charakteristisches Fluoreszenzmuster. Der Fluoreszenzscan der Inkubation mit Serum RA1 (Abbildung 31A) besitzt allerdings bei nahezu allen Peptidvariationen eine starke Fluoreszenzemission, weshalb die Wahrscheinlichkeit eines Bindungsmotivs gering ist. Auch der Aminosäuren-Plot (Abbildung 31B) zeigt eine hohe Anzahl an möglichen Substitutionsvarianten an den Positionen 3-6 und 8-13, sowie 15. Die Aminosäure Tyrosin an Position 1 kann lediglich durch Phenylalanin substituiert werden. Leucin an Position 2 kann durch Methionin und Isoleucin ersetzt werden. Glutaminsäure an den Positionen 7 und 14 kann jeweils durch Asparaginsäure substituiert werden. Die getroffenen Aussagen sind allerdings durch die allgemeine hohe Fluoreszenzintensität bei nahezu allen Substitutionsvarianten mit Vorsicht zu betrachten. Die Zusammenfassung der Beobachtungen, sowie dem möglichen Bindungsmotiv Y/F-L/I/M-x-x-x-D/E ist mit der Inkubation des Serums RA6 in Tabelle 8 dargestellt.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

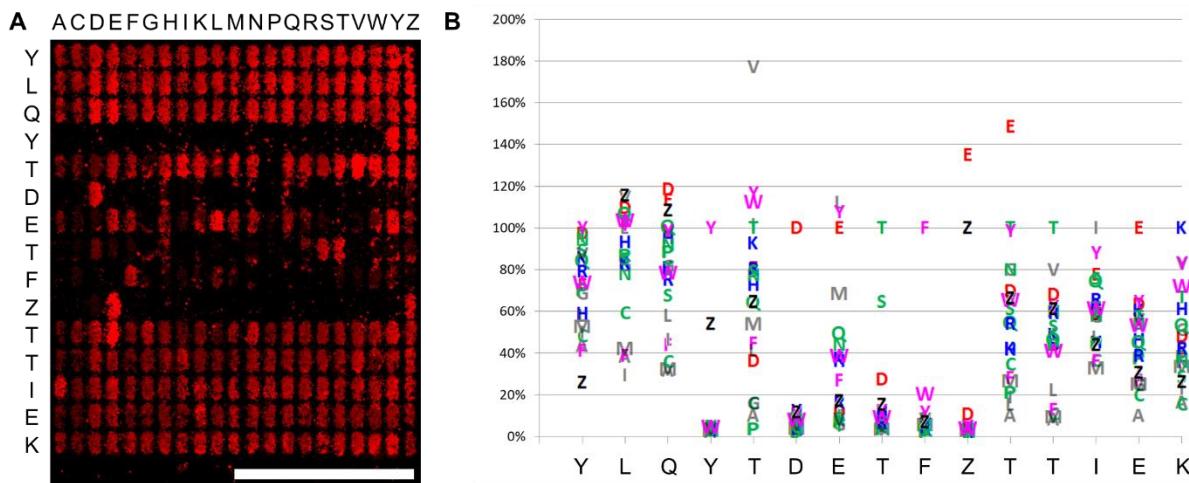


Abbildung 32: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids YLQYTDETFZTTIEK nach Inkubation mit Serum RA6 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids YLQYTDETFZTTIEK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Inkubation der Substitutionsanalyse der Sequenz YLQYTDETFZTTIEK mit Serum RA6 (Abbildung 32A) zeigt voraussichtlich ein Bindungsmotiv in der Mitte der Sequenz. Auch die Auswertung durch den Aminosäuren-Plot (Abbildung 32B) zeigt eine Bindung aller Peptidvarianten an den Positionen 1-3, sowie 5 und 11-15, wobei die Substitution von Prolin an Position 5 eine Bindung des Antikörpers verhindert. Tyrosin an Position 4 kann lediglich ggf. durch Citrullin substituiert werden. Die Aminosäuren Asparaginsäure an Position 6, sowie Phenylalanin an Position 9 besitzen eine alleinige Bindung der originalen Peptidvariante. Threonin in Position 8 kann durch Serin substituiert werden. Citrullin an Position 10 kann durch Glutaminsäure ersetzt werden. Glutaminsäure an Position 6 kann durch die Aminosäuren Methionin, Tyrosin und Leucin substituiert werden. Somit könnte ein mögliches Bindungsmotiv Y-x-D-E/M/Y/L-T-F-Z/E sein, welches mit der Inkubation von Serum RA1 in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst ist.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Tabelle 8: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz YLQYTDETFZTTIEK für Serum RA1 und RA6. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Y	L	Q	Y	T	D	E	T	F	Z	T	T	I	E	K
RA1	YF	MIL	x	x	x	x	ED	x	x	x	x	x	x	DE	x
RA6				ZY	!P	D	MEYL	ST	F	ZE	x	x	x	x	x

Die Inkubation mit den Seren RA1 und RA6 zeigt zwar ein Bindungsmotiv der Inkubation von Serum RA6, jedoch ist ein Bindungsmotiv bei Serum RA1 eher unwahrscheinlich. Die Inkubation mit Serum RA1 besitzt insgesamt hoher Fluoreszenzintensitäten nahezu aller Substitutionsvarianten, wodurch ein Motiv hier eher unwahrscheinlich ist.

Bei der Betrachtung der vorangegangenen Experimente zur Untersuchung von Bindungsstudien kann allgemein eine erfolgreiche Synthese von diversen Peptiden aus der Literatur mit dem nano3D-Drucker verzeichnet werden. Zudem konnten die posttranslationalen Modifikationen Citrullin, Homocitrullin, Acetyllysin und Hydroxyprolin in die Peptidarrays integriert werden. Die Analyse der synthetisierten Peptidarrays zum Screening von verschiedenen potenziell relevanten Peptiden der rheumatoïden Arthritis mit 13 verschiedenen Patientenserien ergab eine hohe Anzahl an gebundenen Peptiden. Unter Berücksichtigung der Suche eines Antikörpers, der ein ähnliches Bindungsmotiv in mehreren Seren besitzt, wurden 37 Peptide identifiziert, die von mindestens drei Seren von Patienten mit Rheumatoïder Arthritis gebunden wurden. Anschließend wurden 11 Peptide ausgewählt, um die genauen Aminosäuresequenzen der Bindungsmotive der Antikörper über Substitutionsanalysen zu ermitteln. Durch die Substitutionsanalysen konnten fünf potenzielle Bindungsmotive E-Z-G/P, T/Z/R/I/H-E-x-x-V/D/E-A/E/V/S, Z-x-T-x-K, Y/Z-x-D-L/M/Y/E-T/S-F-Z/E, Y-x-D-x-L-N der Peptide 5-7, 9 und 11 detektiert werden, welche in Tabelle 9 zusammengefasst sind.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Tabelle 9: Zusammenfassung der detektierten möglichen Bindungsmotive. Die originalen Aminosäuren sind hervorgehoben.

Peptidsequenz	Nr.	Mögliches Bindungsmotiv	Gebundene Seren
AEFTGZHDAHLNGK	1	-	-
ALGHLDLSGNZLRK	2	-	-
EEQEVSWTQYTQZK	3	-	-
EFPSRGKSSSYSKQF	4	-	-
EGAEZGLSAIR	5	E-Z-G/P	RA1
KIHAREIFDSRGNPT	6	T/Z/R/I/H- E-x-x-V/D/E-A/E/V/S	RA11
LEGTTLTRK	7	Z-x-T-x(-K)	RA2 und RA6
LTNGZFREHNAK	8	-	-
MAZHLREYQDLLNVK	9	Y-x-D-x-L-N	RA10
PLTSFZQRK	10	-	-
YLQYTDETFTTIEK	11	Y/Z-x-D-E/(L/M/Y)-T/S-F-Z/E	(RA1 und) RA6

Die Motive der Peptide 5, 6 und 9 wurden jeweils durch einzelne, aber unterschiedliche Patientenserien gebunden. Das Motiv von Peptid 11 wurde zwar von zwei Seren gebunden, allerdings sind die Signale des ersten Serums durch eine hohe Gesamtfluoreszenz nahezu aller Substitutionsvarianten nicht eindeutig zu interpretieren. Daher kann hier nur von einem deutlichen Motiv eines Serums des Peptids gesprochen werden. Die Tatsache, dass die Motive nur durch einzelne Seren gebunden wurden, kann die ursprüngliche Annahme eines gemeinsamen Antikörpers in mehreren Patientenserien nicht bestätigen. Nichtsdestotrotz konnten vier mögliche Motive von einzelnen Seren identifiziert werden. Durch weitere Studien über eine Ausweitung des Serenpools auf mehrere Patienten könnten weitere Erkenntnisse über die ausgewählten Peptide und mögliche identische Motive erlangt werden.

Im Fall des Motivs der Sequenz 7 konnten Gemeinsamkeiten der zwei bindenden Seren entdeckt werden, wodurch ein potenzielles gemeinsames Bindungsmotiv vorhanden ist. Die Bindungsaffinität des Antikörpers variiert leicht, wodurch die möglichen Substitutionen sich bei den Seren etwas unterscheiden. Allerdings konnten die ursprünglichen Aminosäuren in beiden Motiven der Seren detektiert werden, wodurch hier die Spekulation eines ähnlichen Antikörpers beider Seren besteht. Dieser könnte ein gebildeter Autoantikörper gegen rheumatoide Arthritis vom Immunsystems sein und wäre somit potenziell relevant für die ursprüngliche Annahme einer gemeinsamen Ursache. Einerseits könnten durch gemeinsame Faktoren, wie genetische Prädispositionen, Antigen Mimikry, Fehler in der Immunregulation,

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Umweltfaktoren oder Virusinfektionen die Ausbildung von ähnlichen Autoimmunantikörpern begünstigen. Andererseits könnte auch eine posttranskriptionale Modifikation die Ursache für die Ausbildung von Autoantikörpern gegen rheumatoide Arthritis sein. Daher wurden ebenfalls speziell die Relevanz von PTMs in den detektierten Epitopen betrachtet. In den Motiven der Peptide 5, 7 und 11 konnte jeweils Citrullin (Z) als essenzielle Aminosäure für die Antikörperbindung entdeckt werden. Dadurch besteht eine mögliche Relevanz von Citrullin in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Hierbei könnte die posttranskriptionale Modifikation möglicherweise der Grund sein, weshalb sich Antikörper gegen das eigene Gewebe bilden, da potenziell Citrullin als körperfremd erkannt wird. Diese Annahme kann durch weitere Studien mit mehr Patientenserien, sowie einer weiteren Auswahl an diagnostischen Peptiden weiter erforscht werden.

5.2 Untersuchung der Rolle von Citrullin in diagnostischen Peptiden für Rheumatoide Arthritis

Um die Bindungsstudien zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis auszuweiten, soll in Kooperation mit Prof. Dr. Reinhard Voll (Uniklinikum Freiburg) eine Inkubation von Peptidsequenzen von citrulliniertem Kollagen Typ 2, sowie citrulliniertem Vimentin durchgeführt werden. Kollagen Typ 2 ist ein wichtiges gelenkspezifisches Autoantigen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Durch die Citrullinierung von Kollagen Typ 2 können Veränderungen in der Erkennung von immundominanten Epitopen festgestellt werden^[194]. Zudem treten ACPAs spezifisch in Kombination mit citrulliniertem Kollagen Typ 2 auf und konnten so mit Rheumatoider Arthritis in Verbindung gesetzt werden^[195-197]. Außerdem konnten auch spezifische Antikörper gegen citrullinierte Sequenzen von Vimentin nachgewiesen werden^[198]. Diese Nachweise von Antikörper gegen citrulliniertes Kollagen Typ 2 und Vimentin sollen in dieser Arbeit in Form von Peptidarrays ebenfalls weiter untersucht werden. Dabei soll erneut vor allem die Antigen-Antikörper Bindungen bei mehreren Patientenserien untersucht werden, um mögliche gemeinsame Bindungsmotive und ggf. identische oder ähnliche Antikörper aufzudecken. Dadurch könnten die detektierten Bindungsmotive möglicherweise in Zukunft als diagnostische Marker für rheumatoide Arthritis dienen. Weiterhin sollen die detektierten Motive auf eine potenzielle Relevanz von Citrullin untersucht werden, da die Möglichkeit besteht, dass eine PTM die Ursache zur Ausbildung von Autoantikörpern der rheumatoiden Arthritis sein könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothesen sollen die citrullinierten Proteine in überlappenden Peptidsequenzen synthetisiert werden und mit Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis inkubiert werden. Zusätzlich sollen diese Peptidarrays ebenfalls mit Seren von Patienten mit dem Sjögrens Syndrom inkubiert werden, da das Sjögrens Syndrom häufig in Kombination mit anderen rheumatischen Erkrankungen auftreten kann^[199], wodurch hier ebenfalls eine gemeinsamer oder ähnlicher Antikörper in Frage kommen könnte. Möglicherweise könnte auch eine ähnliche Virusinfektionen die Bildung eines ähnlichen Antikörpers bzw. einer Autoimmunreaktion hervorrufen^[122]. Ebenso könnten diese Pathogene ähnliche Strukturen zu körpereigenen Antigenen besitzen, wodurch eine Kreuzreaktion, sog. Molekulare Mimikry bzw. Antigen Mimikry, ausgelöst werden kann.

5.2.1 Epitopmapping von citrulliniertem Kollagen zur Evaluierung von Antigen Mimikry bei rheumatoider Arthritis

In einem ersten Experiment sollen zunächst citrulliniertes Kollagen Typ 2 synthetisiert und mit den Rheumaseren RA7-13 inkubiert werden. Zusätzlich zu den Arrays mit linearen Peptidsequenzen sollen auch Arrays mit zyklischen Peptidsequenzen inkubiert werden. Durch die Zyklisierung soll der mögliche Einfluss von anti-CCP Antikörpern erforscht werden, welche speziell an cyclische citrullinierte Peptide binden. Des Weiteren besitzt Kollagen Typ 2 einen hohen Anteil einer dreifach-helikalen Struktur, welche durch die Zyklisierung teilweise nachgeahmt werden könnte. Die anti-CCP Antikörper könnten somit andere Epitope, als die Inkubation der linearen Peptide aufzeigen, weshalb auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Bindungsverhalten durch die konformationelle Änderung der Peptide geachtet werden und mit den Ergebnissen des Bindungsverhaltens der Antikörper an die linearen Peptidarrays verglichen werden soll. Zusätzlich zu der Inkubation mit den Rheumaseren, soll ebenfalls die Inkubation mit den Sjögrens Syndrom Seren betrachtet werden. Hier soll ebenfalls beurteilt werden welche Unterschiede oder Gemeinsamkeit zwischen den linearen und zyklischen Peptidarrays bestehen. Da das Sjögrens Syndrom oft in Kombination mit rheumatischen Krankheiten auftritt, soll abschließend ein Vergleich zu den Rheumaseren gezogen werden und beurteilt werden, ob die gleichen Epitope durch Antikörper gebunden werden und ggf. eine mögliche Antigen Mimikry stattfindet.

Hierzu wurde das Protein in Peptidsequenzen von jeweils 15 Aminosäuren aufgeteilt, die jeweils eine Überlappung von einer Aminosäure zur vorherigen Peptidsequenz besitzen. Somit kann die komplette Aminosäuresequenz von Kollagen Typ 2 (Aminosäuresequenz aus UniProt^[200]) in überlappenden Peptiden dargestellt werden. Zudem wurden alle Arginine der Sequenz durch Citrulline ausgetauscht. Es wurden außerdem zwei verschiedene Arraytypen synthetisiert, bestehend aus Peptiden mit linearer Sequenzabfolge, sowie zyklisierte Peptide. Die zyklischen Peptide wurden analog zu den linearen Peptiden synthetisiert und abschließend über eine Thioether Zyklisierung einer N-terminalen Bromacetylgruppe mit der Thiolgruppe eines C-terminalen Cysteins zyklisiert. Die Arraysynthese wurde von PEPperPRINT GmbH durchgeführt. Die bereits entschützten Syntheseoberflächen wurden mit den Seren RA7-13 und SjS1-6 (1:100) und abschließend mit dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647 und dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 inkubiert.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

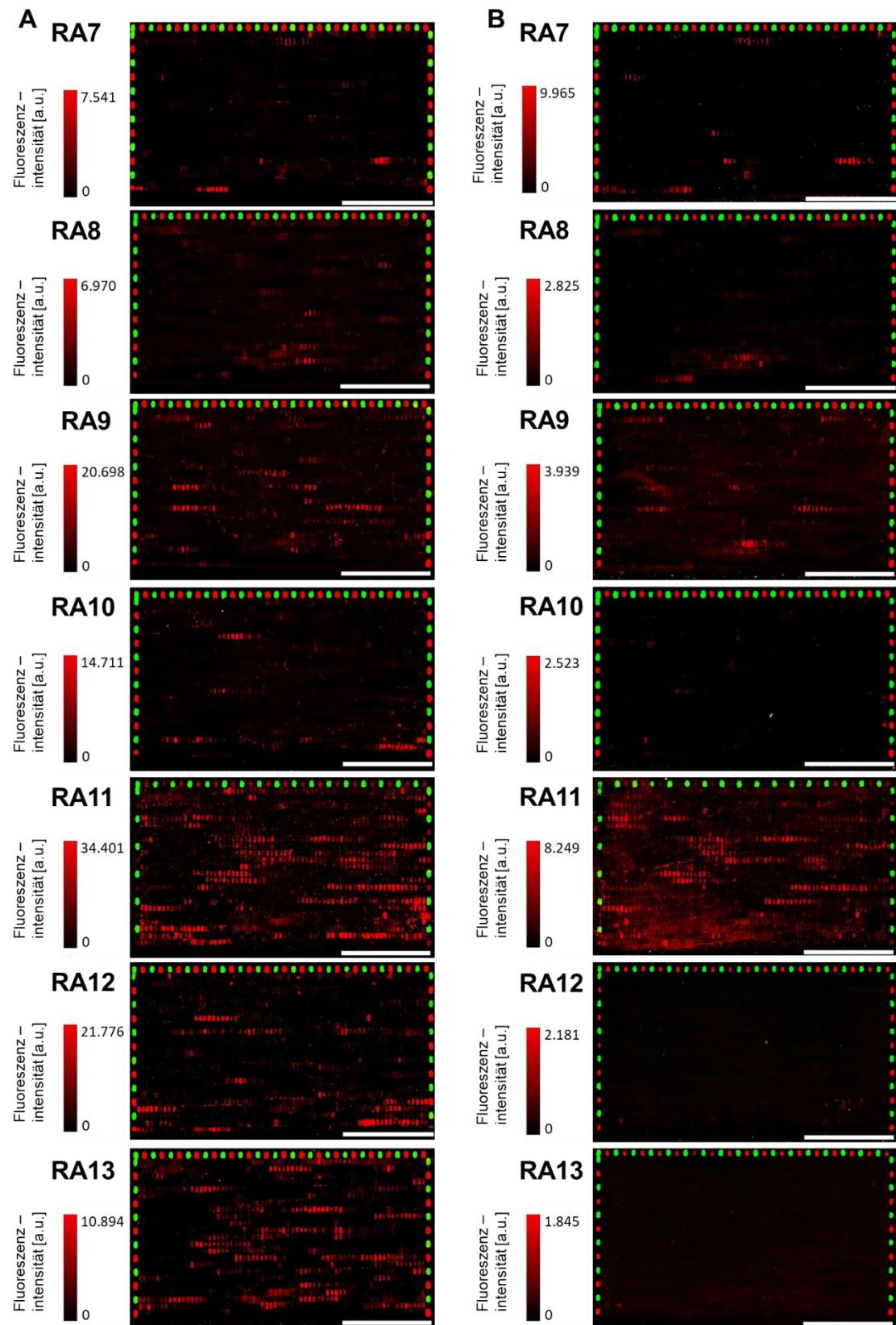


Abbildung 33: Fluoreszenzscans des linearen (A) und zyklischen (B) Epitopmappings von Kollagen Typ2 nach Inkubation mit den Seren RA7-13, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: $582 \text{ nm} \pm 37,5 \text{ nm}$ und $677 \text{ nm} \pm 22,5 \text{ nm}$. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Abbildung 33 zeigt die Fluoreszenzscans des linearen und zyklischen Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 nach der Inkubation mit den Rheumaseren RA7-13. Zunächst werden die Seren einzeln betrachtet und hinsichtlich der Antikörperbindung an die linearen und zyklischen Peptide verglichen. Anschließend erfolgt die Analyse der Inkubation mit den SjS Seren, sowie deren Vergleich mit den RA Seren. Serum RA7 besitzt eine nahezu identische Verteilung der Spotanzahl, sowie der Fluoreszenzintensitäten bei den linearen und zyklischen Peptiden. Im unteren Drittel beider Scans sind jeweils zwei deutliche Banden mit mehreren Peptiden nebeneinander zu erkennen. Durch die Synthese der Peptide in überlappenden Peptidsequenzen zeigen mehrere Peptide nebeneinander eine Fluoreszenzemission, da das Epitop in mehreren Peptiden vorhanden ist. Sobald das Epitop nicht mehr vollständig in der Peptidsequenz abgebildet wird, kann der Antikörper nicht mehr daran binden und es wird keine Fluoreszenzemission detektiert. Dieses Signalmuster in unmittelbarer Nähe bedeutet, dass hier eine Antigenbindestelle (Epitop) eines Antikörpers vorliegt. Die Fluoreszenzintensitäten von Serum RA7 der linearen und zyklischen Peptide liegen mit einem Maximum von 7.541 a.u. der linearen Peptide und 9.965 a.u in einem ähnlichen Bereich. der zyklischen Peptide.

Serum RA8 besitzt ebenfalls eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenzintensitäten, allerdings sind bei den linearen Peptiden mehrere Banden zu erkennen. Auch das Intensitätsmaximum von 6.970 a.u. der linearen Peptide beträgt mehr als das Doppelte des Intensitätsmaximums der zyklischen Peptide mit 2.285 a.u.. Diese Beobachtung könnte mit der Bevorzugung des Serumantikörpers an lineare Bindungsstellen begründet werden. Somit könnte der Antikörper keine oder nur geringe Bindungsaaffinität zu den zyklischen Peptiden besitzen. Die zyklischen Peptide könnten durch die künstliche Zyklisierung nicht der natürlichen Konformation des Proteins entsprechen, wodurch die Antikörper ggf. nicht an die zyklischen Peptide binden. Durch die ähnliche Fluoreszenzintensität der jeweiligen HA- und Polio-Kontrollpeptide der linearen und zyklischen Arrays, kann eine geringere Qualität der Synthese der zyklischen Arrays ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung tritt auch in den folgenden Analysen der Rheumaseren auf. Die Fluoreszenzscans des Serums RA9 zeigen ähnliche Eigenschaften wie der Scan des Serums RA8. Auch hier sind vorrangig die identischen Peptide der linearen und zyklischen Peptide über die Fluoreszenzemission detektierbar. Des Weiteren können bei den linearen Peptiden potenziell mehr Epitope detektiert werden, als bei den zyklischen Peptiden. Die

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

maximale Fluoreszenzintensität von 20.698 a.u. der linearen Peptide ist zudem um das Fünffache höher, als die der zyklischen Peptide mit 3.939 a.u.. Serum RA10 zeigt bei den zyklischen Peptiden nur sehr schwer erkennbare Banden, wohingegen die linearen Peptidbanden deutlicher zu erkennen sind. Diese Beobachtung spiegelt sich auch im Intensitätsmaximum wider, welches bei den linearen Peptiden mit 14.711 a.u. um ein Sechsfaches höher ist als das Maximum der zyklischen Peptide mit 2.523 a.u.. Serum RA11 besitzt bei den linearen und den zyklischen Peptiden sehr viele Peptidbanden, wovon auch eine Vielzahl an der identischen Position des jeweiligen Arrays liegt. Allerdings ist auch hier die maximale Fluoreszenzintensität der linearen Peptide mit 34.401 a.u. um ein Vierfaches höher als die der zyklischen Peptide mit einer maximalen Intensität von 8.249 a.u.. Serum RA12 zeigt bei den linearen Peptiden viele deutliche Peptidbanden, während die Signale der zyklischen Peptide kaum erkennbar sind. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch das unterschiedliche Intensitätsmaximum der zyklischen Peptide von 2.181 a.u. zu dem Maximum der linearen Peptide von 21.776 a.u. unterstützt. Ein ähnliches Verhalten der Bindungseigenschaften ist ebenfalls bei den linearen und zyklischen Peptiden des Serums RA13 zu sehen. Dies spiegelt sich ebenfalls in der maximalen Intensität der zyklischen Peptide, welche mit 1.845 a.u. um ein Fünffaches niedriger ist, als das Maximum der linearen Peptide mit 10.894 a.u..

Im Vergleich der Fluoreszenzscans der zyklischen Peptide mit denen der linearen Peptide ist ein deutlich geringeres Intensitätsmaximum der zyklischen Arrays Rheumaseren zu erkennen. Dadurch kann allgemein die Folgerung gezogen werden, dass die linearen Peptide eine höhere Bindungsaffinität der Antikörper besitzen. Dies könnte möglicherweise durch die sterische Hinderung durch die Zyklisierung begründet werden. Möglichweise könnten einerseits die Peptide einen zu geringen Abstand besitzen, dass ausreichend Serum- und Sekundärantikörper an die Peptide binden können. Die natürliche Konformation des Proteins könnte zudem für Epitope an weit entfernten Aminosäuren innerhalb des Proteins sorgen, welche mit der Zyklisierung nicht nachgeahmt werden können. Andererseits könnten die Serumantikörper primär lineare Bindungsstellen bevorzugen und somit nur geringe Bindungsaffinität zu zyklischen Peptiden besitzen. Der Vergleich der detektierten Epitope findet im Anschluss der Betrachtung der Inkubation der Sjögrens Syndrom Seren statt, um eine bessere Vergleichbarkeit aller detektierten Signale zu erhalten.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

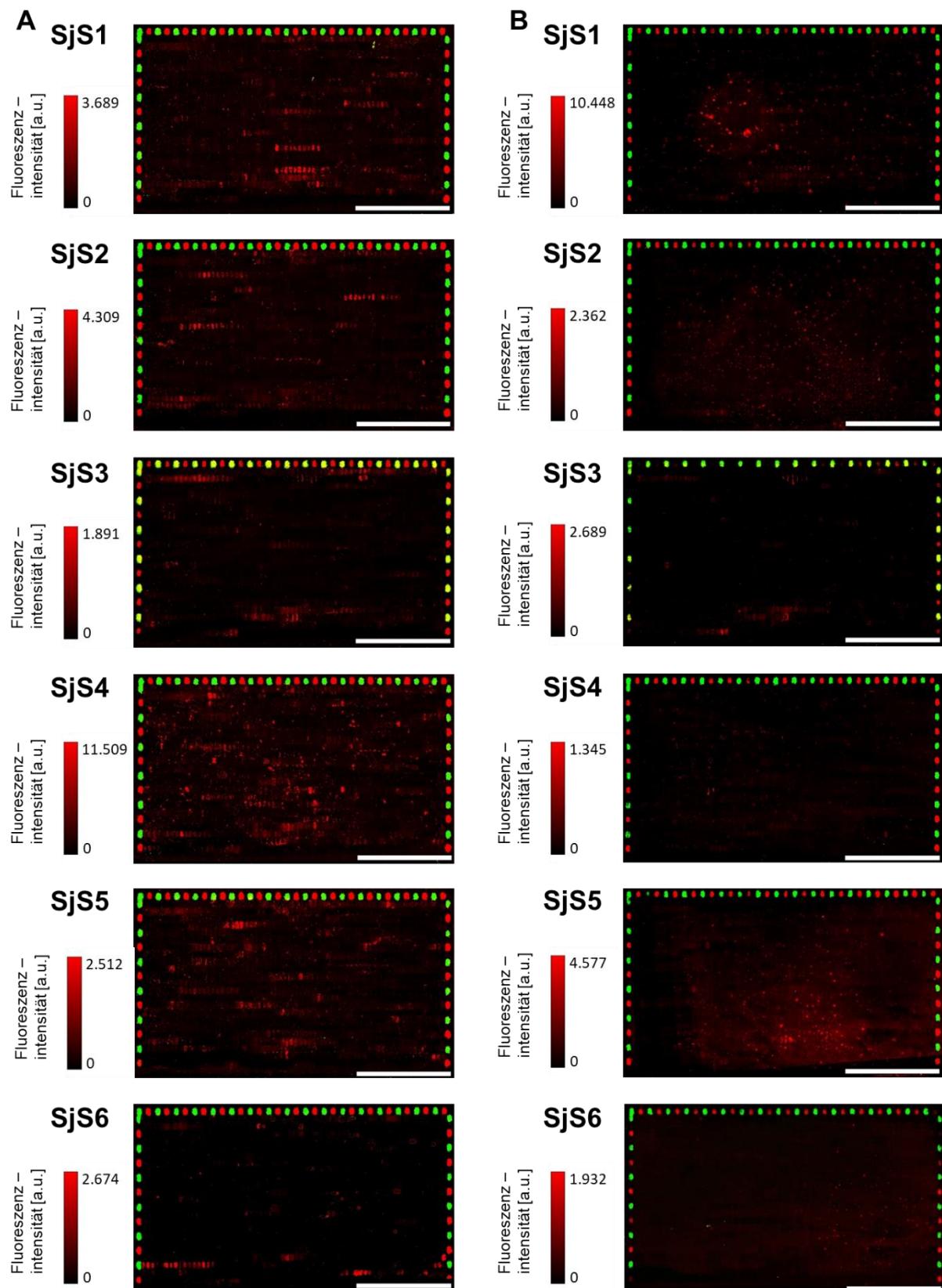


Abbildung 34: Fluoreszenzscans des linearen (A) und zyklischen (B) Epitopmappings von Kollagen Typ2 nach Inkubation mit den Seren SjS1-6, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: $582 \text{ nm} \pm 37,5 \text{ nm}$ und $677 \text{ nm} \pm 22,5 \text{ nm}$. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Abbildung 34 zeigt die Fluoreszenzscans des linearen und zyklischen Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 nach der Inkubation mit den Sjögrens Syndrom Seren SjS1-6. Zunächst werden die Seren einzeln betrachtet und hinsichtlich der Antikörperbindung an die linearen und zyklischen Peptide verglichen. Serum SjS1 zeigt einige mögliche Antigenbindungsstellen der linearen Peptide, welche teilweise auch im zyklischen Fluoreszenzscan zu erkennen sind. Allerdings sind im zyklischen Array einige Verunreinigungen zu sehen, ebenso wie eine hohe Hintergrundfluoreszenz, wodurch auch die maximale Fluoreszenzintensität bei 10.448 a.u. liegt. Die Verunreinigungen könnten ggf. durch die Inkubation oder durch die Serumqualität begründet werden. Eine Beeinträchtigung der Synthesequalität kann durch die ähnlichen Fluoreszenzintensitäten der HA-Kontrollpeptide ausgeschlossen werden. Die maximale Intensität der linearen Peptide liegt bei 3.689 a.u. und ist somit deutlich geringer, als die der zyklischen Peptide.

Serum SjS2 besitzt ebenfalls einige starke Peptidbanden des linearen Arrays, welche schwach im zyklischen Peptidarray zu erkennen sind. Die maximale Fluoreszenzintensität der linearen Peptide liegt bei 4.309 a.u., wohingegen der zyklische Peptidarray ein geringeres Intensitätsmaximum von 2.362 a.u. besitzt. Diese Beobachtungen lagen ebenfalls bei den Inkubationen mit den Rheumaseren vor. Deshalb wird die Vermutung einer bevorzugten Bindung der Antikörper an lineare Peptide bekräftigt. Zusätzlich sind bei dem zyklischen Peptidarray auch einige Verunreinigungen und eine deutliche Hintergrundfluoreszenz zu erkennen. Serum SjS3 besitzt ebenfalls einige gut erkennbare Peptidbanden, jedoch liegt die maximale Fluoreszenzintensität bei 1.891 a.u.. Die zyklischen Peptide besitzen eine etwas höhere maximale Intensität von 2.689 a.u. und die Peptidbanden befinden sich hauptsächlich an den identischen Positionen wie Epitope der linearen Peptide. Serum SjS4 zeigt im Fluoreszenzscans der linearen Peptidarrays einige schwach erkennbare Peptidbanden mit einer maximalen Fluoreszenzintensität von 11.509 a.u.. Zusätzlich sind auch hier einige Verunreinigungen erkennbar, welche ebenfalls auch im zyklischen Peptidarray vorhanden sind. Des Weiteren sind eine deutliche Hintergrundfluoreszenz und schwach erkennbare Peptidbanden vorhanden, welche sich hauptsächlich in den gleichen Positionen zu den linearen Peptiden befinden. Die schwach erkennbaren Peptide des zyklischen Arrays können mit der maximalen Fluoreszenzintensität begründet werden, da diese bei 1.345 a.u. liegt. Der lineare Peptidarray des Serums SjS5 besitzt ebenfalls einige gut erkennbare Peptidbanden

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

und besitzt eine maximale Fluoreszenzintensität von 2.512 a.u.. Die zyklischen Peptide sind hier allerdings kaum erkennbar, da eine starke Hintergrundfluoreszenz und Verunreinigung besteht, wodurch hier keine deutliche Aussage über die Peptidbanden getroffen werden kann. Die maximale Fluoreszenzintensität von 4.577 a.u. könnte durch die Verunreinigung oder durch ein gebundenes Peptid bedingt sein. Serum SjS6 besitzt bei den zyklischen Peptiden ebenfalls eine höhere Hintergrundfluoreszenz und keine erkennbaren Peptidbanden, wodurch mit dem Intensitätsmaximum von 1.932 a.u. keine deutlichen Aussagen getroffen werden können. Lediglich die linearen Peptide zeigen im unteren Bereich des Fluoreszenzscans zwei stärkere Peptidbanden mit einer maximalen Intensität von 2.674 a.u..

Allgemein sind die Peptidbanden bei nahezu allen zyklischen Arrays der Sjögrens Syndrom Seren durch eine schwache Intensität gekennzeichnet. Auch die maximalen Intensitäten der linearen Arrays sind mit einem Schnitt von ca. 2.000-3.000 a.u. insgesamt eher schwach im Vergleich zu den Intensitäten der Peptidarrays der Inkubation mit den Rheumaseren, welche das geringste Intensitätsmaximum von 6.970 a.u. besitzen. Diese Beobachtung könnte auf die geringere Antikörperkonzentration oder die Bindungsaffinität der Serumantikörper zurückzuführen sein. Die insgesamt schwächeren Signale der zyklischen Peptidarrays können ebenfalls bei der Inkubation mit den Rheumaseren beobachtet werden. Daher liegt auch hier vermutlich eine Bevorzugung des Antikörpers an lineare Epitope vor.

Im Folgenden soll ein Vergleich der Position der gefundenen linearen und zyklischen Epitope, sowie ein Vergleich der Epitope der Rheumaseren und der Sjögrens Syndrom Seren stattfinden. Zu dieser Auswertung wurden für ein Serum jeweils alle Intensitäten des Serums auf das Intensitätsmaximum des Serums normiert. Dieses Vorgehen wurde für alle Seren wiederholt, damit die gefundenen Epitope im gleichen Verhältnis innerhalb der unterschiedlichen Seren verglichen werden können. Des Weiteren wurde das 90 % Quantil der normierten Intensitäten berechnet und alle Werte gleich Null gesetzt, die unter diesem Wert waren. Dadurch kann die große Anzahl an detektierten Fluoreszenzsignalen minimiert werden, wodurch lediglich die stärksten und relevantesten Intensitäten für die Auswertung berücksichtigt werden. Die erhaltenen Daten werden in einer Heatmap dargestellt, wodurch alle Daten der linearen und zyklischen Peptide über die normierten Fluoreszenzintensitäten verglichen werden können.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

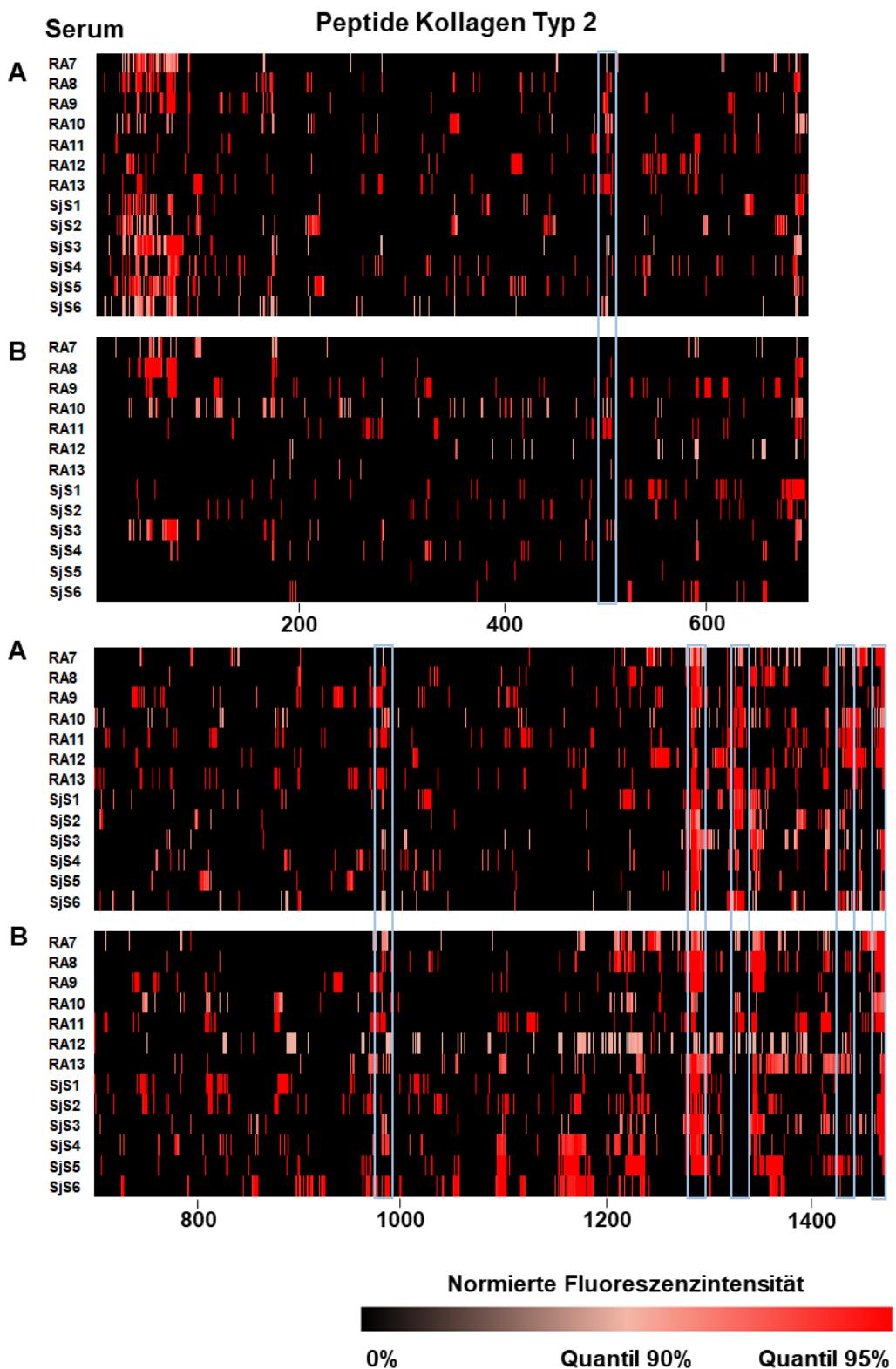


Abbildung 35: Heatmap der linearen (A) und zyklischen (B) citrullinierten Kollagen Typ 2 Peptide (Länge: 1473 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA7-13) und Sjögrens Syndrom Seren (SjS1-6). Die Fluoreszenzintensitäten wurden normierten auf das Intensitätsmaximum des jeweiligen Serums. Die blauen Rahmen entsprechen den Bereichen, die zur weiteren Substitutionsanalyse ausgewählt wurden.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Die Auswertung aller erhaltener Intensitäten über die Heatmap (Abbildung 35) zeigt die Darstellung der normierten Intensitäten aller Peptid für jedes RA- und SjS-Serum. Durch die Anordnung der Intensitäten der linearen (A) und zyklischen (B) Peptide untereinander, können die Signale jedes Peptids mit jedem Serum verglichen werden. Dabei ist besonders auffällig, dass viele Positionen der Intensitäten der linearen Peptide mit der Position der Intensitäten der zyklischen Peptide übereinstimmen, wodurch das identische Epitop, ob linear oder zyklisch, von einem potenziell gleichen oder ähnlichen Antikörper gebunden wird. Mit dem Ziel die Anzahl mögliche Epitope einzuschränken, wurden diese dahingehend beurteilt, wie viele Seren an möglichst viele aufeinanderfolgende Peptide gebunden haben. Dabei konnten 15 Sequenzen identifiziert werden, die von mindestens drei Seren und an sieben aufeinanderfolgende Peptide gebunden haben. Einerseits konnte beobachtet werden, dass hauptsächlich die gebundenen Antikörper an die linearen Peptide für die meisten detektierten Epitope in sieben aufeinanderfolgenden Peptide verantwortlich sind. Andererseits konnten festgestellt werden, dass die Epitope der linearen Peptide überwiegend identisch mit den Epitopen der zyklischen Peptide übereinstimmen. Zur weiteren Minimierung der Signale auf die vielversprechendsten Epitope, wurde der Rahmen der aufeinanderfolgenden Peptide auf 12 erweitert. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein Epitop mit einer hohen Bindungsaffinität innerhalb des angelegten Rahmens vorhanden ist. Ebenfalls wurde zur Vereinfachung überwiegend die Bindungseigenschaften der linearen Peptide unter der Inkubation der Rheumaseren berücksichtigt, da diese ebenfalls die stärksten Fluoreszenzintensitäten besitzen. Die Heatmap der Seren, die an zwölf aufeinanderfolgende Peptide gebunden haben, ist in Abbildung 36 dargestellt.

Anhand dieser Darstellung können die erhaltenen Signale auf ein essenzielles Minimum begrenzt werden. Zur weiteren Analyse wurden hauptsächlich die Peptidsequenzen gewählt, die von möglichst vielen Seren in dem festgelegten Rahmen gebunden wurden. Zudem wurde berücksichtigt, dass die Epitope in den Analysen der linearen und zyklischen Peptide enthalten sind, da diese sich größtenteils in den Positionen decken. Ebenfalls wurde die zuvor analysierte Fluoreszenzintensität berücksichtigt, die bei den linearen Peptidarrays am höchsten ausfiel.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

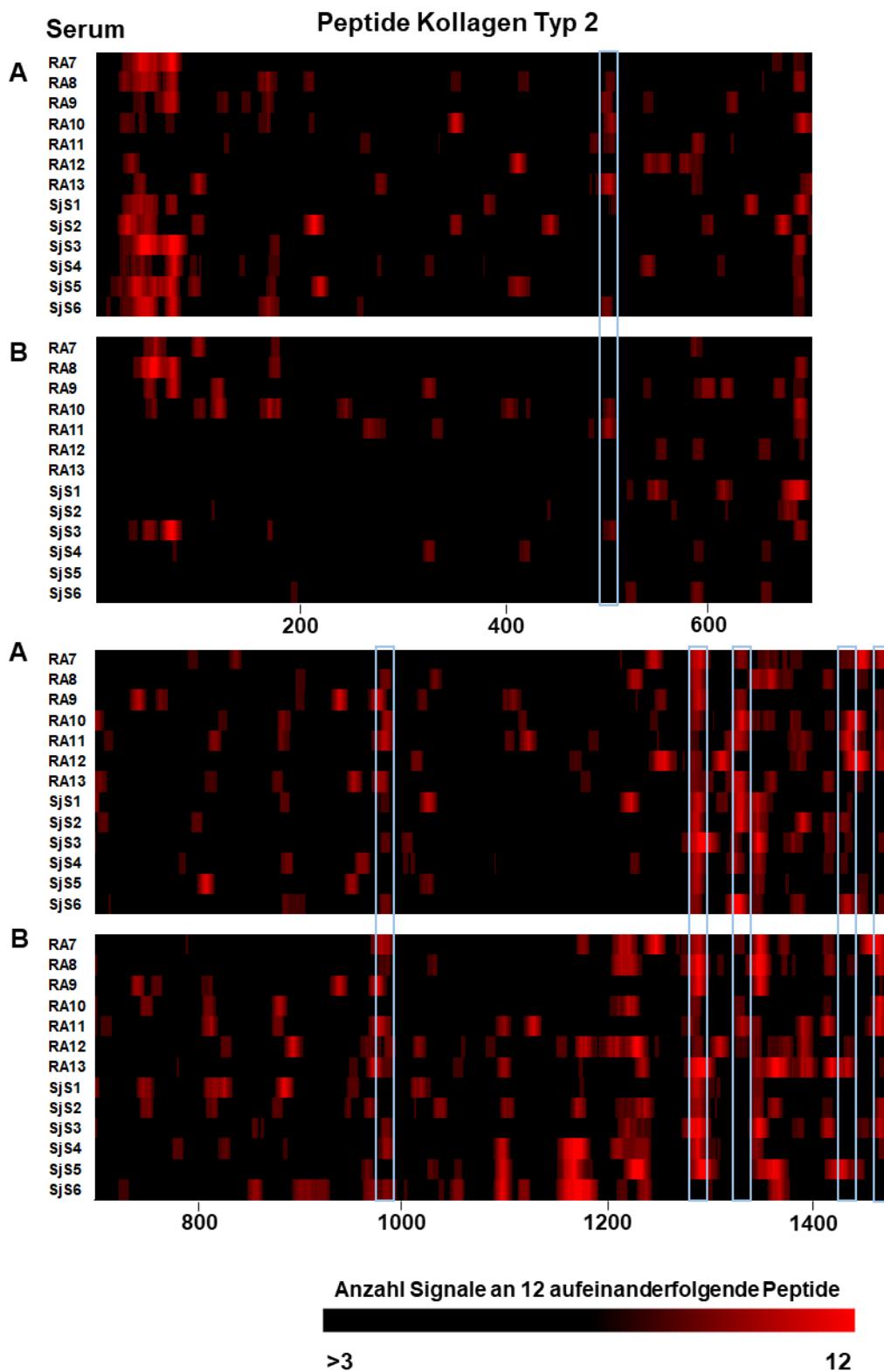


Abbildung 36: Heatmap Anzahl der Signale an 12 aufeinanderfolgende Peptide der linearen (A) und zyklischen (B) citrullinierten Kollagen Typ 2 Peptide (Länge: 1473 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA7-13) und Sjögrens Syndrom Seren (Sjs1-6). Die blauen Rahmen entsprechen den Bereichen, die zur weiteren Substitutionsanalyse ausgewählt wurden.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Zur weiteren Betrachtung der potenziellen Epitope mittels Substitutionsanalysen wurden dann jeweils die Peptidsequenzen gewählt, die von den meisten Rheumaseren gebunden wurden und die höchste addierte Gesamtintensität der gebundenen Seren besaßen. Diese sechs Peptidsequenzen sind in der folgenden Tabelle mit ihrer jeweiligen Position im analysierten Protein aufgelistet.

Tabelle 10: Bindung der Seren RA7-13 und SjS1-6 an ausgewählte lineare Peptide des citrullinierten Kollagen Typ 2 Arrays zur Substitutionsanalyse mit ihrer jeweiligen Position im gemappten Protein

Peptidsequenz	Nr.	Position im Protein	Serum (RA)							Serum (SjS)					
			7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6
IGPPGEZGAPGNZGF	12	503		x	x	x	x	x	x						
ZGIVGLPGQZGEZGF	13	980		x	x			x	x						
KLCHPEWKSGDYWID	14	1287	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ANVPKKNNWWSSKSKE	15	1329			x	x	x	x			x	x		x	x
GKWGKTVIEYZSQKT	16	1443				x	x	x	x					x	x
GPEQEFGVDIGPVCF	17	1472	x	x	x		x		x			x	x		

5.2.2 Untersuchung potenzieller Epitope von citrulliniertem Kollagen Typ 2 mittels Substitutionsanalysen

Die Untersuchung der Peptidsequenzen IGPPGEZGAPGNZGF (12), ZGIVGLPGQZGEZGF (13), KLCHPEWKSGDYWID (14), ANVPKKNNWWSSKSKE (15), GKWGKTVIEYZSQKT (16) und GPEQEFGVDIGPVCF (17) mit Hilfe von Substitutionsanalysen soll über die genaue Antigenbindungsstelle (Aminosäuresequenz) der Epitope der Serumantikörper Aufschluss geben. Das Vorhandensein von identischen Bindungsmotiven in verschiedenen Seren könnte möglicherweise für identische oder ähnliche Antikörper in den Patientenserien sprechen. Ebenfalls soll beurteilt werden, ob Citrullin eine essenzielle Rolle für die Bindung des Antikörpers an das Epitop spielt. Diese posttranskriptionale Modifikation könnte wiederum die Ursache dafür sein, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis Antikörper gegen körpereigenes Gewebe entwickeln. Dadurch könnte die PTM auch eine Rolle bei der Verbesserung der Frühdiagnostik der Krankheit spielen, da hier einfache Nachweisreaktionen entwickelt werden könnten, die neben den ACPAs, spezifisch Citrullin erkennen. Mit Hilfe dieser Analysen könnten ebenfalls potenziell relevante Bindungsmotiv detektiert werden, die in der Pathogenese der rheumatoiden

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Arthritis eine Rolle spielen. Diese Bindungsmotive könnten darüber hinaus als mögliche diagnostische Marker für die Krankheit dienen. Ebenso könnte ein gemeinsamer oder ähnlicher Antikörper bei Patienten der RA oder dem Sjögrens Syndrom existieren, wodurch die Möglichkeit einer Antigen Mimikry besteht.

Für die Untersuchung dieser Hypothesen wurden Substitutionsanalysen der Peptide 12-17 durchgeführt. Hierzu werden alle Aminosäuren der originalen Peptidsequenz durch alle 20 proteinogenen Aminosäure und Citrullin ausgetauscht, um potenzielle Bindungsmotive zu erschließen. Die Arraysynthese der Substitutionsanalysen wurde durch PEPperPRINT GmbH durchgeführt. Die bereits entschützten Syntheseoberflächen wurden mit den Seren RA7-13, sowie Serum SjS5 (jeweils 1:100 Verdünnung) und anschließend mit dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647 und dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 inkubiert. Die Entscheidung, die Substitutionsanalysen mit lediglich einem Serum der Patienten mit Sjögrens Syndrom (SjS5) zu inkubieren, beruht auf der Höhe und der Eindeutigkeit der Fluoreszenzintensitäten der Bindungsstudien. Die daraus resultierenden vollständigen Fluoreszenzscans sind im Anhang (Abbildung 59-Abbildung 60, S.190) dargestellt. Im Folgenden werden lediglich potenziell relevante Substitutionsanalysen diskutiert und in einem Diagramm visualisiert. Dazu wurden die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten der ursprünglichen Aminosäure in der Originalsequenz auf 100 % gesetzt (x-Achse) und in Korrelation mit den relativen Intensitäten der substituierten Sequenzen (y-Achse) gesetzt. Anhand dieser Darstellung wird ersichtlich, welche Aminosäuren essenziell für die Bindung sind. Die Analyse der Sequenz 12 (IGPPGEZGAPGNZGF) ergab keine charakteristischen Muster einer Substitutionsanalyse, weshalb hier keine weitere Diskussion zu dieser Peptidsequenz stattfinden kann. Daher wird mit der Analyse der Sequenz 13 begonnen.

a) Sequenz 13: ZGIVGLPGQZGEZGF

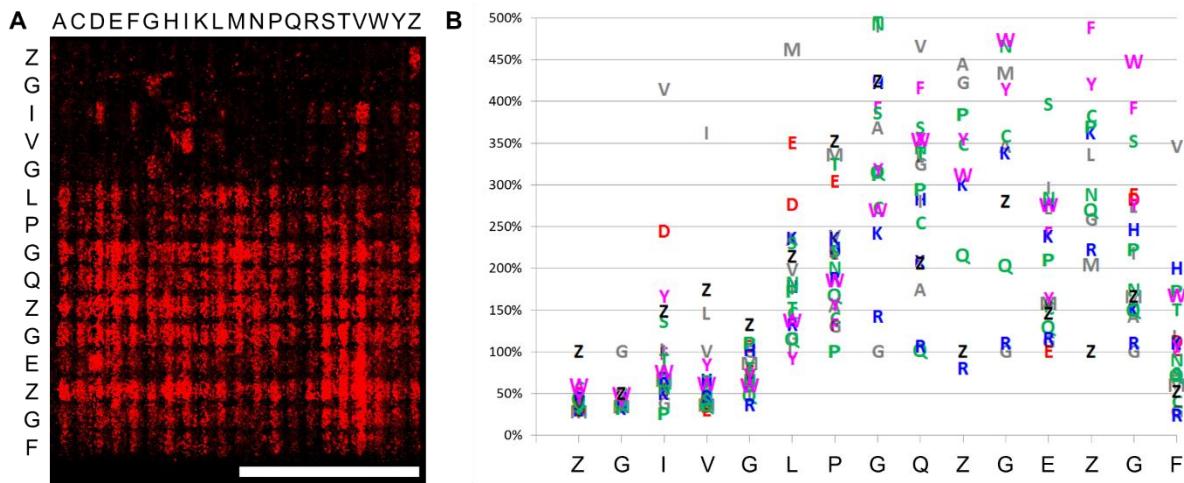


Abbildung 37: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids ZGIVGLPGQZGEZGF nach Inkubation mit Serum RA9 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids ZGIVGLPGQZGEZGF (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Inkubation der Substitutionsanalyse der Sequenz ZGIVGLPGQZGEZGF besitzt lediglich bei Serum RA9 ein charakteristisches Fluoreszenzmuster (Abbildung 37A). Der Fluoreszenzscan zeigt in den ersten fünf Aminosäurepositionen der Sequenz einzelne Peptidspots, wodurch hier vermutlich ein Bindungsmotiv eines Antikörpers vorliegt. Die restlichen Aminosäuren der Sequenz zeigen eine starke Fluoreszenzintensität in allen Spots, wodurch hier alle Substitutionsvarianten zu einer Bindung des Antikörpers führen. Die Auswertung über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 37B) bestätigt diese Beobachtungen, da die Positionen 6-15 der Peptidsequenz eine sehr hohe relative Fluoreszenzintensität zu den jeweiligen ursprünglichen Aminosäuren besitzen und somit für die Antikörperbindung substituierbar sind. Position 1 mit Citrullin, sowie Position 2 mit Glycin sind jeweils essenzielle für eine Bindung des Antikörpers, da eine Substitution an diesen Positionen zu einem Verlust der Affinität des Antikörpers führt. Die Positionen 3,4 und 5 können durch mehrere Aminosäuren substituiert werden, wodurch hier eine geringere Bindungsaffinität besteht, die Aminosäuren jedoch trotzdem essenziell für eine Bindung des Antikörpers sind. Position 3 kann neben der ursprünglichen Aminosäure Isoleucin durch Serin, Citrullin, Tyrosin, Asparaginsäure und Valin

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

substituiert werden. Das Valin Position 4 kann ebenfalls durch Tyrosin, Leucin, Citrullin und Isoleucin substituiert werden und das Glycin in Position 5 zusätzlich durch Citrullin. Somit ergibt sich ein mögliches Bindungsmotiv Z-G-S/Z/Y/I/D/V-Y/V/L/Z/I-Z/G, welches auch in Tabelle 11 dargestellt ist.

Tabelle 11: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz ZGIVGLPGQZGEZGF für Serum RA9. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung)

Serum	Originale Aminosäuresequenz														
	Z	G	I	V	G	L	P	G	Q	Z	G	E	Z	G	F
RA9	Z	G	SZYIDV	YVLZI	ZG	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

b) Sequenz 14: KLCHPEWKSGDYWID

Die Substitutionsanalyse der Sequenz KLCHPEWKSGDYWID wurde von zwei verschiedenen Seren, einem Rheumaserum (RA9) und einem Sjögrens Syndrom Serum (SjS5) gebunden. Die Inkubation mit den anderen Seren zeigte keine charakteristischen Fluoreszenzmuster.

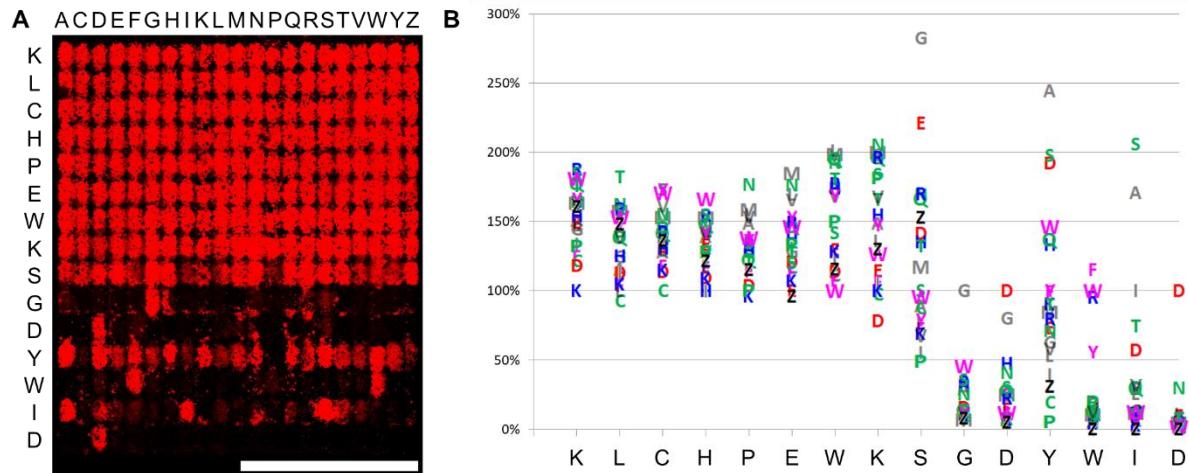


Abbildung 38: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids KLCHPEWKSGDYWID nach Inkubation mit Serum RA9 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids KLCHPEWKSGDYWID (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Der Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse der Sequenz KLCHPEWKSGDYWID mit Serum RA9 (Abbildung 38A) besitzt für nahezu alle Aminosäuren an den Positionen 1-9 eine sehr hohe Fluoreszenzintensität. Die Positionen 10 und 11, sowie 13-15 sind hingegen Teil eines Bindungsmotivs, da lediglich eine oder wenige Peptidvarianten Signale mit einer hohen Fluoreszenzintensität zeigen und eine Bindung des Antikörpers bedingen. Die weitere Auswertung über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 38B) veranschaulicht die essenzielle Bindung der Aminosäuren Glycin in Position 10, Asparaginsäure (und Glycin) in Position 11, sowie Asparaginsäure in Position 15. Eine Substitution der originalen Aminosäure Tryptophan an Position 13 durch Phenylalanin und Arginin, sowie die Substitution von Isoleucin an Position 14 durch Alanin und Serin, erhöhen die Affinität zwischen Antikörper und Epitop, während Position 12 durch nahezu alle Aminosäuren substituiert werden kann. Jedoch verhindern die Aminosäuren Cystein und Prolin eine Antikörperbindung (<10 % der Intensität der ursprünglichen Aminosäure). Somit könnte ein potenzielles Bindungsmotiv G-G/D-x[!P,C]-R/W/F-D/T/I/A/S-D sein, welches in Tabelle 12 mit der Analyse von Serum SjS5 zusammengefasst wurde.

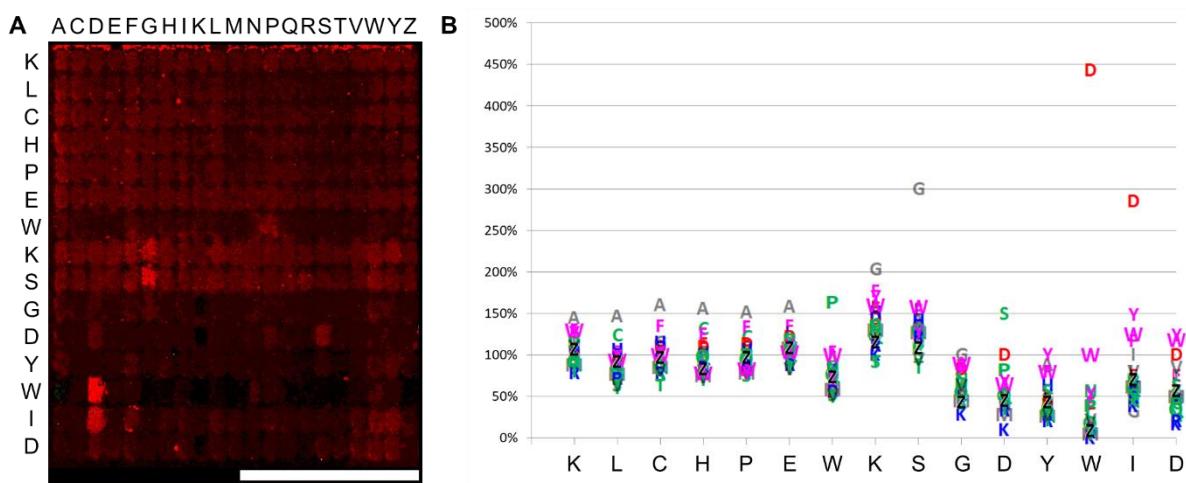


Abbildung 39: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids KLCHPEWKSGDYWID nach Inkubation mit Serum SjS5 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids KLCHPEWKSGDYWID (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Der Fluoreszenzscan der Sequenz KLCHPEWKSGDYWID nach Inkubation mit Serum SjS5 (Abbildung 39A) zeigt eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenzintensitäten wie die Inkubation des Serums RA9. Dabei können die Aminosäuren der Positionen 1-9 variabel substituiert werden, wohingegen in den Positionen 10-15 vermutlich ein Bindungsmotiv vorliegt. Die Analyse des Aminosäuren-Plots (Abbildung 39B) bestätigt die Beobachtungen des Fluoreszenzscans. Die Positionen 10-15 zeigen allerdings jeweils viele mögliche Substitutionen der originalen Aminosäure. Glycin an Position 10 kann hauptsächlich durch Asparaginsäure, Tyrosin und Tryptophan substituiert werden. Asparaginsäure an Position 11 kann ebenfalls durch Tyrosin, Prolin und Serin ersetzt werden. Tyrosin an Position 12 kann durch Histidin, Phenylalanin, Tryptophan und Alanin substituiert werden. An Position 13 liegt hingegen eine spezifische Bindung zwischen dem Antikörper und der Aminosäure Tryptophan vor, deren Affinität lediglich durch eine Substitution von Asparaginsäure stark (443 % relative Fluoreszenzintensität) gesteigert werden kann. Isoleucin in Position 14 kann durch nahezu alle Aminosäuren ersetzt werden, jedoch nicht durch Glycin oder Lysin. Die stärkste Bindungsaffinität neben der ursprünglichen Aminosäure, besitzen die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Asparaginsäure. Asparaginsäure in Position 15 kann ebenfalls durch einige Aminosäuren ersetzt werden, die höchste Bindungsaffinität neben der originalen Aminosäure besitzen Valin, Tryptophan und Tyrosin. Die Zusammenfassung der Analyse in Gegenüberstellung mit der Analyse der Inkubation mit Serum RA9 ist im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Tabelle 12: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz KLCHPEWKSGDYWID für Serum RA9 und SjS5. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz														
	K	L	C	H	P	E	W	K	S	G	D	Y	W	I	D
RA9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	G	GD	!CP	RWF	IAS	D
SjS5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	DYWG	YPDS	HFWAY	WD	IFWYD [IGK]	VDWY

Anhand der tabellarischen Zusammenfassung der detektierten Bindungen der Aminosäuren könnte hier möglicherweise ein gemeinsames Bindungsmotiv eines Antikörpers vorliegen. Unter Betrachtung der gemeinsam vorliegenden Aminosäuren in beiden Seren, könnte ein mögliches Bindungsmotiv G-D-(x)-W-I-D sein. Durch das Auftreten des möglichen Motivs bei einem Serum mit rheumatoider Arthritis und dem

Sjögrens Syndrom könnte gegebenenfalls eine Gemeinsamkeit der beiden Erkrankungen bei der Antikörperbildung vorliegen. Zur Verifizierung dieser These sind allerdings weitaus mehr Analysen von verschiedenen Patientenserien, sowie die Untersuchung der genauen Antikörperstrukturen notwendig.

c) Sequenz 15: ANVPKKNWWSSKSKE

Die Substitutionsanalyse der Sequenz ANVPKKNWWSSKSKE wurde von zwei verschiedenen Rheumaseren, RA10 und RA13, gebunden. Die Inkubation mit den anderen Seren zeigte keine charakteristischen Fluoreszenzmuster.

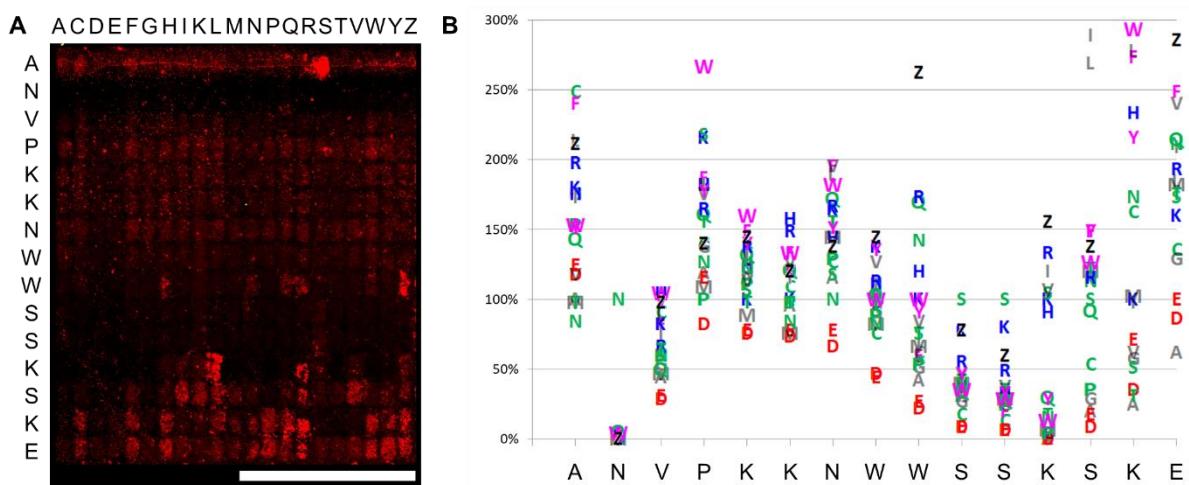


Abbildung 40: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids ANVPKKNWWSSKSKE nach Inkubation mit Serum RA10 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids ANVPKKNWWSSKSKE (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Der Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse der Sequenz ANVPKKNWWSSKSKE nach der Inkubation mit Serum RA10 (Abbildung 40A) besitzt eine schwach ausgeprägte Fluoreszenzintensität, jedoch könnte anhand des Fluoreszenzmusters ein Bindungsmotiv in der Mitte bzw. Ende der Sequenz vorliegen. Die Auswertung über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 40B) zeigt ebenfalls eine Bindung des Antikörpers an alle Aminosäuren in Position 15, sowie eine Bindung aller Aminosäuren außer D und E in den Positionen 1 und 3-9. Position 2 zeigt keinerlei Fluoreszenzintensität in allen Peptidspots, was vermutlich auf einen Fehler bei der Funktionalisierung der Oberfläche oder der Synthese des Peptidarrays zurückzuführen ist. Dieser Fehler

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

taucht auch in einigen der folgenden Abbildungen auf und ist auch auf den vollständigen Fluoreszenzscans im Anhang (Abbildung 59-Abbildung 60, S.190) zu sehen. Positionen 10 und 11 besitzen jeweils eine mögliche Substitution der originalen Aminosäure Serin durch Lysin und Citrullin. Lysin an Position 12 kann durch Histidin, Serin, Valin, Isoleucin, Arginin, Citrullin und Leucin ersetzt werden. Serin an Position 13 kann durch alle Aminosäuren außer Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Glycin, Prolin und Cystein substituiert werden, da hier keine ausreichende Fluoreszenzintensität detektiert werden kann. Lysin an Position 14 kann ebenfalls durch alle Aminosäuren außer Alanin, Threonin und Asparaginsäure ersetzt werden. Die Darstellung der Analyse der Substitutionsanalyse ist ebenfalls mit der Analyse durch die Inkubation des Serums RA13 in Tabelle 13 zusammengefasst.

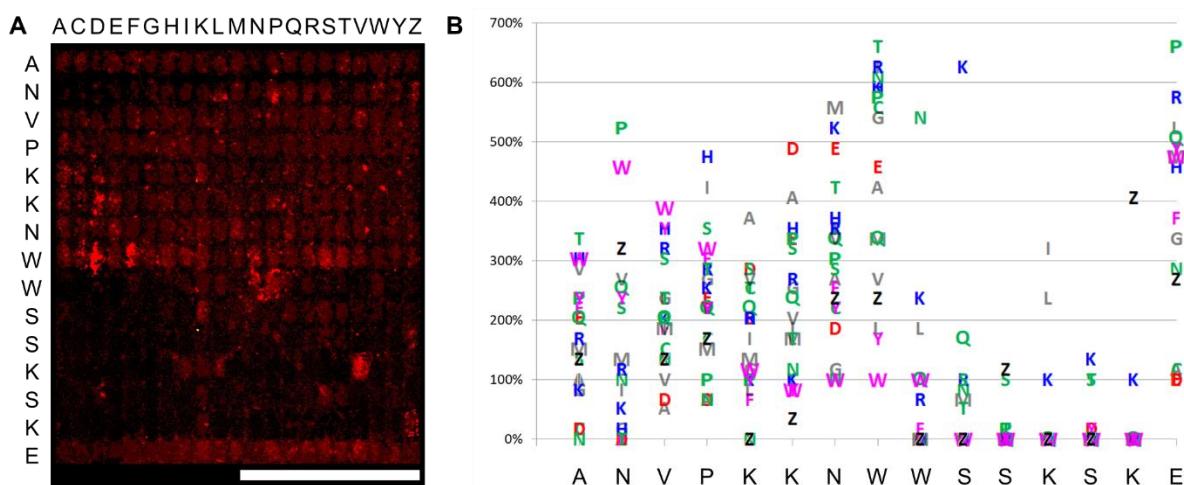


Abbildung 41: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids ANVPKKNWWSSKSKE nach Inkubation mit Serum RA13 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids ANVPKKNWWSSKSKE (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Inkubation der Substitutionsanalyse der Sequenz ANVPKKNWWSSKSKE mit Serum RA13 zeigt ebenfalls ein charakteristisches Fluoreszenzmuster (Abbildung 41A) mit einem möglichen Bindungsmotiv am Ende der Peptidsequenz. Die Auswertung über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 41B) bestätigt die Beobachtung einerseits durch die Bindung aller möglicher Substitutionsvarianten in den Positionen 1-8 und 15. Position 9 zeigt neben der originalen Aminosäure Tryptophan eine weitere

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

mögliche Substitution durch Arginin, Glutamin, Leucin, Lysin und Asparagin. Serin an Position 10 kann ebenfalls durch Threonin, Methionin, Asparagin, Arginin, Glutamin und Lysin ersetzt werden. Position 11 zeigt lediglich bei den Aminosäuren Serin und Citrullin eine Antikörperbindung, während eine Substitution von Lysin an Position 12 durch Leucin, Isoleucin und Valin stattfinden kann. Serin an Position 13 kann ebenfalls durch Threonin und Lysin ersetzt werden. Lysin an Position 14 ist ebenfalls essenziell für die Bindung des Antikörpers und kann lediglich durch Citrullin substituiert werden. Die Zusammenfassung dieser Auswertung, sowie der Inkubation mit Serum RA10 ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 13: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz ANVPKKNNWSSKSKE für Serum RA10 und RA13. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

	Originale Aminosäuresequenz															
Serum	A	N	V	P	K	K	N	W	W	S	S	K	S	K	E	
RA10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	KZS	ZKS	HKS VIRZL	!DEAGPC	!ATD	x	
RA13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	TMNRSQ	SZ	KLI	STK	KZ	x	

Anhand der tabellarischen Zusammenfassung der möglichen Peptidvarianten der Aminosäuren der Inkubationen mit RA10 und RA13 könnte ein Bindungsmotiv eines Antikörpers vorliegen. Unter Betrachtung der gemeinsamen Aminosäuren, die für eine Antikörperbindung essenziell sind, könnte ein mögliches Motiv S-S/Z-K/L/I-S/T/K sein.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

d) Sequenz 16: GKGKTVIEYZSQKT

Die Substitutionsanalyse der Sequenz GKGKTVIEYZSQKT wurde Antikörpern aus zwei verschiedenen Rheumaseren, RA10 und RA12, gebunden. Die Inkubation mit den anderen Seren zeigte keine charakteristischen Fluoreszenzmuster.

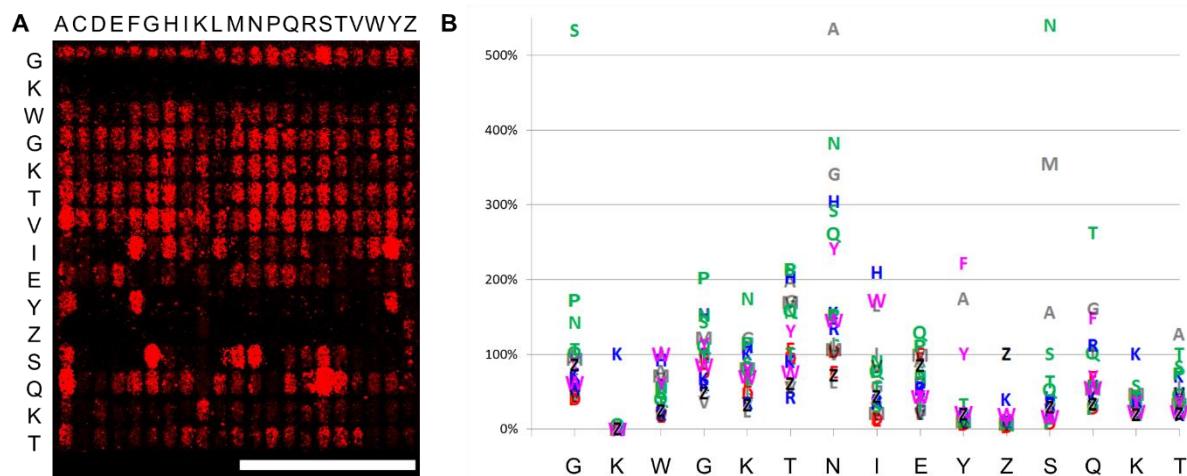


Abbildung 42: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GKGKTVIEYZSQKT nach Inkubation mit Serum RA10 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GKGKTVIEYZSQKT (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Der Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse der Sequenz GKGKTVIEYZSQKT nach der Inkubation mit Serum RA10 (Abbildung 42A) besitzt ein ausgeprägtes Fluoreszenzmuster mit einem möglichen Bindungsmotiv in der Mitte der Sequenz. Die Auswertung über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 42B) zeigt eine Bindung aller Substitutionsvarianten an den Positionen 1-7 und 9, wobei Position 2 den zuvor beschriebenen Defekt in der Synthese oder Funktionalisierung besitzt und somit keine Fluoreszenzintensität in allen Varianten hat. Isoleucin an Position 8 kann durch die Aminosäuren Glutamin, Valin, Asparagin, Leucin, Tryptophan und Histidin substituiert werden. Tyrosin an Position 10 kann lediglich durch Alanin und Phenylalanin ersetzt werden. Citrullin in Position 11 und Lysin an Position 14 ist essenziell für die Bindung des Antikörpers und können nicht substituiert werden. Serin an Position 12 kann durch die Aminosäuren Alanin, Methionin, Asparagin und Glycin ersetzt werden. Glutamin in Position 13 zeigt eine hohe Anzahl an Substitutionsvarianten durch die Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Arginin, Phenylalanin, Glycin, Threonin, Serin und Alanin. Threonin an Position 15 kann durch die Aminosäuren Lysin, Prolin, Serin und Alanin substituiert werden.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

werden. Die Zusammenfassung der Auswertung ist mit der Inkubation des Serums RA12 in Tabelle 14 dargestellt.

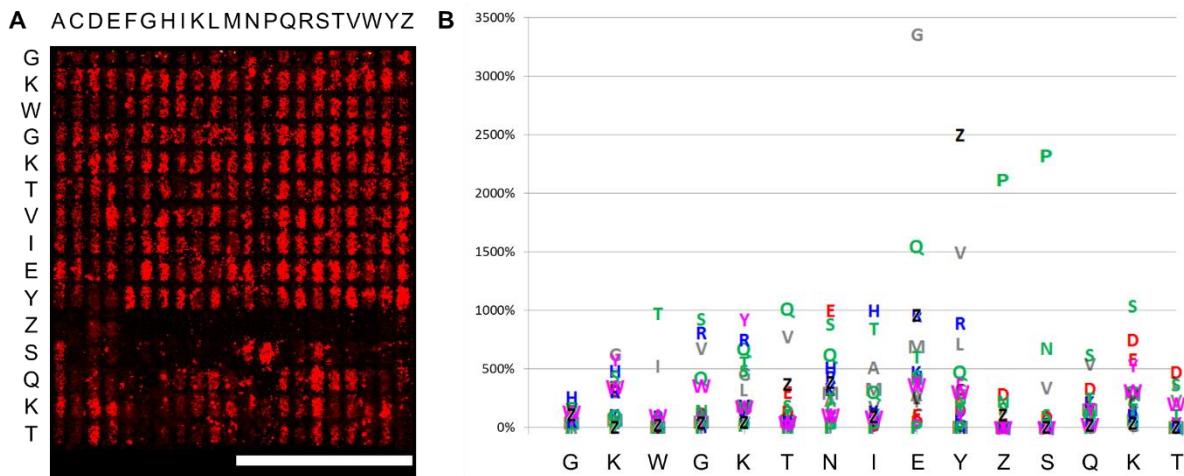


Abbildung 43: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GKWGKTVIEYZSQKT nach Inkubation mit Serum RA12 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GKWGKTVIEYZSQKT (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Die Inkubation der Substitutionsanalyse der Sequenz GKWGKTVIEYZSQKT mit Serum RA12 zeigt ebenfalls ein charakteristisches Fluoreszenzmuster (Abbildung 43A) mit einem möglichen Bindungsmotiv in der Mitte der Peptidsequenz. Allerdings ist die Fluoreszenzintensität insgesamt deutlich geringer, wodurch auch die Bestimmung eines Bindungsmotivs kritisch ist. Auch die Analyse über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 43B) zeigt eine Bindung aller Substitutionsvarianten an den Positionen 1-10. Die originale Aminosäure Citrullin an Position 11 zeigt allerdings keine Fluoreszenzintensität, wodurch eine Aussage über die Bindungseigenschaften hier kritisch betrachtet werden müssen. Serin an Position 12 kann durch die Aminosäuren Valin, Asparagin und Prolin substituiert werden. Die Aminosäuren Glutamin an Position 13, Lysin an Position 14 und Threonin an Position 15 zeigen ebenfalls nicht eindeutige Signale, da die Spots eine verschwommene Textur besitzen. Ebenfalls besitzen nahezu alle Peptidvarianten ein deutliches Fluoreszenzsignal, wobei auch bei den schwächeren Signalen ein hohes Hintergrundsignal detektierbar ist. Daher ist eine Beurteilung der Antikörperbindung des Serums RA12 dieser

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Substitutionsanalyse nicht aussagekräftig. Die Bindungsergebnisse der Inkubation der Seren RA10 und RA12 sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 14: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz GKWGKTVIEYZSQKT für Serum RA10 und RA12. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz														
	G	K	W	G	K	T	V	I	E	Y	Z	S	Q	K	T
RA10	x	x	x	x	x	x	x	QVNILWH	x	AYF	Z	ASMNG	ILR Q FGTSA	K	KPSTA
RA12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	DE	SVNP	x	x	x

Anhand der tabellarischen Zusammenfassung der möglichen Substitutionsvarianten der Aminosäuren der Inkubationen mit RA10 und RA12 kann keine eindeutige Aussage über ein gemeinsames Bindungsmotiv getroffen werden. Im Fall der Inkubation mit Serum RA10 könnte unter Berücksichtigung der voraussichtlich relevantesten Aminosäuren ein mögliches Bindungsmotiv Y/A/F-Z-S/A/M/N/G-x-K darstellen.

e) Sequenz 17: GPEQEFGVDIGPVCF

Die Substitutionsanalyse der Sequenz GPEQEFGVDIGPVCF wurde von Antikörpern zwei verschiedener Rheumaseren, RA7 und RA8, gebunden. Die Inkubation mit den anderen Seren zeigte keine charakteristischen Fluoreszenzmuster.

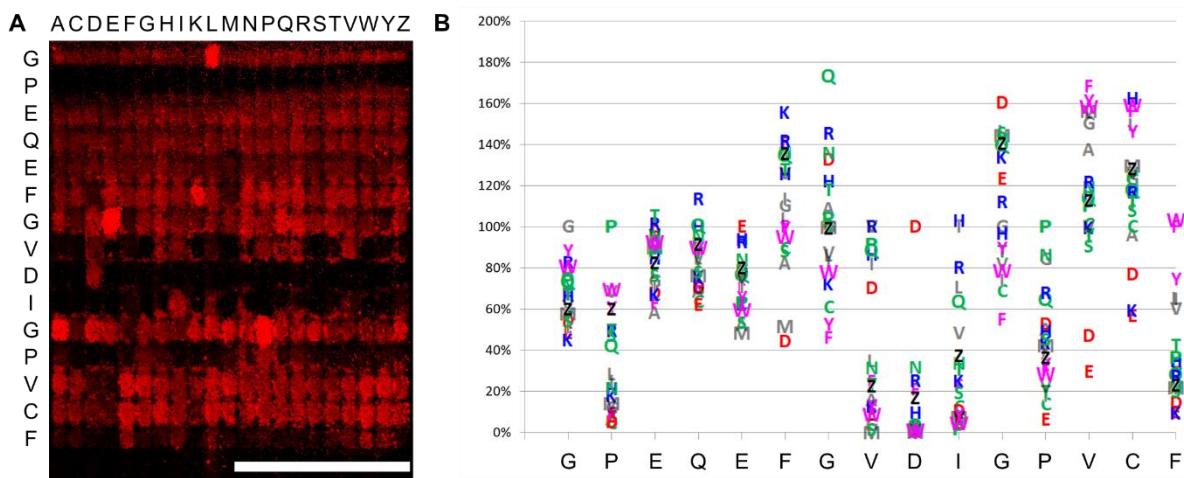


Abbildung 44: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GPEQEFGVDIGPVCF nach Inkubation mit Serum RA7 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GPEQEFGVDIGPVCF (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Der Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse der Sequenz GPEQEFGVDIGPVCF nach der Inkubation mit Serum RA7 (Abbildung 44A) besitzt ein ausgeprägtes Fluoreszenzmuster mit einem möglichen Bindungsmotiv in der Mitte der Sequenz. Die Auswertung über den Aminosäuren-Plot (Abbildung 44B) zeigt an den Positionen 1-7, sowie 11, 13 und 14 eine Bindung aller Substitutionsvarianten, wohingegen Position 2 den zuvor beschriebenen Defekt in der Synthese oder Funktionalisierung aufweist und somit keine Fluoreszenzintensität detektierbar ist. Valin an Position 8 kann zusätzlich durch die Aminosäuren Asparaginsäure, Isoleucin, Histidin, Glutamin, Prolin und Arginin substituiert werden. Asparaginsäure an Position 9 ist dagegen essenziell für die Bindung des Antikörpers und kann nicht substituiert werden. Isoleucin an Position 10 kann durch die Aminosäuren Arginin und Histidin ersetzt werden. Prolin an Position 12 zeigt ebenfalls eine Antikörperbindung allerdings durch die Substitution der Aminosäuren Glycin und Asparagin. Phenylalanin an Position 15 kann durch die Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Tryptophan substituiert werden. Die

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Zusammenfassung der Auswertung ist mit der Inkubation des Serums RA8 in Tabelle 15 dargestellt.

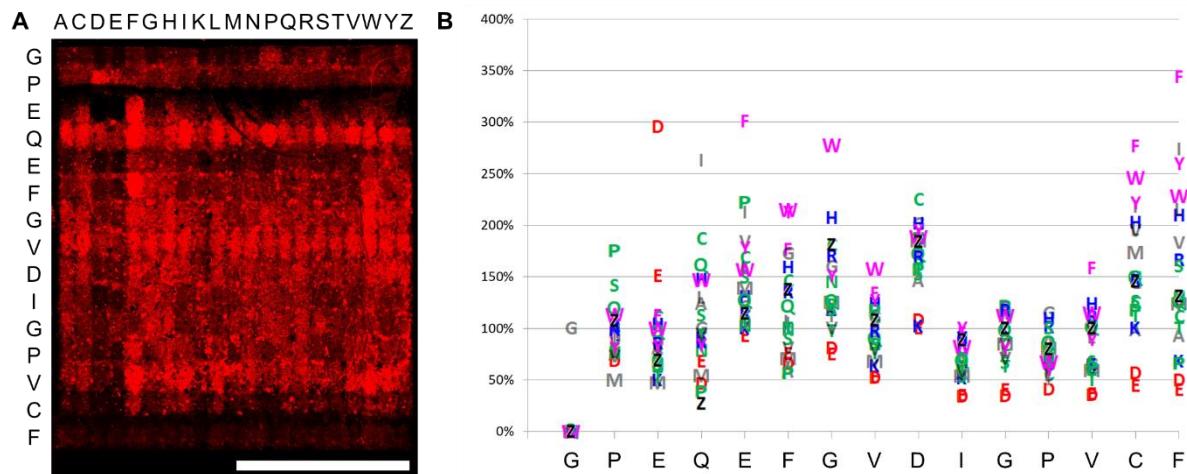


Abbildung 45: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GPEQEFVGVDIGPVCF nach Inkubation mit Serum RA8 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GPEQEFVGVDIGPVCF (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.

Abbildung 45A zeigt den Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse der Sequenz GPEQEFVGVDIGPVCF nach der Inkubation mit Serum RA8. Anhand des Scans ist allgemein eine hohe Intensität aller Peptidvarianten zu erkennen. Auch die Auswertung des Aminosäuren-Plots (Abbildung 45B) bestätigt diese Beobachtung. Die Position 2 und 3 der Sequenz zeigen erneut den Defekt der in den vorherigen Analysen bereits beschrieben wurde. Insgesamt kann hier kein Bindungsmotiv detektiert werden.

Tabelle 15: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz GPEQEFVGVDIGPVCF für Serum RA7 und RA8. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz														
	G	P	E	Q	E	F	G	V	D	I	G	P	V	C	F
RA7	x	x	x	x	x	x	x	DIHQPRV	D	RHI	x	GNP	x	x	ILYFW
RA8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Anhand der tabellarischen Zusammenfassung der möglichen Substitutionsvarianten der Aminosäuren der Inkubationen mit RA7 könnte ein mögliches Bindungsmotiv D/I/H/Q/P/R/V-D-I/H/R-x-P/N/G-x-x-I/L/Y/F/W sein. Die Analyse der Inkubation mit Serum RA8 ergab kein eindeutiges Bindungsmotiv.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Insgesamt konnten durch die vorangegangenen Experimente zur Untersuchung von Bindungsstudien an citrulliniertem Kollagen Typ 2 verschiedene Erkenntnisse erlangt werden. Einerseits konnte eine höhere Fluoreszenzintensität der linearen Peptidarrays detektiert werden. Jedoch konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den linearen und zyklischen Epitopmappings gefunden werden. Aufgrund der großen Anzahl an möglichen Epitopen wurden sechs Peptidsequenzen, die von mindestens drei Rheumaseren in 12 aufeinanderfolgenden Peptiden gebunden wurden, ausgewählt. Auf diese Weise sollten Antikörper identifiziert werden, die ein ähnliches Bindungsmotiv in Seren verschiedener Patienten besitzen. Hierfür wurden die sechs Peptide auf ihre genaue Aminosäuresequenz des Bindungsmotivs der Antikörper über Substitutionsanalysen untersucht. Anhand dieser konnten fünf potenzielle Bindungsmotive Z-G-S/Z/Y/I/D/V-Y/V/L/Z/I-Z/G, G-D-(x)-W-I-D, S-S/Z-K/L/I-S/T/K, Y/A/F-Z-S/A/M/N/G-x-K, D/I/H/Q/P/R/V-D-I/H/R-x-P/N/G-x-x-I/L/Y/F/W der Peptide 12-17detektiert werden, welche in Tabelle 16 zusammengefasst sind.

Tabelle 16: Zusammenfassung der detektierten möglichen Bindungsmotive von citrulliniertem Kollagen Typ 2. Die originalen Aminosäuren sind hervorgehoben.

Peptidsequenz	Nr.	Mögliches Bindungsmotiv	Gebundene Seren
IGPPGEZGAPGNZGF	12	-	-
ZGIVGLPGQZGEZGF	13	Z-G-S/Z/Y/I/D/V-Y/V/L/Z/I-Z/G	RA9
KLCHPEWKSGDYWID	14	G-D-(x)-W-I-D	RA9 und SjS5
ANVPKKNWWSKSKE	15	S-S/Z-K/L/I-S/T/K	RA10 und RA13
GKWGKTVIEYZSQKT	16	Y/A/F-Z-S/A/M/N/G-x-K	RA10 (und RA12)
GPEQEFGVDIGPVCF	17	D/I/H/Q/P/R/ V-D-I/H/R-x-P/N/G-x-x-I/L/Y/F/W	RA7

Die Bindung der Motive der Peptide 13 und 17 erfolgte jeweils durch unterschiedliche Patientenserien. Obwohl das Motiv von Peptid 16 von zwei Seren erkannt wurde, sind die Signale des Serums RA12 aufgrund einer hohen Gesamtfluoreszenz nahezu aller Substitutionsvarianten schwer zu deuten. Daher lässt sich hier lediglich von einem klaren Motiv eines Serums für das Peptid sprechen. Die Beobachtung, dass die Motive nur durch einzelne Seren gebunden wurden, unterstützt nicht die ursprüngliche Hypothese eines gemeinsamen Antikörpers in mehreren Patientenserien. Dennoch konnten drei potenzielle Motive aus einzelnen Seren identifiziert werden. Weitere Studien, die den Serenpool auf mehrere Patienten erweitern, könnten zusätzliche Erkenntnisse über die ausgewählten Peptide und mögliche identische Motive liefern. Im Fall der Motive der Sequenzen 14 und 15 konnten jeweils Gemeinsamkeiten

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

bindender Antikörper aus zwei Seren entdeckt werden, wodurch jeweils ein potenzielles gemeinsames Bindungsmotiv vorhanden sein könnte. Allerdings sind die Fluoreszenzintensitäten nicht immer eindeutig, da die Fluoreszenzmuster bei den Seren SjS5, RA10 und RA13 eher schwach ausgeprägt sind. Die Bindungsaffinität variiert ebenfalls in beiden Bindungsmotiven leicht, wodurch die möglichen Substitutionen sich bei den Seren etwas unterscheiden. Es konnten bei beiden Motiven bei jeweils beiden Seren nicht bei allen Aminosäuren die originalen Aminosäuren detektiert werden, wodurch hier vermutlich kein gemeinsamer Antikörper gefunden werden konnte. Nichtsdestotrotz könnten die detektierten Motive jeweils von einem Autoantikörper gegen rheumatoide Arthritis erkannt worden sein. Durch die zwar schwache, aber vorhandene Bindung mehrerer Seren könnte trotzdem eine gemeinsame Ursache für die Ausbildung der Antikörper bestehen. Ebenfalls konnte die gemeinsame Bindung eines Motivs durch ein RA und ein SjS Serum gezeigt werden, wodurch eventuell die gemeinsame Ursache einer Antigen Mimikry besteht. Möglicherweise könnte die Konzentration der Antikörper im Serum zu niedrig sein. Dies könnte einerseits an der Behandlung der rheumatischen Arthritis durch Immunsuppressiva liegen. Andererseits sind bei allen Patienten die Seren zu einem späten Zeitpunkt der Krankheit entnommen worden (>12 Monate). Dadurch könnte ebenfalls eine geringere Konzentration der Antikörper im Körper vorhanden sein, die möglicherweise die Autoimmunkrankheit zu Beginn ausgelöst haben.

Eine mögliche Ursache für die Bildung von Autoantikörpern könnte die posttranskriptionale Modifikation Citrullin sein. Bereits in Kapitel 5.1 konnte Citrullin in drei Motiven als essenzielle Aminosäure beobachtet werden. Auch in diesem Experiment konnte Citrullin als essenzielle Aminosäure für die Antikörperbindung der Motive der Peptide 13 und 16 entdeckt werden. Dadurch wird die Hypothese einer relevanten Rolle von Citrullin in der Pathogenese der rheumatischen Arthritis bestärkt. Hierbei könnte die posttranskriptionale Modifikation möglicherweise der Grund sein, weshalb sich Antikörper gegen das eigene Gewebe bilden, da potenziell Citrullin als körperfremd erkannt wird. Diese Annahme könnte durch weitere Studien mit mehr Patientenserien und mehr Peptidarray-Screenings weiter erforscht werden. Zudem könnte auch eine genaue Analyse über die Struktur der bindenden Antikörper durchgeführt werden, um herauszufinden, ob diese eine ähnliche Struktur in den verschiedenen Seren besitzen.

5.2.3 Erforschung des Einflusses der Frühdiagnostik von rheumatoider Arthritis

Die vorangegangenen Experimente zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis konnten bereits verschiedene Erkenntnisse zu den durchgeführten Bindungsstudien aufzeigen. Einerseits konnten einige Bindungsmotive detektiert werden, die hauptsächlich von jeweils einem Rheumaserum bzw. dessen Antikörper gebunden wurden. Ebenfalls konnten drei Motive aufgedeckt werden, die von zwei verschiedenen Seren bzw. deren enthaltenen Antikörpern gebunden wurden und teilweise gemeinsame Aminosäuren im Motiv binden. Ebenfalls konnte die posttranskriptionale Modifikation Citrullin in einigen Motiven als entscheidende Aminosäure der Antikörperbindung identifiziert werden. Durch diese Erkenntnisse könnte einerseits die Annahme bekräftigt werden, dass ein gemeinsamer Autoantikörper in mehreren Seren vorhanden ist. Andererseits könnte die Ausbildung der potenziell ähnlichen Antikörper, sowie der Antikörper, die spezifisch Citrullin im Motiv binden, einen gemeinsamen Auslöser, die PTM Citrullin, besitzen. Diese könnte möglicherweise die erste Reaktion der Immunantwort auslösen, dass Antikörper gegen körpereigenes Gewebe gebildet werden.

Um diese These weiter zu untersuchen, sollen im folgenden Experiment Inkubationen mit Patientenserien durchgeführt werden, die in einem frühen Stadium der rheumatoiden Arthritis (<12 Monate) diagnostiziert wurden. Zum einen könnten hiermit bereits detektierte Epitope erneut gebunden werden und ggf. durch eine höhere Antikörperkonzentration im Frühstadium eindeutigere Signale in den Bindungsstudien aufgezeigt werden. Die bisher detektierten Bindungsmotive konnten nicht immer eindeutig charakterisiert werden, was durch die potenziell höhere Antikörperkonzentration im Frühstadium eventuell verbessert werden könnte. Allgemein liefern Studien keine eindeutigen Schlüsse zu den Antikörperkonzentrationen des Rheumafaktors (RF) und ACPAs hinsichtlich der Auswirkungen auf die Krankheitsaktivität^[201]. Einige Studien haben festgestellt, dass ein positiver Rheumafaktor (RF) und/oder ACPA, insbesondere bei hohen Titern, unter anderem mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf, einer erhöhten Krankheitsaktivität und niedrigeren Remissionsraten in Verbindung steht^[202-206]. Andere Studien zeigen wiederum einen Zusammenhang zwischen einer positiven ACPA Konzentration und geringeren Krankheitsaktivitäten^[207-208]. Insgesamt besteht jedoch eher die Tendenz eines schlechteren Krankheitsverlaufs bei hohen RF

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

und/oder ACPA Titern bei einer Diagnose im Frühstadium^[209]. Darüber hinaus gibt es auch eine 2023 publizierte Studie, welche zeigt, dass ACPA-positive Personen ohne eine entzündliche Arthritis in einem sog. „Risiko“-Zustand sind, welcher mit einer komplexen Dysregulation des Immunsystems verbunden ist^[210]. Zudem konnten in der Studie hohe Antikörpertiter gegen citrullinierte Peptide bei Patienten in dem „Risiko“-Zustand, sowie Patienten mit früher RA festgestellt werden. In Bezug auf die vorangegangenen Ergebnisse, sowie die potenziell wichtige Rolle von höheren Antikörperkonzentrationen in einem frühen Stadium der rheumatoïden Arthritis, sollen weitere Bindungsstudien zu diagnostischen Peptiden durchgeführt werden. Dabei soll eine Inkubation mit drei Patientenserien mit früher RA (RA14-16), sowie zwei Seren von gesunden Patienten (engl.: *healthy control*, hC1-2) durchgeführt werden. Zudem sollen erneut die citrullinierten Peptide von Kollagen Typ 2 mit den Seren inkubiert werden, um mögliche Gemeinsamkeiten in den Bindungsmotiven zu detektieren.

Dabei sollen vor allem die bereits per Substitutionsanalyse analysierten Peptidsequenzen 12-17 erforscht werden und auf Steigerungen in den Fluoreszenzintensitäten beurteilt werden. Außerdem sollen potenzielle neue Epitope durch die Inkubation der frühen RA Seren berücksichtigt werden. Möglicherweise könnten durch die Seren aus dem Frühstadium andere Peptidsequenzen gebunden werden, die durch eine „Erstreaktion“ des Körpers gebunden werden und in einem späteren Verlauf nicht mehr auftreten. Des Weiteren soll ebenfalls citrulliniertes Vimentin in überlappenden Peptidsequenzen in Peptidarrays mit den Seren inkubiert werden. Vimentin wurde als diagnostisches Peptid hinzugezogen, da bereits spezifische Antikörper gegen citrullinierte Sequenzen von Vimentin nachgewiesen werden konnten, wodurch potenzielle weitere Bindungsmotive detektiert werden können^[198].

Für dieses Vorhaben wurden die Proteine erneut als Peptidsequenzen von jeweils 15 Aminosäuren mit jeweils einer Überlappung von einer Aminosäure zur vorherigen Peptidsequenz abgebildet. Somit konnte die vollständige Aminosäuresequenz von Kollagen Typ 2 (Aminosäuresequenz aus UniProt^[200]) und Vimentin (Aminosäuresequenz aus UniProt^[211]) in überlappenden Peptiden dargestellt werden. Zudem wurden alle Arginine der Sequenz durch Citrullin ausgetauscht. Die Arraysynthese, sowie die Synthese der Kontrollen der HA und Polio Peptide, wurde von der Firma PEPperPRINT GmbH durchgeführt. Die bereits entschützten Syntheseoberflächen wurden mit den Seren RA14-16 und den Kontrollseren von

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

gesunden Patienten hC1-2 (1:100), sowie dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647 und dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 inkubiert.

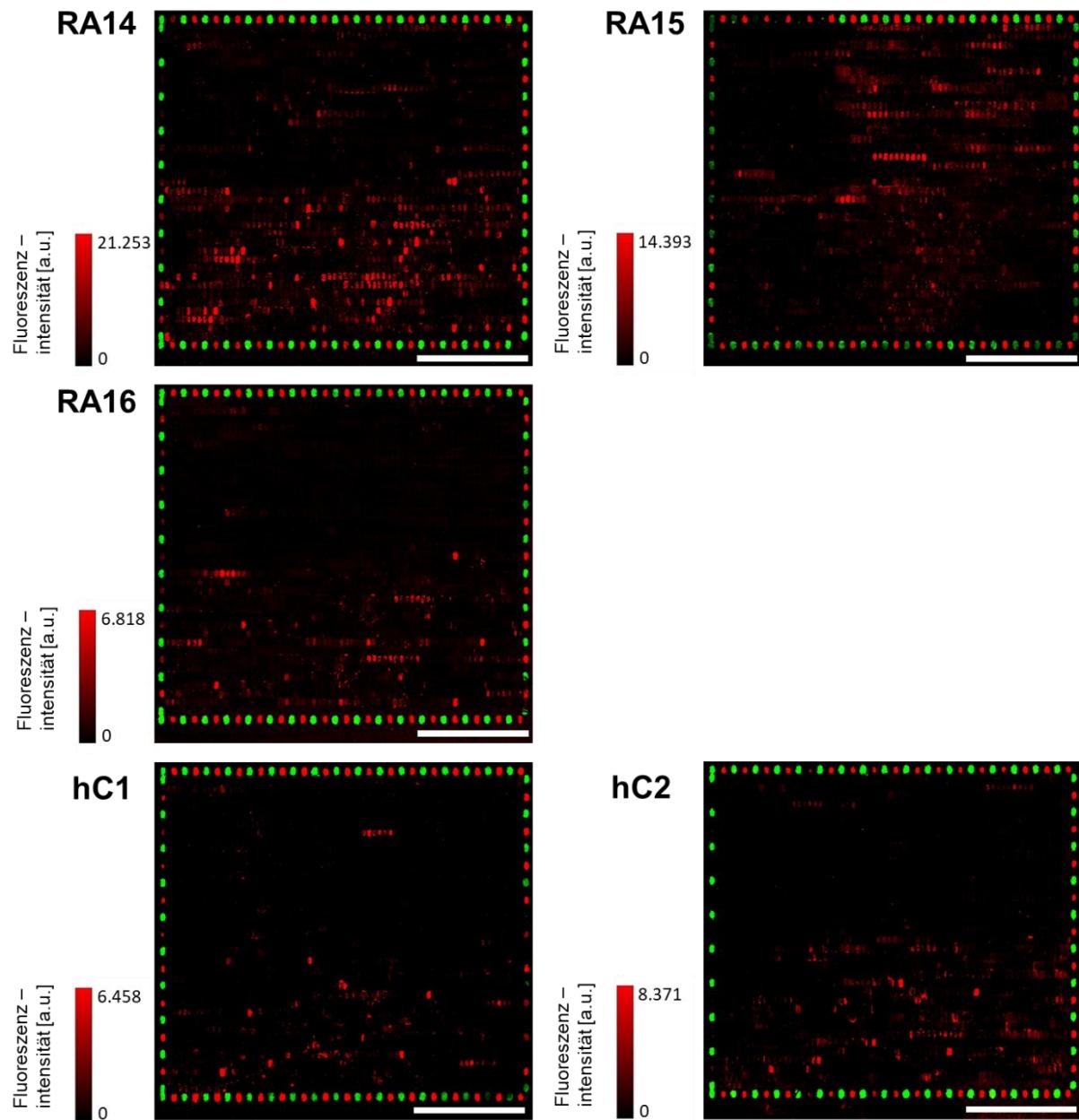


Abbildung 46: Fluoreszenzscans des Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ2 und Vimentin nach Inkubation mit den Seren RA14-16, den gesunden Kontrollseren hC1 und hC2, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 7,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Die Fluoreszenzscans in Abbildung 46 zeigen die Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2, sowie citrulliniertem Vimentin nach der Inkubation mit den Rheumaseren RA14-16, sowie den Kontrollseren hC1-hC2. Serum RA14 zeigt in der unteren Hälfte des Epitopmappings einige deutlich erkennbare Peptidbanden mit einer maximalen Fluoreszenzintensität von 21.253 a.u.. Diese nebeneinander gebundenen Peptide sind charakteristisch für eine potenzielle Antigenbindestelle (Epitop) eines Antikörpers. Serum RA15 besitzt hingegen deutlich erkennbare Peptidbanden im oberen Bereich des Peptidarrays mit einer maximalen Fluoreszenzintensität von 14.393 a.u.. Im Vergleich zu Serum RA14 werden hier tendenziell andere Peptide gebunden, was im Folgenden in einer genaueren Analyse betrachtet wird. Serum RA16 besitzt, ähnlich wie Serum RA14, eher Peptidbanden im unteren Bereich des Peptidarrays. Allerdings ist die maximale Fluoreszenzintensität mit 6.458 a.u. insgesamt geringer als die Intensität der Seren RA14 und 15. Die beiden Kontrollseren hC1 und hC2 zeigen überwiegend einzelne fluoreszierende Peptidspots als Peptidbanden. Daher liegen hier voraussichtlich kaum bzw. nur vereinzelte Epitope vor. Die maximale Fluoreszenzintensität beider Kontrollseren liegt in einem ähnlichen Bereich von 6.458 a.u. (hC1) und 8.371 a.u. (hC2).

Zu genauen Auswertung wurde jeweils für ein Serum das Intensitätsmaximum bestimmt, sowie alle anderen Intensitäten auf das Intensitätsmaximum des Serums normiert. Dieses Vorgehen wurde für alle Seren wiederholt, damit die gefundenen Epitope im gleichen Verhältnis innerhalb der unterschiedlichen Seren verglichen werden können. Des Weiteren wurde das 90 % Quantil der normierten Intensitäten berechnet und alle Werte gleich Null gesetzt, die unter diesem Wert waren. Dadurch kann die große Anzahl an detektierten Fluoreszenzsignalen minimiert werden, wodurch lediglich die stärksten und relevantesten Intensitäten für die Auswertung berücksichtigt werden. Die erhaltenen Daten werden in jeweils einer Heatmap von citrulliniertem Kollagen Typ 2 (Abbildung 47) und citrulliniertem Vimentin (Abbildung 48) dargestellt, wodurch alle Daten der Rheumaseren RA14-16 und der Kontrollseren hC1 und hC2 über die normierten Fluoreszenzintensitäten verglichen werden können. Zusätzlich sind in der Heatmap von citrulliniertem Kollagen Typ 2 (Abbildung 47) die Peptide hellblau umrandet, die zuvor bereits in Kap. 5.2.2 analysiert wurden (Peptidsequenzen 12-17).

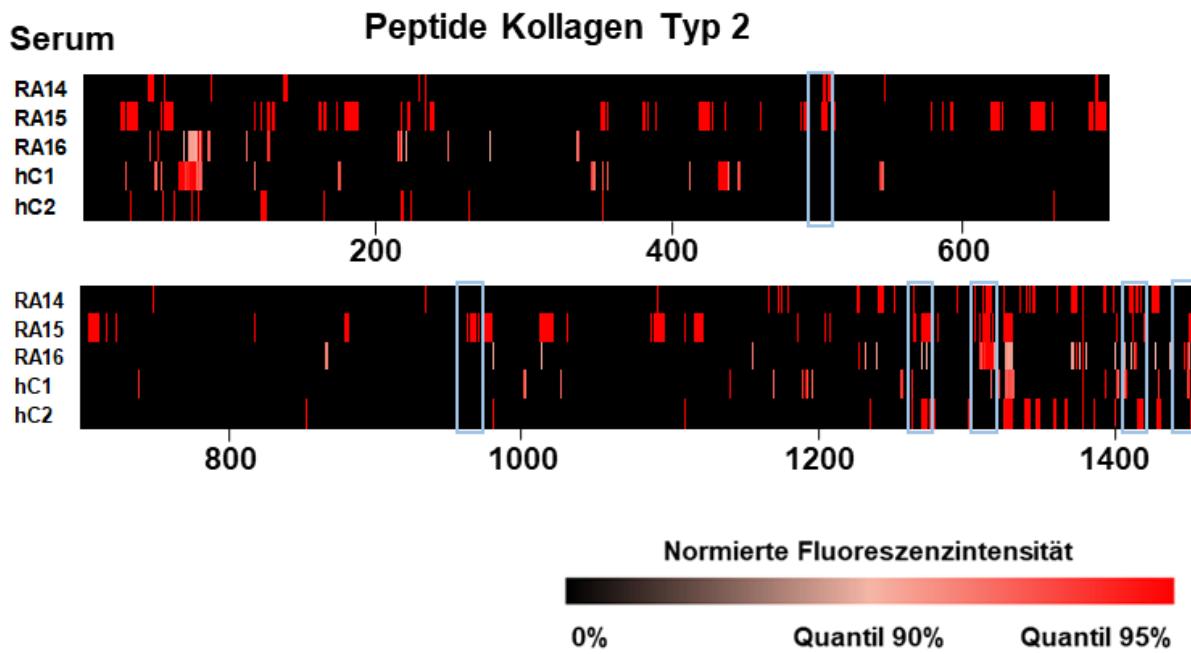


Abbildung 47: Heatmap von citrullinierten Kollagen Typ 2 Peptide (Länge: 1473 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA14-16) und Kontrollseren (hC1-2). Die Fluoreszenzintensitäten wurden normierten auf das Intensitätsmaximum des jeweiligen Serums. Die blauen Rahmen entsprechen den Peptiden 12-17, die in Kap. 5.2.2 bereits näher analysiert wurden.

Die Auswertung aller erhaltener Intensitäten über die Heatmap (Abbildung 47) von citrulliniertem Kollagen Typ 2 zeigt die Darstellung der normierten Intensität jedes erhaltenen Peptids für jedes RA und hC Serum. Die Anordnung der Intensitäten untereinander ermöglichen einen direkten Vergleich der Signale jedes Peptids mit jedem Serum. Dabei ist einerseits auffällig, dass die eingesetzten Rheumaseren aus dem Frühstadium einige gemeinsame mögliche Epitope besitzen, allerdings sind diese nicht so eindeutig bzw. identisch wie zunächst angenommen. Andererseits zeigen einige Kontrollseren ähnliche Banden zu manchen möglichen Epitopen. Des Weiteren können ebenfalls Signale der Rheumaseren bei den Peptiden 12-17 detektiert werden, die bereits in Kap. 5.2.2 näher betrachtet wurden. Dabei wurden die Sequenzen 12-14, sowie 16-17 jeweils durch ein Rheumaserum gebunden. Die Peptidsequenz 15 (ANVPKKNNWWSSKSKE) wurde von allen drei eingesetzten Rheumaseren gebunden, wodurch hier möglicherweise ein gemeinsames Bindungsmotiv vorliegen könnte.

Neben den bereits analysierten Peptiden, konnten insgesamt 10 weitere Peptide zu Kollagen Typ 2 identifiziert werden, die möglicherweise ein relevantes Bindungsmotiv eines Antikörpers besitzen könnten. Davon wurden zwei Sequenzen durch zwei Rheumaseren gebunden, wodurch wiederum die Möglichkeit eines gemeinsamen

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Antikörpers besteht. Diese Erkenntnisse sind zusammen mit der Analyse der Heatmap von citrulliniertem Vimentin aus der folgenden Abbildung in Tabelle 17 dargestellt.

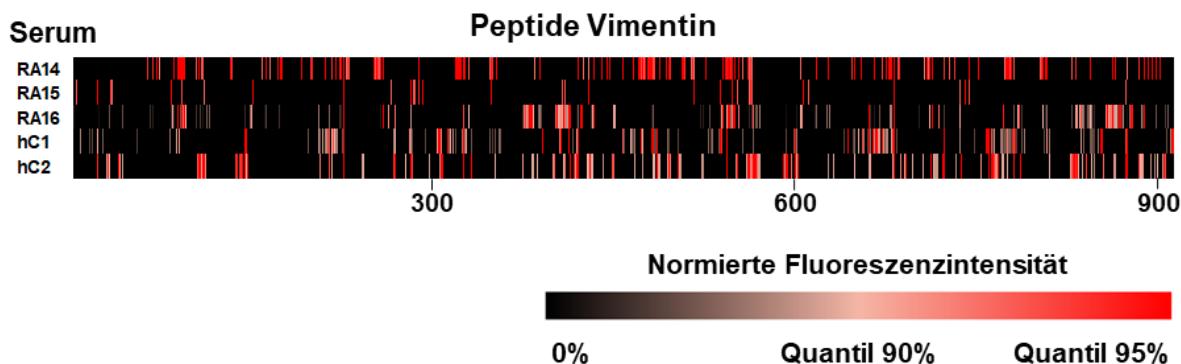


Abbildung 48: Heatmap von citrullinierten Vimentin Peptide (Länge: 914 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA14-16) und Kontrollseren (hC1-2). Die Fluoreszenzintensitäten wurden normierten auf das Intensitätsmaximum des jeweiligen Serums.

Die Heatmap (Abbildung 48) von citrulliniertem Vimentin zeigt die Darstellung der normierten Intensitäten jedes erhaltenen Peptids für jedes RA und hC Serum. Insgesamt sind im Vergleich zu citrulliniertem Kollagen Typ 2 eine deutlich höhere Anzahl an detektierten Signalen zu beobachten. Dabei besitzt Serum RA14 visuell die meisten Peptidbanden, wohingegen Serum RA15 nahezu keine möglichen Epitope aufzeigt. Serum RA16 zeigt einige gemeinsame Peptidbanden zu Serum RA14, wobei die Fluoreszenzintensitäten bei Serum RA16 deutlich geringer ausfallen. Die Kontrollseren zeigen ebenfalls eine Vielzahl an Signalen, allerdings sind die Mehrheit der Signale in den Fluoreszenzintensitäten geringer und dadurch vernachlässigbar. Für die weitere Analyse möglicher Epitope wurden einerseits die generelle Anzahl an gebundenen aufeinanderfolgenden Peptiden (mindestens 5) betrachtet, sowie die Anzahl der gebundenen Seren. Dadurch werden irrelevante Signale ausgeschlossen und lediglich mögliche relevante Epitope betrachtet. Zudem werden somit besonders die Epitope betrachtet, die durch einen möglichen gemeinsamen Antikörper gebunden werden. Insgesamt konnten 14 Peptide identifiziert werden, die ein potenzielles Epitop besitzen, Davon wurden fünf Peptide von jeweils zwei Rheumaseren gebunden und ein Peptid durch alle drei Rheumaseren. Das Bindungsverhalten der Antikörper an citrulliniertes Vimentin, sowie die an citrulliniertes Kollagen Typ 2 sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Tabelle 17: Zusammenfassung der möglichen Epitope von citrulliniertem Kollagen Typ 2 (COL) und Vimentin (VIM), sowie die Bindungseigenschaften der Seren RA14-RA16. ((x) = Fluoreszenzintensität liegt unter 10 % der max. Intensität)

Peptidsequenz	Nr.	Position im Protein	Serum RA14	Serum RA15	Serum RA16	Serum hC1	Serum hC2
IGPPGEZGAPGNZGF	12	COL, 503	(x)	x			
ZGIVGLPGQZGEZGF	13	COL, 980		x			
KLCHPEWKSGDYWID	14	COL, 1287		x			(x)
ANVPKKNWWSKSKE	15	COL, 1329	x	x	x		
GKWGKTVIEYZSQKT	16	COL, 1443	(x)				
GPEQEFGVDIGPVCF	17	COL, 1472		x	(x)		
SCVQDGQZYNDKDVW	18	COL, 33		x			
VCDTGTVLCLDDIICE	19	COL, 56		x			
AGGFDEKAGGAQLGV	20	COL, 184		x			
LPGAPGLZGLPGKDG	21	COL, 622		x			
GPAGEZGEQGAPGPS	22	COL, 648		x			
GAPGLVGPZGEZGFP	23	COL, 690	x	x			
GPAGEPGZEGSPGAD	24	COL, 1029		x			
ZGIQGPQGPZGDKGE	25	COL, 1106		x			
DQAAGGLZQHDAEVD	26	COL, 1242	x		x		
KHIWFGETINGGFHF	27	COL, 1345		x	(x)	(x)	(x)
LADAINTEFKNTRTN	28	VIM, 88	x	(x)	x		
VESLQEEIAFLKKLH	29	VIM, 224	x		x	(x)	
VDVSKPDLTAALRDV	30	VIM, 258	x		x		
VQSLTCEVDALKGTN	31	VIM, 323	x				
VEAANYQDTIGRLQD	32	VIM, 353	x				
EYQDLLNVKMAVDIE	33	VIM, 382			x		
LPLPNFSSLNLRETN	34	VIM, 413			x		
SZPSSSZSYVTTSTZ	35	VIM, 479	x				
ADAINTEFKNTZTNE	36	VIM, 546	x		x		
LQELNDZFANYIDKV	37	VIM, 564	x	x	x		(x)
VESLQEEIAFLKKLH	38	VIM, 681	x		(x)	(x)	
VDVSKPDLTAALZDV	39	VIM, 715	x		x		
VQSLTCEVDALKGTN	40	VIM, 780	x		(x)	(x)	
LPLPNFSSLNLZETN	41	VIM, 870			x		

Die tabellarische Darstellung zeigt die erhaltenen, möglichen Bindungsmotive der Inkubation mit den Seren RA14-16 und hC1-2. Dabei wurden alle Peptidsequenzen dargestellt die bereits analysiert wurden (Peptide 12-17), sowie die Sequenzen, die ein neues potenzielles Epitop besitzen (Peptide 18-41). Es können insgesamt 16 Peptidsequenzen identifiziert werden, die mögliche Epitope des citrullinierten Kollagen Typ 2 erhalten, sowie 14 Sequenzen des citrullinierten Vimentin. In der folgenden Analyse werden ausschließlich die Signale der Rheumaseren diskutiert, da die Inkubation mit den Kontrollseren lediglich Signale in einem vernachlässigbaren Bereich von <10 % der maximalen Fluoreszenzintensität besitzen. Sie sind zur Vervollständigung der Analyse trotzdem in der Tabelle mit aufgeführt, da die Signale zwar gering sind, aber dennoch eine Gemeinsamkeit der bindenden Antikörper

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

bestehen könnte. Hierdurch würde die ursprüngliche These eines spezifischen Rheumaantikörpers für diagnostische Peptide widerlegt werden. Jedoch müssten für genaue Aussagen über die Antikörper eine Aufreinigung der Antikörper und eine Analyse deren Struktur durchgeführt werden.

Die bereits analysierten Sequenzen 12-14 und 17 konnten dabei überwiegend von Serum RA15 gebunden werden. Sequenz 16 konnte nicht eindeutig durch die Rheumaseren gebunden wurden und besitzt lediglich bei Serum RA14 ein geringes Fluoreszenzsignal (<10 % der max. Intensität). Sequenz 15 wird eindeutig durch alle drei Rheumaseren gebunden, wodurch hier die Vermutung eines gemeinsamen Bindungsmotivs besteht. Dabei könnten die bereits erhaltenen Motive der Seren RA10 und RA13 bekräftigt werden, wodurch ein deutlicheres gemeinsames Motiv erhalten werden könnte. Zudem würde dadurch die Annahme eines gemeinsamen Autoantikörpers gegen rheumatoide Arthritis bestärkt werden. Die weiteren Peptidsequenzen 18-22, 24-25 und 27 werden jeweils durch ein RA Serum gebunden, wohingegen die Sequenzen 23 und 26 durch je zwei RA Seren gebunden werden. Im Vergleich zu der Inkubation in Kap. 5.2.2 konnten hier bei allen zusätzlichen Sequenzen jeweils Signale von 1-2 RA bzw. SjS Seren detektiert werden. Allerdings sind die Fluoreszenzintensitäten dieser Inkubation, sowie der Inkubation in Kap. 5.2.2 um ein vier bis sechsfaches geringer, als die Intensitäten der Sequenzen 12-17 der Seren RA7-13. Somit besteht hier zwar die Vermutung eines möglichen gemeinsamen Epitops, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit durch die niedrigere Intensität deutlich geringer. Zudem konnte durch die Bindung des Serums RA15 (Serum aus Frühstadium) an dieselben Peptide wie in Kap. 5.2.2 keine eindeutigen Unterschiede zu den spät diagnostizierten Patienten gezogen werden. Es konnte lediglich allgemein niedrigere Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden, sowie eine geringe und tendenziell schwächere Bindung der Seren RA14 und 16 an Kollagen Typ 2. Daher wurden keine weiteren Substitutionsanalysen zu diesen Peptiden durchgeführt.

Die 14 detektierten Sequenzen von citrulliniertem Vimentin zeigen überwiegend die höchsten Fluoreszenzintensitäten der durchgeführten Arrayinkubationen und sind im Vergleich zu den Kollagen Typ 2 Peptidsequenzen um ein vier bis sechsfaches höher. Insgesamt wurden acht der Sequenzen (31-35, 38, 40-41) eindeutig durch jeweils ein RA Serum, fünf Sequenzen (28-30, 36, 39) durch zwei RA Seren und Sequenz 37 durch alle drei RA Seren gebunden. Dadurch besteht auch bei Vimentin die Wahrscheinlichkeit ähnlicher Bindungsmotive bzw. daraus resultierende ähnlicher

Antikörper in verschiedenen Patientenserien. Eine weitere Auffälligkeit ist die Aminosäure Citrullin (Z) in fünf der Vimentin-, sowie neun der zehn zusätzlichen Kollagen Typ 2-Sequenzen. In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass Citrullin möglicherweise eine essenzielle Rolle in der Pathogenese von rheumatoider Arthritis spielen könnte und eine potenzielle Ursache für die Ausbildung der Krankheit darstellt. Das Auftreten der PTM in den Vimentin-Peptiden dieser Studie könnte diese These ebenfalls stützen. Zudem wäre eine Inkubation der citrullinierten Vimentin-Peptide durch die RA Seren 1-13 aufschlussreich, um weitere Gemeinsamkeiten der Seren in den Bindungsmotiven zu untersuchen. Jedoch wäre für eine weitere Untersuchung der Epitope, sowie einer konkreten Analyse über die Aminosäuren der Bindungsmotive, ein deutlich größerer Pool an Patientenserien nötig.

Insgesamt konnten durch die Inkubation von citrulliniertem Kollagen Typ 2 und Vimentin mit drei RA Seren aus der Frühdiagnostik verschiedene Erkenntnisse erlangt werden. Einerseits konnten 16 Peptide von Kollagen und 14 Peptide von Vimentin identifiziert werden, die von mindestens einem Serum gebunden wurden. Dabei wurden ebenfalls die Peptide 12-17 aus der Analyse in Kap. 5.2.2 überwiegend durch Serum RA15 gebunden. Des Weiteren wurden ebenfalls die 10 zusätzlichen Peptide von Kollagen Typ2 durch die Seren aus dem Frühstadium (RA14-16), sowie verschiedene Seren aus einem späteren Stadium (RA7-13) gebunden. Dadurch können keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Inkubationen mit den Seren aus dem Frühstadium und den Seren aus dem Spätstadium gezogen werden. Möglicherweise könnte jedoch ein gemeinsamer Antikörper bei beiden Stadien an Seren bestehen, da die meisten detektierten Peptidbanden und Epitope bei beiden Kategorien an RA Seren aufzufinden sind. Bei Vimentin konnten ebenfalls deutliche Epitope bei 14 Sequenzen detektiert werden, wobei sechs Sequenzen von mindestens zwei Seren gebunden wurden. Somit könnten bei beiden Proteinen ähnliche Antikörper in verschiedenen Seren vorliegen, wodurch weiterhin die Möglichkeit einer gemeinsamen Ursache zur Ausbildung der Antikörper besteht. Des Weiteren könnten die potenziell ähnlichen Antikörper auch charakteristische Eigenschaften zur Diagnose von rheumatoider Arthritis besitzen. Durch eine Studie mit einem großen Pool an verschiedenen Patienten könnten diese Beobachtung weiter erforscht werden. Zudem könnte auch die PTM Citrullin in den detektierten Peptiden dieses Experiments eine relevante Rolle bei rheumatoider Arthritis spielen und ggf. die Ursache für die

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Ausbildung der Krankheit darstellen. Allerdings müssten auch hier weitere und deutlich größere Studien durchgeführt werden, damit eindeutige Schlüsse zu der Rolle von Citrullin gezogen werden können.

5.3 Biologische Anwendung von Phosphorylierungen in Peptidarrays

Phosphorylierungen zählen zu den am häufigsten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen und konnte neben neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer^[159-160] und Parkinson^[161] auch bei dem Hepatitis B Virus (HBV) detektiert werden^[164-165]. Beispielsweise konnten Phosphorylierungen von Serin bei HBc Proteinen, den Kapsidproteinen, gefunden werden^[164]. Ebenso konnten Phosphorylierungen an strategischen Stellen von HBs Proteinen (Oberflächenproteinen) entdeckt werden, wodurch ein möglicher Zusammenhang in der Virionenbildung oder dem Zelleintritt bestehen könnte^[165]. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang von (De-) Phosphorylierungen und der homöostatischen Ladung der Virushüllen, sowie der Verpackung der viralen, prägenomischen RNA festgestellt werden^[189].

Gegebenenfalls könnten gezielt, durch die Phosphorylierung, eingesetzte leere Virushüllen immunmodulatorische Funktionen besitzen, wodurch die Toleranz des HBV induziert wird. Die Förderung dieser Toleranz könnte durch die Wechselwirkung mit regulatorischen B-Zellen (Bregs) erfolgen, die diese leeren Virushüllen internalisieren. Aufgrund der Internalisierung besteht für den menschlichen Organismus keine Möglichkeit die leeren Virushüllen als körperfremd zu erkennen. Diese Internalisierung könnte ggf. durch die Präsentation spezifischer Antikörper auf der Oberfläche der Bregs erfolgen, welche anschließend von T-Zellen erkannt werden. Des Weiteren produzieren Bregs Zytokine, wie Interleukin-10, welche die Aktivität von T-Zellen beeinflussen können^[212], wodurch die T-Zellen die präsentierten Proteine als körpereigen erkennen könnten. Daraus ergibt sich die Spekulation, dass das Hepatitis B Virus versucht, das Immunsystem zu beeinflussen, leere Virushüllen als körpereigen erkennt und dadurch chronische Infektionen zu begünstigen. Eine Möglichkeit, die Virushüllen mit viraler DNA zu befüllen, könnten Phosphorylierungen sein. Zur Untersuchung dieser Hypothese soll ein Epitopmapping des HBV Genoms mit dem nano3D-Drucker synthetisiert werden, sowie eine Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin, Serin und Tyrosin erfolgen. Abschließend soll eine Inkubation des Peptidarrays mit einem HBV Patientenserum (Anti-HBs) vorgenommen werden.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Für dieses Vorhaben wurde zunächst eine Methode zur Integration von phosphorylierten Aminosäuren in Peptidarrays entwickelt (siehe Kap. 4.1.1). Für das Epitopmapping wurde das Protein in Peptidsequenzen von jeweils 15 Aminosäuren aufgeteilt, die jeweils eine Überlappung von einer Aminosäure zur vorherigen Peptidsequenz besitzen und jedes Peptid in Doppelspots transferiert wurde. Dadurch kann die komplette Aminosäuresequenz von dem Hepatitis B Virus (Aminosäuresequenz aus UniProt^[213-216]), bestehend aus den Hauptgenen P^[216] (Polymerase), X^[215] (regulatorische Proteine), C^[214] (Kapsidprotein, engl.: *capsid protein*) und S^[213] (Oberflächenproteine, engl.: *surface proteins*) in überlappenden Peptiden dargestellt kann. Als Positivkontrollen der erfolgten Synthese wurden HA Peptide als Rahmen gewählt. Für die Peptidsynthese wurde zunächst eine Fmoc-Entschützung der Syntheseoberfläche vorgenommen, sowie ein anschließender laserbasierter Transfer, sowie Kupplung an die Oberfläche von allen benötigten Aminosäuren. Danach wurde eine Acetylierung vorgenommen und so lange die Fmoc-Entschützung, der Transfer, die Kupplung und die Acetylierung wiederholt, bis die gewünschte Peptidlänge von 15 Aminosäuren erreicht wurde. Anschließend wurde eine Seitenkettenentschützung durchgeführt, sowie eine Phosphorylierung von Threonin, Serin und Tyrosin über eine Phosphinylierung mit Bis(2-(trimethylsilyl)ethyl) diisopropylphosphoramidit (**65**) und eine nachfolgende Oxidation. Es wurde erneut eine Seitenkettenentschützung, sowie eine Fmoc-Entschützung und Serum Inkubation eines Anti-HBs Serums und eines Kontrollserums (hC3) durchgeführt. Die Verdünnung der verwendeten Seren betrug für dieses Experiment jeweils 1:50. Die Seren wurden anonymisiert erhalten, wobei einige Informationen über Konzentrationen von Antikörpern wie bspw. das Geschlecht und Alter der Patienten in Tabelle 27 im Anhang (Seite 181) einzusehen sind. Abschließend wurde eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647, sowie dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 vorgenommen.

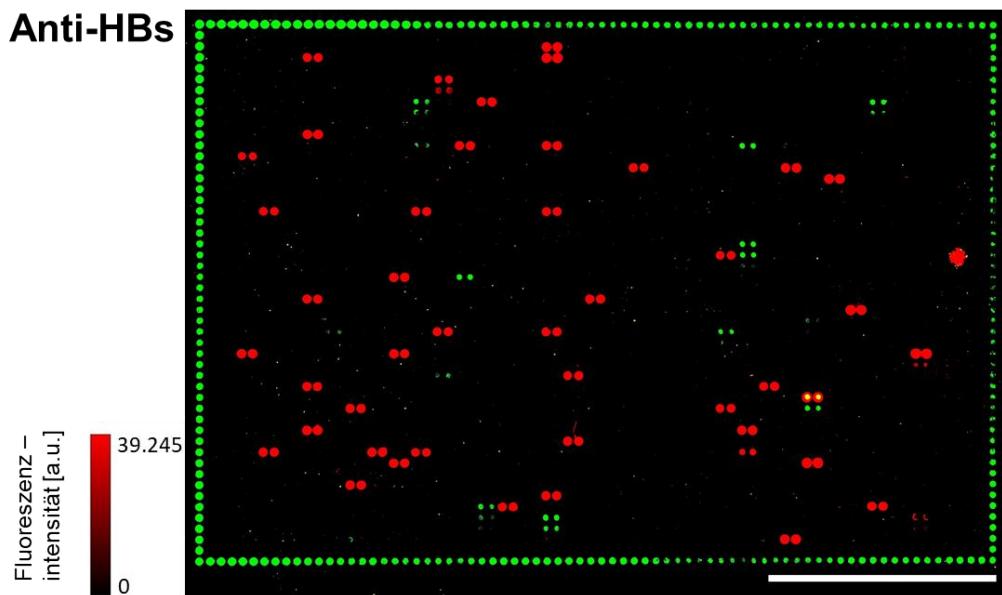


Abbildung 49: Fluoreszenzscan des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 3,00 und 9,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

Der Fluoreszenzscan der Synthese des Epitopmappings der phosphorylierten HBV Peptide nach der Inkubation mit dem Anti-HBs Serum ist in Abbildung 49 dargestellt. Zunächst kann durch die detektierten Fluoreszenzsignale ein genereller Erfolg der Synthese verifiziert werden. Diese kann ebenfalls durch die Synthese der HA Peptide (grün) als Kontrollrahmen durch die Anbindung des monoklonalen HA Antikörpers nachgewiesen werden. Es konnte lediglich eine Fluoreszenzemission der HBV Peptide durch die Anknüpfung des Anti-HBs Serums festgestellt werden. Die Inkubation des gesunden Kontrollserums (hC3) zeigte keine relevante Fluoreszenzemission der HBV Peptide, weshalb hier keine weitere Auswertung vorgenommen wurde. Der vollständige Fluoreszenzscan ist daher im Anhang (Abbildung 61, S. 191) einzusehen. Anhand des Scans der Inkubation mit dem Anti-HBs Serums sind auffällige Doppelspots von verschiedenen HBV Peptiden zu erkennen. Diese besitzen allerdings kaum die charakteristischen Peptidbanden eines Epitopmappings von einem wandernden Bindungsmotiv in aufeinanderfolgenden Peptidsequenzen. Zur genaueren Analyse wurden die detektierten Fluoreszenzemissionen der Doppelspots gemittelt, auf die maximale Fluoreszenzintensität normiert und in einer Heatmap aufgetragen.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

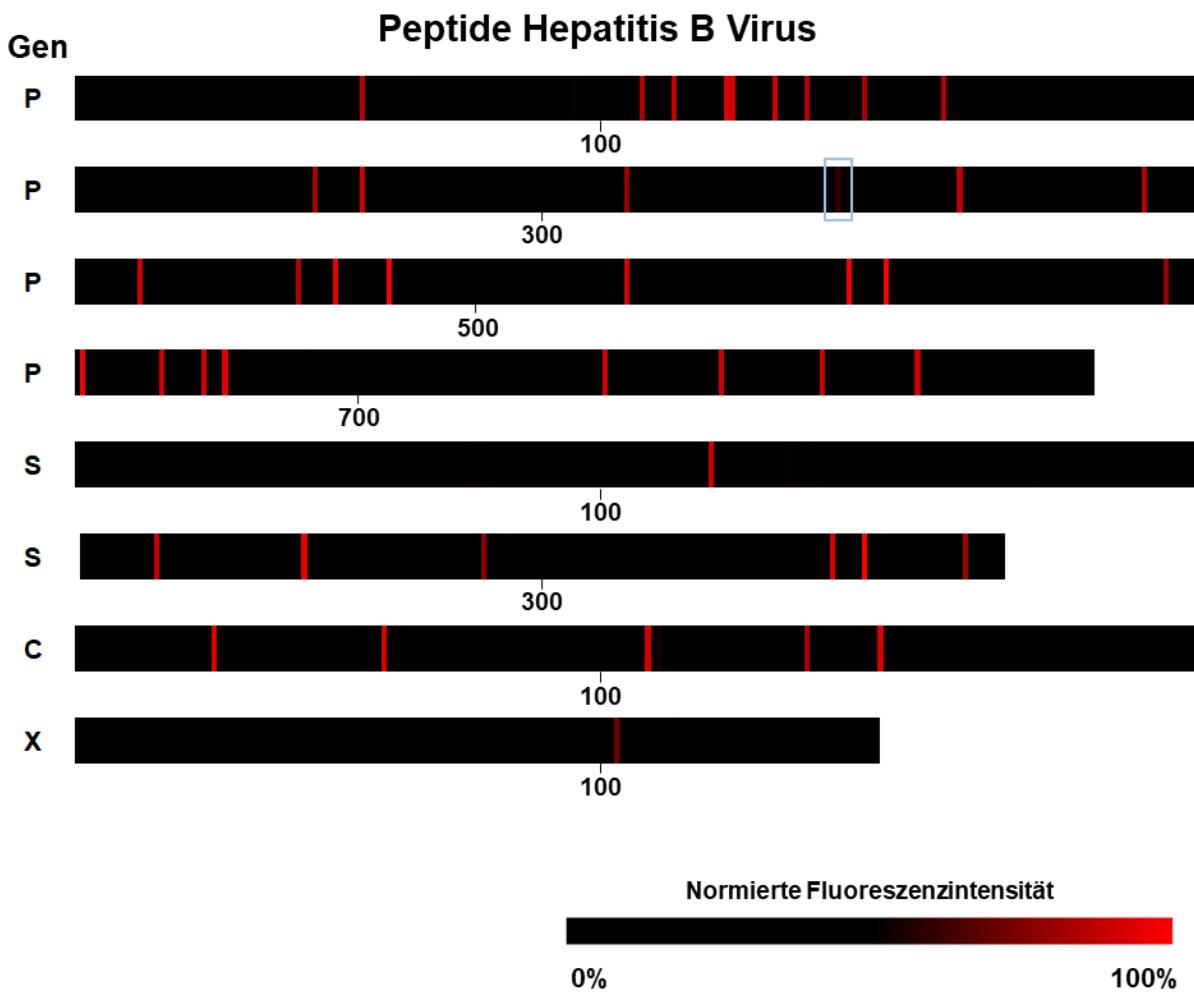


Abbildung 50: Heatmap des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum. Die hellblaue Markierung entspricht der später analysierten Sequenz PRtPARVtGGVFLVD

Anhand der Darstellung durch die Heatmap sind ebenfalls lediglich einzelne Banden zu erkennen, wodurch die Beobachtung des Fluoreszenzscans bestätigt wird (Abbildung 50). Die Peptide mit den stärksten Intensitäten besitzen zudem die Gemeinsamkeit eines C-terminalen Phosphotyrosins. Hierbei könnte möglicherweise eine Einlagerung des Sekundärantikörpers in die Polymer-Schicht der Oberfläche der Grund sein. Ebenfalls könnten die Signale ein Artefakt sein, der nach Rücksprache mit PEPperPRINT GmbH des Öfteren beobachtet werden kann durch einen zu kurzen C-terminalen Spacer. Neben den C-terminalen Signalen konnte zudem ein mögliches Epitop der Sequenz PRtPARVtGGVFLVD ($t = p\text{Thr}$) detektiert werden. Um diese Annahme zu überprüfen, sowie C-terminale Signale zu reduzieren wurde die Synthese mit einem C-terminalen Asparaginsäure- β -Alanin-Spacer an der Syntheseoberfläche durch die Firma PEPperPRINT GmbH wiederholt.

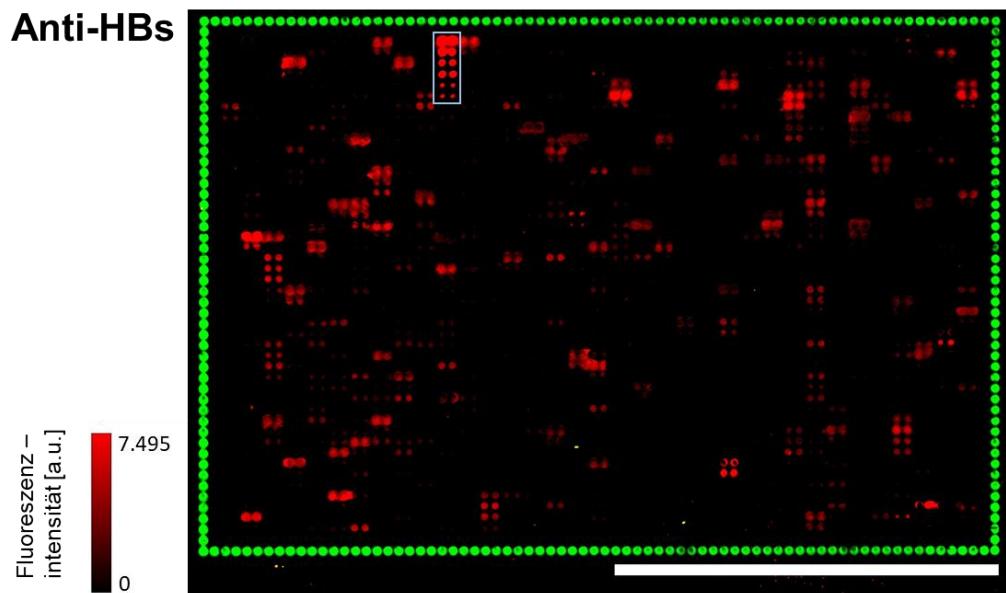


Abbildung 51: Fluoreszenzscan der Wiederholung des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Die hellblaue Umrandung zeigt die Position des später analysierten Epitops. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 9,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm

Der Fluoreszenzscan der Wiederholung des Epitopmappings ist in Abbildung 51 dargestellt. Die Wiederholung der Synthese zeigt eine deutliche Minderung der C-terminalen Signale. Ebenfalls kann die maximale Fluoreszenzintensität von 7.495 a.u. bei den umrandeten Peptidspots in der Abbildung detektiert werden. Diese Peptidspots zeigen zusätzlich visuell die meisten aufeinanderfolgenden fluoreszierenden Spots, wodurch ein Epitop hier sehr wahrscheinlich ist. Außerdem können einige zusätzliche, auf charakteristischer Weise nebeneinanderliegende Peptide detektiert werden, die möglicherweise relevante Epitope enthalten können. Zur genaueren Auswertung wurden die detektierten Fluoreszenzemissionen der Doppelspots gemittelt, auf die maximale Fluoreszenzintensität normiert und in einer Heatmap aufgetragen.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

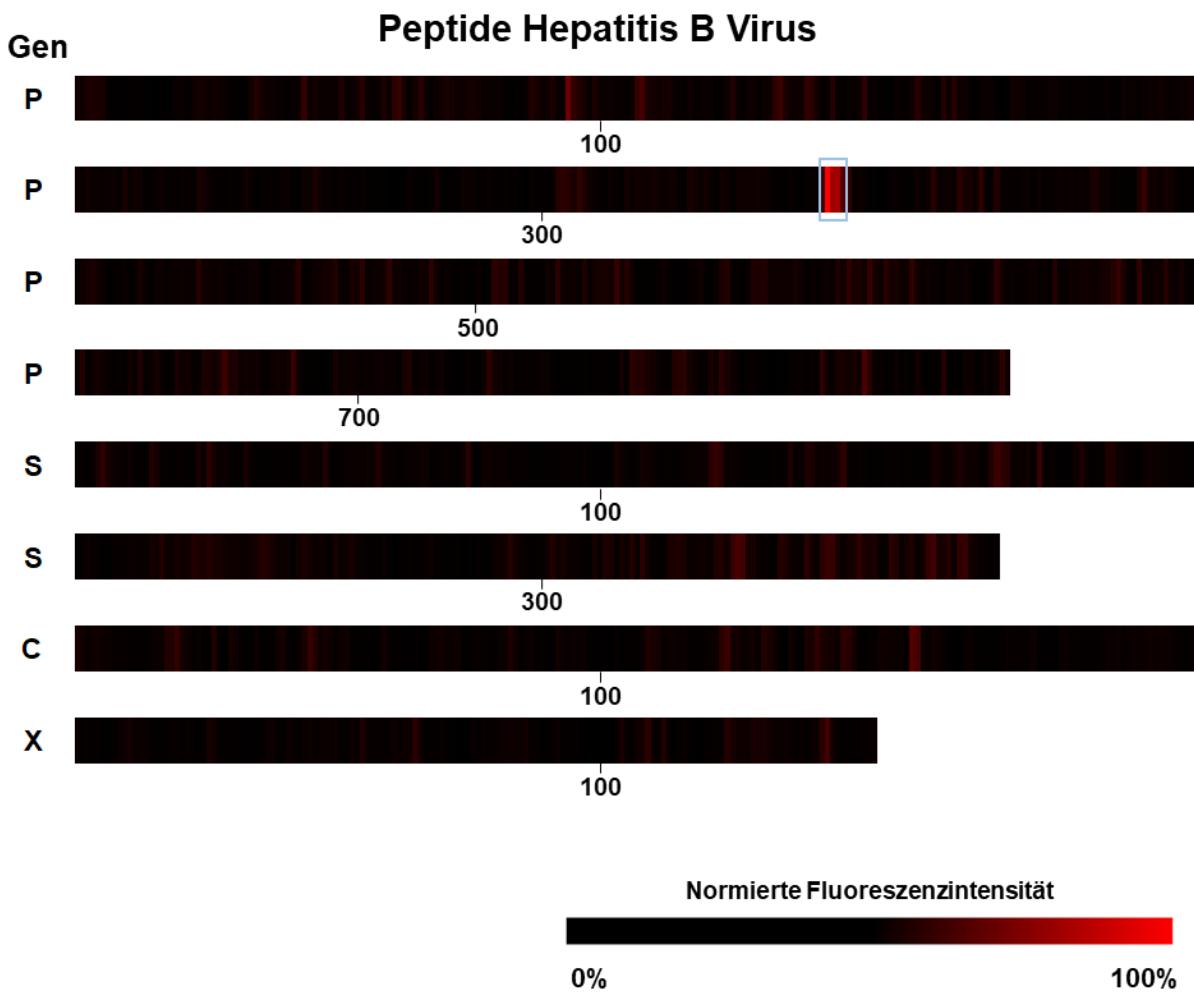


Abbildung 52: Heatmap der Wiederholung des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum. Die hellblaue Markierung entspricht der später analysierten Sequenz PRtPARVtGGVFLVD

Anhand der Darstellung über die Heatmap in Abbildung 52 ist überwiegend die bereits in Abbildung 51 hervorgehobenen Peptibande zu erkennen. Diese ist die bereits in der ersten Synthese detektierte Sequenz PRtPARVtGGVFLVD. Die detektierte Fluoreszenzintensität ist in der wiederholten Synthese identisch zur ersten Synthese. Ebenfalls besitzt die Sequenz nun das Intensitätsmaximum, da keine starke Fluoreszenz bei Peptiden mit C-terminalem Phosphotyrosin mehr detektiert werden kann. Ebenfalls besitzt die Sequenz zwei Phosphothreonine, welche möglicherweise die Ursache für den Einbau der viralen DNA in die Viruspartikel sein könnten. Die weiteren Signale des Epitopmappings besitzen eine deutlich niedrigere Fluoreszenzintensität (ca. 30 % der maximalen Intensität), wodurch die Wahrscheinlichkeit eines Epitops deutlich geringer ist. Daher wurde zunächst lediglich

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

eine Substitutionsanalyse der Sequenz PRtPAVtGGVFLVD durchgeführt, um die genaue Aminosäuresequenz des detektierten Epitops aufzuschlüsseln.

Substitutionsanalyse: PRtPARVtGGVFLVD

Für die Substitutionsanalyse der Sequenz PRtPARVtGGVFLVD wurden alle Aminosäuren der originalen Peptidsequenz durch alle 20 proteinogenen Aminosäure und Phosphothreonin, -serin und -tyrosin ausgetauscht, um potenzielle Bindungsmotive zu erschließen. Die Arraysynthese der Substitutionsanalysen wurde durch PEPperPRINT GmbH durchgeführt, wobei ebenfalls wieder ein Kontrollrahmen aus HA-Peptiden synthetisiert wurde. Bei der Synthese der Substitutionsanalyse konnte allerdings ein Fehler in der Sequenzabfolge, das Fehlen des zweiten Arginins, festgestellt werden. Dadurch wurde nicht die Sequenz PRtPARVtGGVFLVD, sondern PRtPAVtGGVFLVD hergestellt, wodurch die Ergebnisse gegebenenfalls beeinflusst werden. Das folgende detektierte Bindungsmotiv liegt allerdings näher am Ende der Sequenz, wodurch vermutlich keine Beeinträchtigung durch das fehlende Arginin vorhanden ist. Die bereits entschützten Syntheseoberflächen wurden abschließend mit Anti-HBs Serum (1:50 Verdünnung) und anschließend mit dem Sekundärantikörper Anti-human-IgG-AF647, sowie dem monoklonalen Antikörper Anti-HA-Cy3 inkubiert. Die erhaltenen Signale wurden ebenfalls auf die ursprüngliche Aminosäure der Originalsequenz normiert und in einer Heatmap dargestellt. Die Kontrollpeptide sind in der folgenden Abbildung zur Vereinfachung der Analyse nicht dargestellt. Der vollständige Fluoreszenzscan ist im Anhang (Abbildung 62, S.192) dargestellt.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

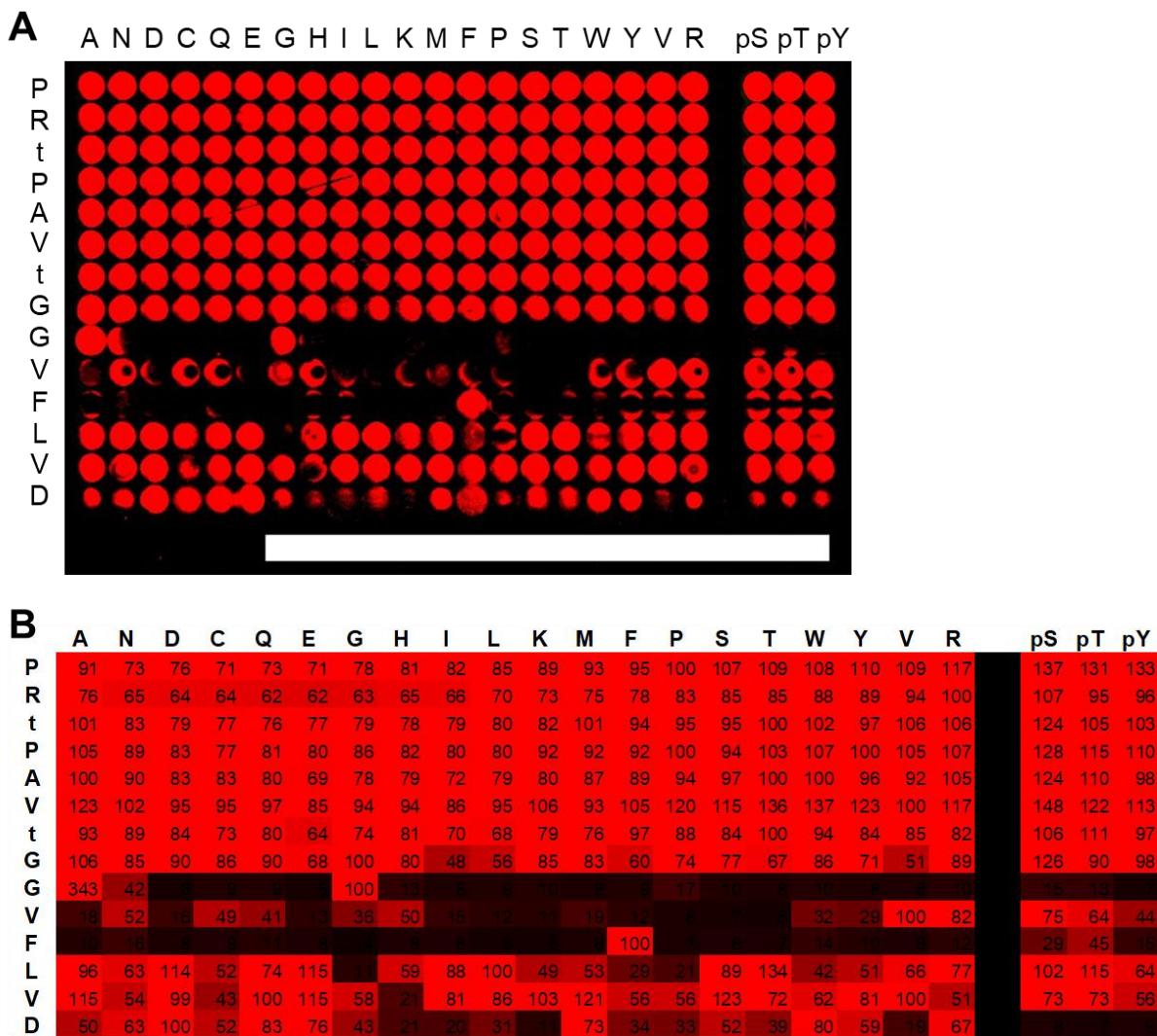


Abbildung 53: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids PRtPAVtGGVFLVD nach Inkubation mit Anti-HBs Serum und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 9,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Heatmap der Substitutionsanalyse des Peptids PRtPAVtGGVFLVD. Normierte Fluoreszenzintensitäten der substituierten Peptidsequenz auf die ursprünglichen Aminosäuren der Originalsequenz.

Der Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse der Sequenz PRtPAVtGGVFLVD zeigt ein charakteristisches Fluoreszenzmuster eines möglichen Bindungsmotivs, welches sich in den Positionen 9-11 befindet (Abbildung 53A). Zur Visualisierung der Bindung der Antikörper wurde eine Heatmap mit den normierten Fluoreszenzintensitäten auf die ursprünglichen Aminosäuren der Originalsequenz angefertigt (Abbildung 53B). Diese zeigt ebenfalls, dass die Aminosäuren in den Positionen 1-8 und 12-14 bei allen Substitutionsvarianten eine starke Fluoreszenzintensität besitzen, weshalb hier keine Aminosäure spezifisch für die Bindung des Antikörpers ist. Lediglich in Position 14 kann eine Bindung des Antikörpers durch die Aminosäuren Lysin und Valin verhindert werden.

Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

werden. Die Position 9 zeigt eine essenzielle Bindung von Glycin in Position 9, welche nur durch Alanin substituiert werden kann. Position 10 besitzt die stärkste Affinität zur ursprünglichen Aminosäure Valin, kann jedoch ebenfalls mit pT, pS und R substituiert werden. Phenylalanin in Position 11 zeigt ebenfalls eine essenzielle Bindung für den Antikörper. Daraus ergibt sich ein potenzielles Bindungsmotiv des Antikörpers G/D-V-F, welches auch tabellarisch in Tabelle 18 dargestellt ist.

Tabelle 18: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz PRtPAVtGGVFLVD für das Anti-HBs Serum. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)

Serum	Originale Aminosäuresequenz														
	P	R	T	P	A	V	T	G	G	V	F	L	V	D	
RA7	x	x	x	x	x	x	x	x	GA	pTpSRV	F	x	x	!KV	

Insgesamt kann mit dem Experiment keine Antikörperbindung gegen ein phosphoryliertes HBV Peptid gezeigt werden. Jedoch konnte durch die Inkubation mit dem Anti-HBs Serum ein Serumantikörper identifiziert werden, der gegen ein potenziell relevantes Epitop bindet. Durch eine Untersuchung mit weiteren Patientenserien könnten diese Beobachtungen bekräftigt werden. Ebenfalls könnte durch eine weitere Analyse des Antikörpers, dessen spezifischer Aufbau identifiziert werden. Da jedoch keine weiteren Patientenserien kommerziell oder durch Kooperationen erhalten werden konnten, wurde hier keine weiteren Experimente durchgeführt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

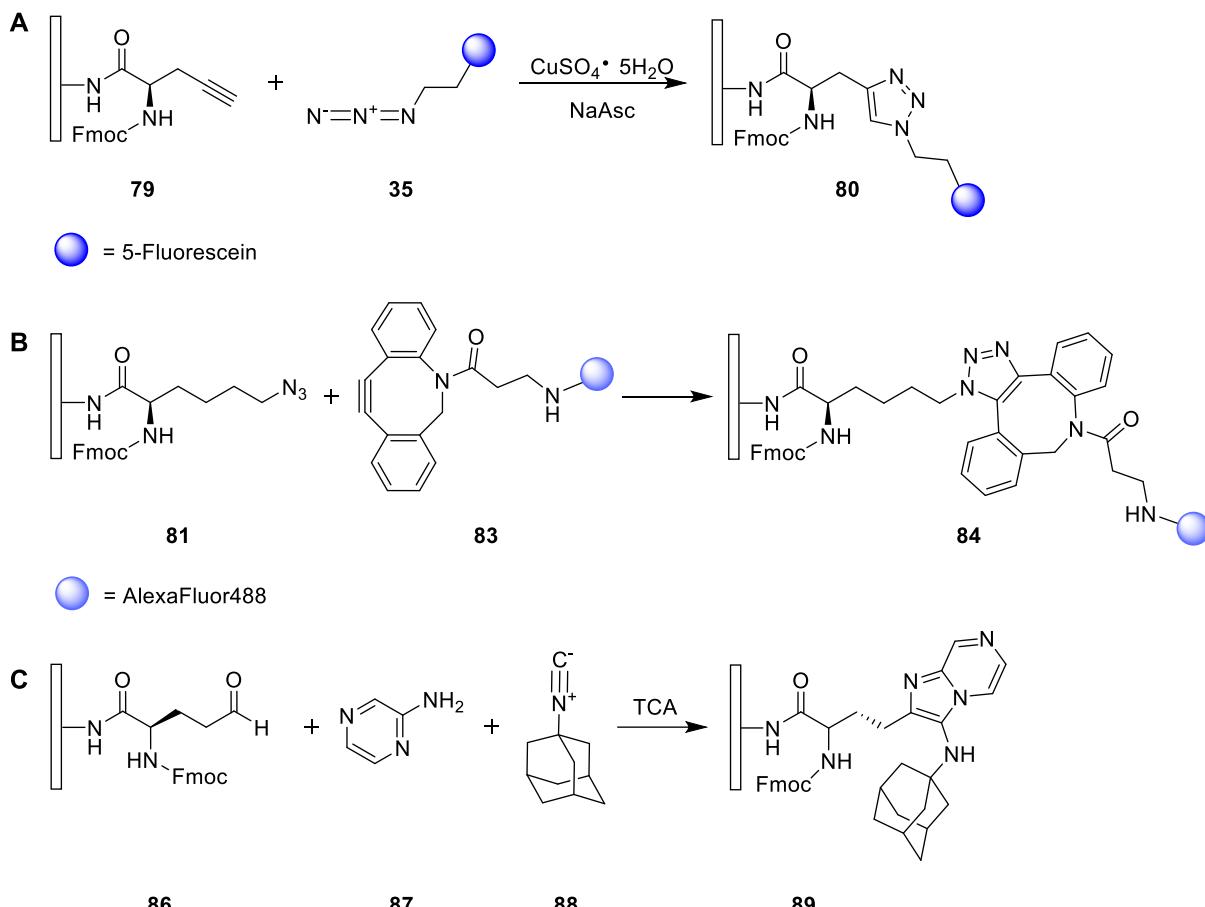
Hochdurchsatztechniken sind ein weit verbreitetes Verfahren um Bindungsstudien oder Interaktionen zwischen Peptiden oder Proteinen auf Arrays mit bspw. Antikörpern zu untersuchen. Durch die Integration von modifizierten Aminosäuren in Peptidarrays, werden neue Möglichkeiten zur Erforschung von biologisch relevanten Strukturen und deren Kombination mit chemischen Reaktionen ermöglicht. In dieser Arbeit sollten mit Hilfe des nano3D-Druckers verschiedene modifizierte Aminosäuren in Peptidarrays integriert und mit Reaktionen der Biokonjugation und Chemodetektion visualisiert, und für Bindungsstudien zur Erforschung verschiedener Krankheiten angewandt werden.

6.1 Chemische Reaktionen an modifizierten Aminosäuren

Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene modifizierte Aminosäuren mit Hilfe des nano3D-Druckers transferiert und der Übertrag für die Verwendung der Aminosäuren in Peptidarrays optimiert. Dabei konnte der Übertrag der posttranslational modifizierten Aminosäuren Citrullin, Homocitrullin, Acetyllysin, Hydroxyprolin, Azidolysin, sowie Phosphoserin, -threonin und -tyrosin *via* Fluoreszenznachweis und Massenspektrometrie verifiziert werden. Als Alternative, um phosphorylierte Aminosäuren in Peptidarrays zu integrieren, wurde die Phosphorylierung nachträglich, an bereits in Peptiden integrierten, proteinogenen Aminosäuren durchgeführt. Des Weiteren konnten die modifizierten Aminosäuren Aminobutylglycin, Allysinethylenacetal, Asparaginsäure-4-allylester, Propargylglycin und Trimethoxybenzylglycin analog über Fluoreszenz und Massenspektrometrie verifiziert werden. Ebenfalls konnten die Aminosäuren D-Asparaginsäure, D-Cystein und D-Prolin über eine Fluorophor-Anknüpfung nachgewiesen werden.

Anschließend wurden modifizierte Aminosäuren mit verschiedenen Reaktionen der Biokonjugation und Chemodetektion in Zusammenarbeit mit Jannik Schlindwein kombiniert. Dabei konnten einerseits Click-Reaktionen, wie die kupferkatalysierte Alkin-Azid Click-Reaktion (CuAAC) und die Strain-Promoted Azid-Alkin Click-Reaktion (SpAAC) an den oberflächengebundenen Aminosäuren Propargylglycin und Azidolysin durchgeführt werden. Andererseits konnte die Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaktion (GBB-Reaktion) vollständig laserbasiert an oberflächengebundenem Allysin durchgeführt werden (Schema 15).

Zusammenfassung und Ausblick



Schema 15: Durchgeföhrte Biokonjugations- und Chemodetektionsreaktionen. A) CuAAC an Propargylglycin. B) SpAAC an Azidolysin. C) GBB-Reaktion an Allysin.

Die durchgeföhrten Reaktionen der Biokonjugation und Chemodetektion dienen als Beispiel für die breite Anwendungspalette des nano3D-Druckers, welche in Zukunft durch weitere chemische Reaktionen erweitert werden kann. Zum Beispiel können weitere Click-Reaktionen wie Diels-Alder Reaktionen oder nukleophile Substitutionen mit weiteren modifizierten Aminosäuren kombiniert werden. Ebenfalls könnten in Zukunft weitere Variationen von Multikomponentenreaktionen mit modifizierten Aminosäuren kombiniert werden.

Letztendlich ist die zukünftige Verwendung des nano3D-Drucker für viele weitere Biokonjugationen und Chemodetektionen vielversprechend, da sie für die vielfältige Anwendung in der Medizin, Diagnostik und Biokatalyse angewandt werden können. Zum Beispiel könnten durch die hohe Effizienz des nano3D-Druckers eine Vielzahl an parallelen Studien zur Wirkstoffsynthese, Identifikation von Biomarkern oder der Aufschlüsselung von zellulären Reaktionswegen durchgeführt werden.

6.2 Untersuchungen verschiedener Krankheitsbilder mit Peptidarrays

Der zuvor mit Hilfe des nano3D-Druckers optimierte Übertrag der modifizierten Aminosäuren wurden im zweiten Teil der Arbeit in Bindungsstudien zu verschiedenen Krankheiten des menschlichen Immunsystems angewandt. Hierfür wurden die posttranslationalen Modifikationen Citrullin, Homocitrullin, Acetylysin und Hydroxyprolin in diagnostisch relevante Peptide integriert, um diese zur Erforschung der rheumatoide Arthritis (RA) zu verwenden. Die genutzten Peptidarrays wurden zum Screening verschiedener Proteine, wie Fibrinogen, Filaggrin, Kollagen Typ 2 und Vimentin verwendet, um einerseits Antigen-Antikörper Bindestellen (Epitope) zu identifizieren. Andererseits wurde die Rolle von PTMs für die Antikörperbindung der gefundenen Bindungsmotive untersucht.

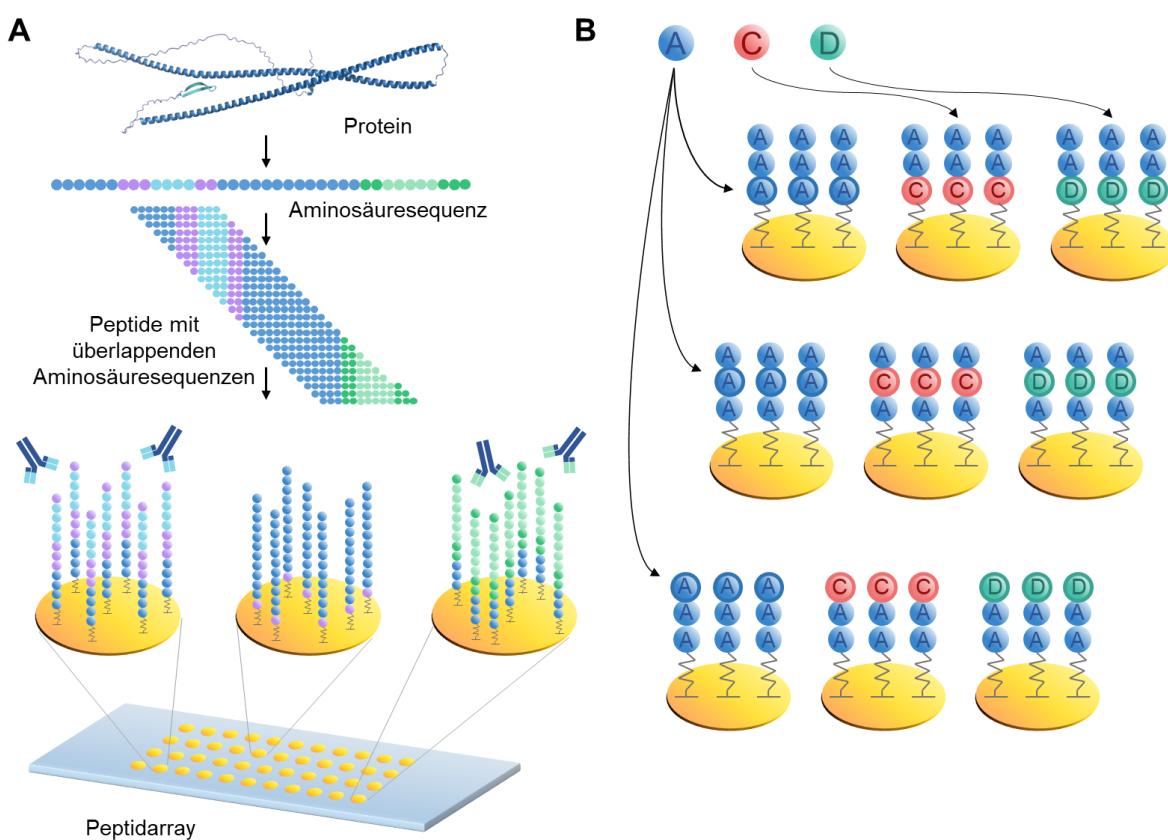


Abbildung 54: Darstellung eines Epitopmappings zur Identifizierung von Antikörperbindungsstellen. **A)** Epitopmapping eines Proteins in überlappenden Peptiden. **B)** Substitutionsanalyse eines Peptides durch Austausch der originalen Aminosäuren eines Peptides nacheinander durch alle proteinogenen Aminosäuren

Zusammenfassung und Ausblick

Hierbei konnte eine Vielzahl an Epitopen detektiert werden, welche teilweise von mehreren Patientenserien gebunden wurden und partiell Citrullin in den Bindungsmotiven aufwiesen. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Patienten dieselben Antikörper ausgebildet haben. Unter der Annahme, dass diese Antikörper spezifisch für rheumatoide Arthritis sind, könnten diese Autoantikörper eine gemeinsame Ursache in ihrer Entstehung besitzen. Unter anderem könnte eine posttranskriptionale Modifikation, in diesem Fall Citrullin, die Ursache sein, dass das Immunsystem Antikörper gegen das körpereigene Gewebe bildet und so die Ausbildung einer Autoimmunerkrankung begünstigt oder gar komplett hervorruft. Des Weiteren konnte auch Phosphorylierungen in Peptidarrays des Hepatitis B Virus integriert, sowie ein mögliches Bindungsmotiv eines Antikörpers detektiert werden. Allerdings können auch hier keine eindeutigen Aussagen über die ursprüngliche Annahme, eine Phosphorylierung als Signal für den Einbau viraler DNA in die Virushüllen, getätigt werden. Durch die Ausweitung solcher Bindungsstudien auf einen größeren Pool an Patienten, sowie die spezifische Analyse der Antikörperstruktur könnten in Zukunft detaillierte Antworten auf diese Annahmen gefunden werden. Obwohl in dieser Arbeit keine eindeutige Antwort auf die aufgestellten Hypothesen gefunden werden konnte, wurde trotzdem gezeigt, dass hochdichte Peptidarrays eine vielversprechende Möglichkeit für die Ursachenforschung von Krankheiten darbieten.

Durch die Nutzung des nano3D-Druckers können verschiedene Bausteine, wie PTMs, die bisher schwer zu integrieren waren oder einen hohen Kostenaufwand durch die große Materialmenge besaßen, auf kleinstem Raum im Piko- bis Femtomol-Maßstab kostengünstig in Peptidarrays integriert werden. Dadurch können vielerlei Studien zu PTMs, beispielsweise als Nutzung von Biomarkern oder zur Verbesserung der Diagnostik verwendet werden. Ebenfalls können sie gegebenenfalls zur besseren Erkennung von Krankheiten im Frühstadium beitragen oder die Verläufe von Erkrankungen gezielter vorhersagen. Dadurch können ebenfalls Therapien spezifisch auf den prognostizierten Verlauf eingestellt werden oder gar ein Ausbruch der Krankheit verhindert werden. Des Weiteren können neue Wirkstoffe, Therapeutika und Impfstoffe entwickelt werden, um Krankheiten gezielter zu behandeln und neu auftretende Erkrankungen schnell und effizient zu unterbinden.

7. Experimentalteil

7.1 Analytik und Geräte

Laseraufbau

Der Aufbau des nano3D-Laserdruckers von Dr. Laura Weber (IMT/Karlsruhe) basiert auf einem veränderten Aufbau des ursprünglichen cLIFT Systems von T. Foertsch und F. Löffler. Für den Materialübertrag wird ein Laser der Wellenlänge 405 nm (300 mW, IBEAM-SMART-405-S-HP, Toptica Photonics) verwendet. Dieser wird über einen Scanhead (intelliSCAN III 10 (250-700 nm), Scanlabs) auf die Laserstange gelenkt und über eine F Θ -Linse (S4LFT5110/322 (405-532 nm), Sill Optics) fokussiert. Die automatisierte Auflage der Donoroberflächen erfolgt über einen Roboter-Arm (SCARA Robot SR-6iA, Fanuc).

Vertikale Scanning Interferometrie (VSI)

Zur Bestimmung der transferierten Höhen wurde das vertikale Scanning Interferometer Contour GT-KOX-14-157 von der Firma Bruker (Ettlingen/Deutschland) verwendet. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Messungen bei 2,5-facher Vergrößerung. Die Auswertungen erfolgten mithilfe des Programms Vision64.

Massenspektroskopie (MALDI)

Massen der synthetisierten Moleküle wurden mittels MALDI-ToF-MS (engl.: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry*) bestimmt. Dafür wurde ein Spektrometer des Typs Axima Confidence (Modell: TO-6071R00), ausgestattet mit der Software Shimadzu Biotech Launchpad™ (Version 2.9.3.20110624) der Firma SHIMADZU BIOTECH verwendet. Zur Desorption und Ionisation der Proben wurde ein Stickstofflaser der Wellenlänge $\lambda = 337$ nm verwendet. Zur Messung wurde ca. 100-mal mit einer Frequenz von 50 Hz auf die Probe geschossen und die Ergebnisse gemittelt. Es wurde der protonierte Molekülionenpeak $[M+H]^+$, sowie, falls vorhanden, die Pseudomolekülionenpeaks mit Natrium $[M+Na]^+$ angegeben.

Experimentalteil

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden auf einem BRUKER Avance 500 NMR Instrument mit 500 MHz für ¹H NMR und 126 MHz für ¹³C NMR aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur in deuterierten Lösungsmitteln der Firma EURISOTOP, SIGMA ALDRICH oder DEUTERO aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in parts per million [ppm] angegeben. Zur internen Kalibrierung der ¹H-NMR sowie ¹³C-NMR-Spektren diente das Signal der Restprotonen des Lösungsmittels: Chloroform-d1 (¹H: δ = 7.26 ppm, ¹³C: δ = 77.2 ppm). Für die Charakterisierung zentrosymmetrischer Signale wurden die Mittelpunkte der Signale verwendet. Für Multipletts wurde der Signalbereich angegeben. Folgende Abkürzungen wurden zur Beschreibung der Signalmuster verwendet: d = Dublett, t = Triplet, m = Multiplett, dd = Dublett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplet. Absolut Werte der Kopplungskonstanten "J" sind in Hertz [Hz] in absteigender Reihenfolge angegeben. ¹³C-Signale wurden mithilfe von DEPT-Spektren (engl.: *distortionless enhancement by polarization transfer*) und phaseneditierten HSQC-Spektren (engl.: *heteronuclear single quantum coherence*) zugeordnet.

Laminiergerät

Zum Bekleben der Donoroberflächen wurde ein Laminiergerät LM 330 Laminator der Firma Vogt Papiertechnik (Böblingen-Altdorf/Deutschland) verwendet.

Rakel

Der verwendete Filmziehapplikator ZUA 2000 wurde von der Firma Proceq AG (Schwerzenbach/Schweiz) erworben. Das automatische Filmziehgerät AB3655 wurde von der Firma TQCsheen (Hilden/Deutschland) bezogen.

Schüttler

Es wurden die Schüttler DOS 205 der Firma neoLab (Heidelberg/Deutschland) und der Schüttler WS 10 der Firma Edmund Bühler GmbH (Hechingen/Deutschland) verwendet.

Analysenwaage

Es wurde die Analysenwaage AE 240 der Firma Mettler Toledo (Greifensee/Schweiz) verwendet.

Photometer

Die photometrischen Beladungsmessungen wurden mit dem Spektralphotometer Jenway 7305 der Firma Bibby Scientific Ltd (Staffordshire/UK), sowie den Küvetten „UV-Cuvette Micro“ der Brand GmbH & Co. KG (Wertheim/Deutschland) durchgeführt.

Ultraschallbad

Zur Reinigung der Objektträger wurde das Ultraschallbad S15 Elmasonic der Firma Elma Schmidbauer GmbH (Singen/Deutschland) verwendet.

Fluoreszenzscanner

Zur Fluoreszenzdetektion wurde der Scanner InnoScan 1100 AL der Firma Innopsys (Carbone/Frankreich) genutzt. Es wurde mit den Wellenlängen 635 nm, 532 nm und 488 nm angeregt. Sofern nicht anders angegeben, wurde im simultanen Scan-Modus mit einer Auflösung von 5.00 µm gescannt. Zur Auswertung der erlangten Messdaten wurde das Programm Mapix, sowie das Programm PepSlideAnalyzer der Firma PEPperPRINT GmbH (Heidelberg/Deutschland) verwendet. Die Bilder wurden abschließend in Kontrast und Helligkeit mit dem Programm ImageJ bearbeitet.

Experimentalteil

7.2 Lösungsmittel, Chemikalien und Syntheseoberflächen

Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Thermo Fisher Scientific (Schwerte/Deutschland) erworben.

Ultrapures Wasser (MilliQ-Wasser)

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

Glasträger

Die Objekträger wurden von der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshafen/Deutschland) erworben.

Funktionalisierte Glasträger

Als funktionalisierte Glasträger wurden die Fmoc-NH- β -Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberflächen von der Firma PEPperPRINT GmbH (Heidelberg/Germany) verwendet.

Polyimid-Folie

Die Kaptonfolie ® (Polyimid) des Typ 70110 (25,0 μm Trägermaterial; 60,0 μm Gesamtstärke) wurde von der Firma CMC Klebetechnik GmbH (Frankenthal/Deutschland) bezogen.

Polymermatrix

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

7.3 Antikörper, Seren und biologische Stoffe

Antikörper

Der verwendete ReadyTag anti-HA Clone 12CA5 wurde von der Firma BioXCell/Hölzel Diagnostika Handels GmbH (Köln/Deutschland) gekauft. Der monoklonale anti-Flag-M1 Antikörper wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) bezogen. Die bereits gelabelten anti-human-IgG-AF647 wurden von Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Cambridgeshire/England) erworben.

Humanseren

Die humanen Seren der Patienten mit Rheumatoider Arthritis, sowie dem Sjögrens Syndrom wurden von Prof. Dr. Reinhard Voll (Universitätsklinikum Freiburg/Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Entnahmen der Proben wurden von der Ethikkommission Freiburg (Ethikvotum 507/16 und Ethikvotum 191/11) genehmigt.

Weitere Seren mit Rheumatoider Arthritis sowie Seren mit Hepatitis B wurden von der Firma CentralBioHub (Hennigsdorf/Deutschland) bezogen.

Labeling Kits

Die verwendeten Lightning Link Rapid Labeling Kits wurden von der Firma BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching/Deutschland) erworben.

Experimentalteil

7.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Fmoc-Entschützung von funktionalisierten Oberflächen

a) Fmoc-Entschützung mit spektroskopischer Beladungsmessung

Diese Methode wurde für alle Oberflächen vor der Erstverwendung benutzt, um sicherzustellen, dass diese geeignet für die experimentelle Verwendung sind. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde eine Fmoc-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche trocken in eine Petrischale gelegt und mit 1,00 mL einer 20 % Piperidin in *N,N'*-Dimethylformamid (DMF) (v/v) Lösung für 20 min inkubiert. Danach wurde die Lösung in eine UV-Küvette pipettiert und bei 301 nm eine Absorptionsmessung durchgeführt. Als Nullwert dient die Bestimmung der Absorption der 20 % Piperidin in DMF (v/v) Lösung. Die Beladung der Oberfläche wurde mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet. Anschließend wurde die Oberfläche 3x5 min in DMF, 1x2 min in Methanol (MeOH) und 1x1 min in Dichlormethan (DCM) gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4°C unter Argon aufbewahrt.

Lambert Beer'sches Gesetz:

$$\text{Beladung (nmol/cm}^2\text{)} = \frac{EV \times 10^6}{d\varepsilon A}$$

Mit: A = Fläche der Oberfläche [cm²]: 19.76, E = gemessene Extinktion. ε = molarer Absorptionskoeffizient [Lmol⁻¹cm⁻¹]: 5129; d = Distanz [cm]: 1,00.; V = Volumen [mL]

b) Fmoc-Entschützung ohne Beladungsmessung

Eine Fmoc-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde 10 min in DMF gequollen und anschließend in einer 20 % Piperidin in DMF (v/v) Lösung für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde die Oberfläche 3x5 min in DMF, 1x2 min in MeOH und 1x1 min in DCM gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4°C unter Argon aufbewahrt.

AAV2: Acetylierung

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde 30 min in DMF gequollen. Im Anschluss wurde eine Lösung aus 10 % Essigsäureanhydrid (Ac₂O), 20 % N,N'-Diisopropylethylamin (DIPEA) und 70 % DMF (v/v/v) zugegeben und 2x1 h oder über Nacht acetyliert. Anschließend wurde 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV3: Seitenkettenentschützung

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde 30 min in DCM gequollen und anschließend mit einer Lösung aus 51,0 % Trifluoressigsäure (TFA), 44,5 % DCM, 2,50 % Triisopropylsilan (TIPS) und 2,00 % dest. Wasser (v/v/v/v) 3x30 min geschüttelt. Es wurde 1x5 min mit DCM, 1x5 min mit DMF und 1x30 min mit 5,00 % DIPEA in DMF gewaschen. Anschließend wurde 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV4: Fluorophor-Inkubation

a) Inkubation mit TAMRA-NHS

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde für 10 min in PBS-T gequollen. Im Anschluss wurde eine 1:10.000 Lösung aus TAMRA-NHS (1,00 mg/mL; Lösungsmittel: DMF) in PBS-T (0,05 % Tween20) zugegeben und für 2 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Anschließend wurde 1x5 min mit dest. Wasser, 1x5 min mit DMF, 2x5 min mit EE, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

b) Inkubation mit DBCO-AlexaFluor488

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde für 10 min in PBS-T gequollen. Im Anschluss wurde eine 1:10.000-Verdünnung aus DBCO-AF488 (1,00 mg/mL in DMF) in PBS-T (0,05 % Tween20) zugegeben und für 2 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Anschließend wurde 1x5 min mit dest. Wasser, 1x5 min

Experimentalteil

mit DMF, 2x5 min mit Essigsäureethylester (EE), 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

c) Inkubation mit 5-FAM-Alkin bzw. -Azid

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde für 10 min in iPrOH gequollen. Als Reaktionslösung wurden 2,00 Äq. (3,36 mmol) Kupfer(II)sulfat Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) und 3,00 Äq. (5,04 mmol) Natriumascorbat in einem 1:1 Gemisch aus dest. Wasser und DMSO gelöst und nach 5 min abfiltriert. Im Anschluss wurde eine 1:1.000 Lösung aus 5-FAM-Alkin bzw. -Azid (20,0 mg/mL; Lösungsmittel: DMF) und der Reaktionslösung hergestellt und über Nacht unter Lichtausschluss geschüttelt. Anschließend wurde 1x5 min mit dest. Wasser, gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV5: Bildung einer Amidbindung

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Petrischale in einem Exsikkator unter Schutzgas mit einer 100 mM Lösung aus 1,00 Äq. Aminohexansäure, 1,00 Äq. DIC und 1,00 Äq. OxymaPure in 1,00 mL DMF für mindestens 16 h inkubiert. Bei der Kupplung eines HA-Peptids wurden 5,00 mg Peptid in einer 100 mM Lösung aus 1,00 Äq. HOBr, 1,00 Äq. HBTU und 0,10 Äq. DIPEA in 1,00 mL DMF über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgespült und 3x5 min mit DMF, 1x2 min mit MeOH und 1x1 min mit DCM gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV6: Antikörperlabeling

Ein monoklonaler Maus Anti-HA IgG Antikörper (c=2,50 mg/mL) bzw. monoklonaler Maus (M2) Anti-Flag IgG Antikörper (c=4,00 mg/mL) wurde mittels Cy3 bzw. Cy5 Lightning Link Rapid Labeling Kit gelabelt. Der Antikörper wurde hierzu auf ein Zielvolumen von 100 μL und einer Konzentration von 1,00 mg/mL mit MilliQ verdünnt. Es wurde 10,0 μL des Modifiers zugegeben, die Antikörperlösung auf den Cyaninfarbstoff gegeben und für 15 min inkubiert. Danach wurde 10,0 μL des Quenchers hinzugefügt und die gelabelten Antikörper in Aliquots aufgeteilt.

AAV7: Antikörper-Inkubation

a) Anti-HA und Anti-FLAG Inkubation

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Synthesekammer 10 min in eine Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20 (PBS-T; 0,05 % Tween20) gequollen. Anschließend wurde mit Rockland Blocking Buffer (RB) 30 min bei 140 rpm geschüttelt und 1x1 min mit 10 % RB in PBS-T (v/v) gewaschen. Danach wurde die Färbelösung, bestehend aus einer 1:1000 Verdünnung eines oder zweier Antikörper (Monoklonaler Maus Anti-HA-Cy3 (c=1,00 mg/mL) IgG Antikörper und Monoklonaler Maus (M2) Anti-Flag-Cy5 (c=1,00 mg/mL) IgG Antikörper) in 10 % RB in PBS-T (v/v), zugegeben und für 1 h unter Lichtausschuss bei 140 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde 5x1 min mit PBS-T gewaschen, mit dest. Wasser gespült, mit Argon getrocknet und bis zum Scan bei 4 °C unter Argon gelagert.

b) Serum-Inkubation

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Inkubationskammer 10 min in PBS-T gequollen. Anschließend wurde mit Rockland Blocking Buffer (RB) 30 min bei 140 rpm geschüttelt und 1x1 min mit 10 % RB in PBS-T (v/v) gewaschen. Es wurde eine Vorfärbung durch eine Sekundärantikörper-Inkubation durchgeführt, um Hintergrundsignale auszuschließen. Nachdem die Oberfläche wieder in der Inkubationskammer befestigt wurde, wurde die Oberfläche 10 min in 10 %RB in PBS-T (v/v) gequollen und im Anschluss bei 4 °C über Nacht unter Lichtausschuss mit der Färbelösung inkubiert. Diese setzt sich aus einer Verdünnung des gewünschten Serums mit 10 %RB in PBS-T (v/v) zusammen. Falls nicht anders angegeben, wurde in der gesamten Arbeit die Verdünnung des Serums von 1:100 verwendet. Abschließend wurde 5x1 1min mit 10 %RB in PBS-T gewaschen und eine Inkubation mit Fluorophor-gelabelten Sekundärantikörpern durchgeführt.

c) Sekundärantikörper-Inkubation

Eine bereits gequollene, geblockte, ggf. mit Serum inkubierte und gewaschene R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde 1 h bei 140 rpm unter Lichtausschuss mit der Färbelösung geschüttelt. Die Färbelösung setzt sich aus einer 1:3.000 Verdünnung eines anti-human IgG AF647 Antikörper (c=0,75 mg/mL) und 10 % RB in PBS-T (v/v) zusammen. Zusätzlich wurde nach Bedarf zur Inkubation der Kontrollpeptide ein anti-HA-Cy3 IgG Antikörper (c=1,00 mg/mL) zur Färbelösung

Experimentalteil

hinzugefügt. Abschließend wurde 5x1 min mit PBS-T gewaschen, mit dest. Wasser gespült, die Oberfläche mit Argon getrocknet und bis zum Scan bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV8: Herstellung der Donoroberflächen

a) Generelle Vorbereitung der Donoroberflächen

Zunächst wurden Glasobjektträger im Ultraschallbad jeweils 5 min mit Seifenwasser, dest. Wasser, Isopropanol (iPrOH) und Aceton gereinigt. Die gereinigten Objektträger wurden mit Argon getrocknet und im Anschluss mit einer selbstklebenden und lichtabsorbierenden Polyimidfolie (Kaptonfolie) mit Hilfe eines Laminiergerätes beklebt.

b) Blade-Coating (Rakeln)

Für die Beschichtung mittels Rakel wurde eine gereinigte und beklebte Oberfläche auf dem Ziehtisch des Rakel-Geräts befestigt. Anschließend wurden 70,0 µL der Beschichtungslösung in den Rakelsspalt (Höhe: 1.500 µm) pipettiert und die Oberfläche mit einer Ziehgeschwindigkeit von 10 mm/s beschichtet.

AAV9: Herstellung der Beschichtungslösung

a) Aminosäuren und Aktivierungsreagenzien

Zur Herstellung der Beschichtungslösung mit Aminosäuren (AS) wurden 30,0 µmol der gewünschten Aminosäure eingewogen und mit SLEC-Polymermatrix auf 150 mg Gesamteinwaage aufgefüllt. Als Lösungsmittel für Aminosäuren mit OPfp-Aktivester wurde 1,00 mL DCM verwendet. Alle Aminosäuren ohne Aktivester wurden getrennt von der Polymermatrix eingewogen und in 50,0 µL wasserfreiem DMF gelöst. Die getrennt eingewogene Polymermatrix wurde in 950 µL wasserfreiem DCM gelöst und anschließend mit der Aminosäuren-Lösung vermischt. Die Einwaage der Aktivierungsreagenzien erfolgte analog. Die genaue Zusammensetzung der Einwaagen der Aminosäuren und deren Aktivierungsreagenzien ist aus Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21 im Anhang (Seite 177) zu entnehmen.

b) Andere Chemikalien

Für die Einwaage den Transfer anderer Chemikalien wurden 15,0 mg mit 135 mg SLEC-Polymermatrix in 1,00 mL wasserfreiem DCM gelöst. Je nach Löslichkeit und Polarität der Chemikalie wurde das Lösungsmittel durch MeOH oder Aceton ersetzt.

AAV10: Lasertransfer via nano3D-Drucker

Eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde mit der funktionalisierten Seite nach oben zeigend auf die Laserstage gelegt. Danach wurde die erste Donor Oberfläche mit Hilfe des Roboterarms mit der beschichteten Seite nach unten auf den Akzeptor platziert und das gewünschte Lasermuster mit Hilfe eines Computerprogramms transferiert. Dieser Vorgang wurde entsprechend oft mit verschiedenen Donoren wiederholt.

AAV11: Reaktionskupplung

Zur Kupplung der transferierten Moleküle wurde die Akzeptor Oberfläche 10 min im Ofen bei 98 °C unter Argon inkubiert. Die Oberfläche wurde 4x1 min mit Aceton im Ultraschallbad gewaschen, mit Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV12: Nachweisreaktion mit Xanthydrol

Auf eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde nach AAV10 und AAV11 die gewünschten Aminosäuren transferiert und an die Syntheseoberfläche gekuppelt. Anschließend wurden die Seitenkettenenschutzgruppen nach AAV3 entfernt und die Syntheseoberfläche mit einer 1:1 Lösung aus 1 M Salzsäure (HCl) und 200 mM Xanthydrol in iPrOH für 15 min inkubiert. Abschließend wurde die Reaktionslösung abgespült und 3x5 min mit iPrOH gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

Experimentalteil

AAV13: Phosphorylierung von Hydroxylgruppen

a) *Phosphinylierung*

Die Seitenkettenschutzgruppen einer R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde nach AAV3 entfernt. Anschließend wurde eine Reaktionslösung aus 2,25 mM (1,00 Äq.) des gewünschten Phosphoramidits (Di-*tert*-Butyl *N,N*-diisopropylphosphoramidit, Dibenzyl *N,N*-diisopropylphosphoramidit, Bis[2-(trimethylsilyl)ethyl] *N,N*-diisopropylphosphoramidit) mit 4,50 mM 1H-Tetrazol (0,45 M in Acetonitril, 2,00 Äq.) in wasserfreiem DMF hergestellt. Die Reaktionslösung wurde auf die Oberfläche gegeben und für 90 min bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurde im Wechsel je 5x2 min mit DMF und iPrOH gewaschen. Danach wurde 1x5 min mit Aceton gewaschen, die Oberfläche mit Argon getrocknet mit einer nachfolgenden Oxidation weiter umgesetzt.

b) *Oxidation*

Zur Oxidation einer phosphinylierten R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde eine 3,00 M *tert*-Butylhydroperoxid (*t*BuOOH, 5,50 M in Dekan) Reaktionslösung in Cyclohexan für 30 min bei RT unter schütteln auf der Oberfläche inkubiert. Anschließend wurde 5x2 min mit Cyclohexan und 1x5 min mit Aceton gewaschen. Die Oberfläche wurde 4x1 min mit Aceton im Ultraschallbad gewaschen, mit Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

AAV14: Durchführung der GBB Reaktion

Auf eine R-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde nach AAV10 und AAV11 die Aminosäure Fmoc-Aea-OH an die Syntheseoberfläche gekuppelt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV3 entfernt und ein Transfer der GBB Reagenzien 2-Aminopyrazin, 1-Adamantylisocyanid und Trichloressigsäure (TCA) nach AAV10 durchgeführt. Die Einwaagen und Transferparameter der Reagenzien sind in Tabelle 21 und Tabelle 24 (Anhang, S.178+180) aufgeführt. Die Syntheseoberfläche wurde über Nacht bei 100 °C im Ofen inkubiert und anschließend 1x15 min mit einer 25 %-igen Ammoniaklösung gewaschen. Die Oberfläche wurde mit Argon getrocknet und bei 4 °C unter Argon gelagert.

7.5 Versuchsbeschreibungen

7.5.1 Laser-basierte Synthesen

Eine Fmoc-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde nach AAV1 entschützt und die benötigten Donoren über AAV8 und AAV9 mittels Rakel hergestellt.

a) Aktivestermethode

Die benötigten Aminosäuren (Fmoc-AS-OPfp) wurden nach AAV10 per Laserimpuls übertragen und anschließend nach AAV11 im Ofen für 10 min bei 98°C unter Argon an die Oberfläche gekuppelt.

b) Anknüpfung durch den Transfer von Kupplungsreagenzien

Die benötigten Aminosäuren (Fmoc-AS-OH) wurden nach AAV10 auf die Syntheseoberfläche übertragen. Anschließend wurde als zweiter Schritt DIC und als dritter Schritt OxymaPure übertragen. Danach wurden die Aminosäure nach AAV11 im Ofen für 10 min bei 98°C unter Argon an die Oberfläche gekuppelt.

Nach der Kupplung wurden die Oberflächen für 4x1 min mit Aceton im Ultraschallbad gewaschen. Die Acetylierung freier Reaktionsstellen nach AAV2 erfolgte nach der ersten transferierten Lage über Nacht. Je nach gewünschter Weiterverwendung wurde die Oberfläche unterschiedlich weiter behandelt.

a) Fluoreszenzmarkierung

Zur abschließenden Fluoreszenzmarkierung wurde die Oberfläche nach AAV1 entschützt und eine Fluorophor-Inkubation nach AAV4 mit 20,0 mL TAMRA-NHS in PBS-T (Verdünnung 1:10.000) durchgeführt.

b) Reaktionen an den Seitenketten der Aminosäuren

Zur spezifischen Reaktionen an den Seitenketten der transferierten Aminosäuren wurde eine Seitenkettenentschützung nach AAV3 durchgeführt. Abschließend wurde je nach gewünschter Reaktion eine Fluorophor-Inkubation nach AAV12 oder die Reaktion zur Chemodetektion vorgenommen.

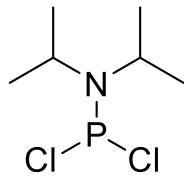
Experimentalteil

c) Peptidsynthese

Für die weitere Nutzung zur Peptidsynthese wurde die Oberfläche erneut nach AAV1 entschützt und die Prozesse des Lasertransfers (AAV10), der Kupplung (AAV11), der Acetylierung (AAV2) und der Fmoc-Entschützung (AAV1) so lange weiter durchgeführt, bis die gewünschte Peptidlänge erreicht wurde. Abschließend wurde ebenfalls eine Seitenkettenentschützung nach AAV3 durchgeführt. Je nach gewünschter Anwendung wurde die Oberfläche nach AAV7 mit Seren, Sekundärantikörpern oder gelabelter monoklonaler Antikörper gefärbt.

7.5.2 Synthese und Charakterisierung verwendeter Phosphorylierungsreagenzien

a) *N,N*-Diisopropylaminodichlorophosphin

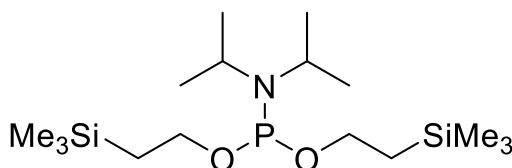


Zu einer Lösung von 69,8 mL Phosphortrichlorid (109 g; 0,80 mol) in 500 mL Hexan wurden 225 mL Diisopropylamin (161 g; 1,60 mol) bei 0° C für 1 h zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren für 2 h auf 40° C erhitzt. Nach Beenden der Reaktion wurden die nicht organischen Salze abfiltriert und drei Mal mit 100 mL Hexan gewaschen. Das Lösungsmittel der vereinten organischen Phasen wurde unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt bei 15 mbar und 105° C destilliert. Es wurde reines *N,N*-Diisopropylaminodichlorophosphin in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten (107 g; 78 %). Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.^[217]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.30 (d, 12H, 4CH₃), 4.0 (m, 2H, 2CH)

³¹P-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 169.4

b) Bis(2-(trimethylsilyl)ethyl) diisopropylphosphoramidit



Zu einer Lösung von 12,6 g 2-(Trimethylsilyl)ethanol (107 mmol) und 15,4 g Triethylamin (152 mmol) in 84,0 mL Diethylether wurden 30 min bei 0° C unter Argon eine Lösung aus 10,8 g *N,N*-Diisopropylaminodichlorophosphin (50,8 mmol) in 53,0 mL Diethylether unter Rühren zugetropft. Nach der leicht exothermen Reaktion und der Ausbildung einer dickflüssigen, weißen Suspension wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei 20° C gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und der Filterrückstand zwei Mal mit 30 mL Diethylether gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden zweimal mit 100 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung, sowie mit 40,0 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Abschließend wurde das Rohprodukt über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderter Druck (25 mbar, 165° C) entfernt. Es wurden 13,7 g Bis(2-(trimethylsilyl)ethyl) diisopropylphosphoramidit (74 %) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.^[218]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.90-3.78 (m, 4H), 3.77-3.68 (m, 2H), 1.31 (d, J = 6.6 Hz, 12H), 1.17-1.12 (m, 4H), 0.15 (s, 18H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 60.7 (2, d, J_{C-P} = 19.1 Hz, 2C), 42.7 (1, d, J_{C-P} = 12.7 Hz, 2C), 24.6 (3, d, J_{C-P} = 7.6 Hz, 4C), 20.1 (2, d, J_{C-P} = 7.6 Hz, 2C), -1.4 (3, 6C).

³¹P-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 143.5

Danksagung

8. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Breitling danken, für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und für die interessante Themenstellung, sowie die Begleitung und Hilfestellungen mit einer großen wissenschaftlichen Expertise.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis von Prof. Breitling am IMT für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen und den Zusammenhalt. Besonders möchte ich mich vor allem bei Dr. Laura Weber bedanken für die Unterstützung in jeder Lebenslage, zahlreichen Ratschläge und Ideen, sowie Hilfestellungen bei den Experimenten und Durchführung diverser gemeinsamer Projekte. Ebenfalls möchte ich mich auch bei Dr. Mareen Stahlberger und Dr. Daniela Mattes für die vielen hilfreichen Ratschläge und die Expertise in diversen Forschungsfragen, sowie auch die allgemeine Unterstützung bei der Dissertation bedanken.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Voll der Uniklinik in Freiburg danken für die gute Kooperation, wertvollen Ideen zu den Rheumaprojekten, sowie die Bereitstellung diverser Patientenserien.

Des Weiteren möchte ich ebenfalls meinen Dank an das gesamte Team von *PEPPERPRINT* GmbH aussprechen für Synthese der Peptidarrays, sowie die gute Zusammenarbeit und Kooperation. Besonders möchte ich hier Dr. Ralf Bischoff, Dr. Thomas Felgenhauer und Dr. Andreas Klinkusch für die guten Ratschläge und Planung, sowie Synthese diverser Projekte bedanken.

Außerdem möchte ich mich für die Arbeit von meinen ganzen Studenten bedanken, ohne die die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meinen Dank hierfür an Hannah Altenbach, Helen Abeln, Lena Bechler, Hagen Rießland, Leonie Lazaro Garcia und Niklas Krüger.

Danke ebenfalls an Hannah Altenbach, Dr. Daniela Mattes, Dr. Mareen Stahlberger, Dr. Andreas Klinkusch und Dr. Laura Weber für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Größten Dank möchte ich an meine Eltern und Freunde, besonders Hannah, Celine, Svenja, Chantal, Aileen und Lorenz, und vor allem an meinen Freund John aussprechen. Nur durch eure Unterstützung und Motivation ist es mir überhaupt erst gelungen diese Dissertation zu bewältigen.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACPA	Anti-citrullinierte Protein-Antikörper
Aea	Allysinethylenacetal
AF	AlexaFluor
Ahx	Aminohexansäure
Ala (A)	Alanin
Äq.	Äquivalent(e)
Arg (R)	Arginin
AS	Aminosäure
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure
a.u.	willkürliche Einheit (engl.: <i>arbitrary unit</i>)
Bregs	Regulatorische B-Zellen
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CCP	cyclische citrullinierte Peptide
Cit (Z)	Citrullin
cLIFT	Kombinatorischer Laserinduzierter Materialtransfer (engl.: <i>combinational Laser-induced forward transfer</i>)
cm	Centimeter
CuAAC	Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Click-Reaktion
Cys (C)	Cystein
DBCO	Dibenzocyclooctin
DCM	Dichlormethan
dest.	Destilliert
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EE	Essigsäureethylester
et al.	et alia (und andere)
FAM	Fluorescein
Flag	Sequenz: NH ₂ -DYKDDDDK-COOH
Fmoc	9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
g	Gramm
GBB	Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaktion

Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
h	Stunde
HA	Hämaggglutinin (Sequenz: NH ₂ -YPYDVPDYA-COOH)
hC	Gesundes Kontrollserum (engl. <i>healthy control</i>)
HCit (X)	Homocitrullin
His (H)	Histidin
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hyp (p)	Hydroxyprolin
Ile (I)	Isoleucin
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
iPrOH	Isopropanol
Leu (L)	Leucin
LM	Lösungsmittel
Lys (K)	Lysin
Lys(Ac) (k)	Acetyllysin
Lys(N ₃)	Azidolysin
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
M	Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MeOH	Methanol
Met (M)	Methionin
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
MMA	Methylmethacrylat
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
MSI	Ortsaufgelöste Massenspektrometrie
NHS	N-Succinimidyl-ester
nm	Nanometer
NMR	Magnetkernresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
OPfp	Pentafluorophenylester
Oxyma Pure	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester

Abkürzungsverzeichnis

Pra	Propargylglycin
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween20
Phe (F)	Phenylalanin
PEGMA	Polyethylenglykolmethacrylat
ppm	<i>parts per million</i>
Pra	Propargylglycin
Pro (P)	Prolin
R	Rest
RA	Rheumatoide Arthritis
RB	Rockland Blocking Buffer
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotations per minute
rps	Revolutions per second
s	Sekunde
Ser (S)	Serin
SG	Schutzgruppe
SjS	Sjögrens Syndrom
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
sog.	sogenannt
SPAAC	Spannungsgesteuerte Alkin-Azid Cycloaddition (engl.: <i>Strain promoted Alkyne Azide Cycloaddition</i>)
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
Tab.	Tabelle
TAMRA	5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin
tBu	<i>tert</i> -Butyl-
TCA	Trichloressigsäure (engl: <i>trichloroacetic acid</i>)
Thr (T)	Threonin
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
Tmb	Trimethoxybenzylglycin
TOF	Flugzeitanalyse (engl. <i>time of flight</i>)
Trp (W)	Tryptophan
Trt	Trityl-
Tyr (Y)	Tyrosin
Tween 20 (T)	Polyoxyethylensorbitan monolaurat
V	Volumen
Val (V)	Valin
VSI	Vertikale Scanning Interferometrie
z.B.	Zum Beispiel

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der proteinogenen Aminosäuren und Kategorisierung in ihre chemischen Eigenschaften.....	4
Abbildung 2: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten posttranslational modifizierten Aminosäuren	7
Abbildung 3: Darstellung eines Epitopmappings zur Identifizierung von Antikörperbindungsstellen. A) Epitopmapping eines Proteins in überlappenden Peptiden. B) Substitutionsanalyse eines Peptids durch Austausch der originalen Aminosäuren eines Peptids nacheinander durch alle proteinogenen Aminosäuren .	11
Abbildung 4: Schematischer Aufbau des nano3D-Druckers. Ein LED-Laser wird über einen Scanhead auf den Probentisch gelenkt.	12
Abbildung 5: Darstellung des Druckverfahrens über cLIFT. a) Transfer einer Aminosäure von einem Donor auf den Akzeptor. b) Austausch der Donoren und erneuter Transfer. c) Kombinatorisches Muster der transferierten Materialien	13
Abbildung 6: Strukturformeln verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die in dieser Arbeit genutzt wurden.....	16
Abbildung 7: 3D Struktur der Immunglobulinklasse IgG (PDB Eintrag: 1IGT) visualisiert mit Pymol.	22
Abbildung 8: Darstellung eines Transfers über Detektion mit VSI am Beispiel von Alanin aus der vorangegangenen Masterarbeit ^[169] . Transferparameter: 140 mW und 10,0 ms. Transferhöhe: 41,2 nm (Bereich: 45,8–37,6 nm). 2D Profil in X und Y Richtung (links), sowie 3D Darstellung (rechts)	30
Abbildung 9: Darstellung des verwendeten Lasermusters zur Optimierung der Aminosäuren und den angewandten Click Reaktionen. Transferparameter: Laserleistung: 200-100 mW ($\Delta=10,0$ mW). Laserzeit: 16,0-8,00 ms ($\Delta=1,00$ ms). Pitch: 250 μ m.....	31
Abbildung 10: Ausschnitt des Fluoreszenzscan der Optimierung von Citrullin, Homocitrullin und Acetyllysin (von links nach rechts) aus der vorangegangenen Masterarbeit ^[169] . Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 1,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.....	32
Abbildung 11: Fluoreszenzscan der Xanthidrol Reaktion an Citrullin (A) und Homocitrullin (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 6,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.....	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12: Fluoreszenzscan der Xanthydrol Reaktion an Serin (A) und Cystein (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 6,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.....	34
Abbildung 13: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an Hydroxyprolin. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 0,60. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.	36
Abbildung 14: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an der Seitenkette von Hydroxyprolin. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 7,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.....	37
Abbildung 15: Strukturformeln von Di-tert-Butyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (tBu-PhAm) (63), Dibenzyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (Bz-PhAm) (64), Bis[2-(trimethylsilyl)ethyl]-N,N- diisopropylphosphoramidit (TMS-PhAm) (65).....	43
Abbildung 16: Fluoreszenzscan der Anti-pTyr-AF647 Inkubation an phosphoryliertem Tyrosin. Phosphorylierung mit A) tBu-PhAm. B) Bz-PhAm. C) TMS-PhAm. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 5,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm	44
Abbildung 17: Alle in dieser Arbeit verwendeten weiteren modifizierten Aminosäuren	46
Abbildung 18: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an modifizierten Aminosäuren. Oben (von rechts nach links): Abg, Asp-ae, D-Cys, Pra, Gly. Unten (von links nach rechts): Aea, D-Asp, D-Pro, Tmb, Gly. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 1,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.....	47
Abbildung 19: Fluoreszenzscan der TAMRA-NHS Reaktion an Azidolysin mit orangen Kapton (A) und schwarzem Kapton (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 5,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.	49
Abbildung 20: Fluoreszenzscan der laserunterstützen CuAAC Reaktion an Propargylglycin (A) und Azidolysin (B). Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 520 nm \pm 2,50 nm. PMT: 7,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.	52
Abbildung 21: Fluoreszenzscan der laserunterstützen SpAAC Reaktion Azidolysin und Dibenzocyclooctin. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 520 nm \pm 2,50 nm. PMT: 7,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.....	53

- Abbildung 22:** Fluoreszenzscan der laserunterstützen Peptidsynthese, sowie SpAAC Reaktion an Azidolysin. **A)** Visualisierung der SpAAC Reaktion durch DBCO-AF488. **B)** Visualisierung des Peptids durch TAMRA-NHS. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm (**A**) und 532 nm (**B**). Emissionsfilter: 520 nm \pm 2,50 nm (**A**) und 582 nm \pm 37,5 nm (**B**). PMT: 6,00 (**A**) und 1,00 (**B**). Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.. 54
- Abbildung 23:** Fluoreszenzscan der laserunterstützen GBB Reaktion an Allysinethylenacetal. Darstellung als größere Reaktionsfläche (**A**) und Strukturformel des Produkts (**B**) Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm. PMT: 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm..... 57
- Abbildung 24:** Fluoreszenzscan der Synthese von Peptiden aus der Literatur nach Rheumaseren und Kontrollserum (hC1) Inkubation (RA1-13) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm..... 63
- Abbildung 25:** Heatmap der synthetisierten Peptide aus der Literatur sowie Inkubation mit Rheumaseren. Die Fluoreszenzintensitäten wurden normiert auf das Intensitätmaximum des jeweiligen Serums. 65
- Abbildung 26:** A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids EGAEZGLSAIR nach Inkubation mit Serum RA1 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids EGAEZGLSAIR (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz. 68
- Abbildung 27:** A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids KIHAREIFDSRGNPT nach Inkubation mit Serum RA11 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids KIHAREIFDSRGNPT (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz. .. 70
- Abbildung 28:** A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids LEGTTZLTRK nach Inkubation mit Serum RA2 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter:

Abbildungsverzeichnis

- 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids LEGTTZLTRK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz. 71
Abbildung 29: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids LEGTTZLTRK nach Inkubation mit Serum RA6 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids LEGTTZLTRK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz. 72
Abbildung 30: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids MAZHLREYQDLLNVK nach Inkubation mit Serum RA10 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids MAZHLREYQDLLNVK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz..... 74
Abbildung 31: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids YLQYTDETFZTTIEK nach Inkubation mit Serum RA1 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids YLQYTDETFZTTIEK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz... 75
Abbildung 32: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids YLQYTDETFZTTIEK nach Inkubation mit Serum RA6 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids YLQYTDETFZTTIEK (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.. 76

- Abbildung 33:** Fluoreszenzscans des linearen (A) und zyklischen (B) Epitopmappings von Kollagen Typ2 nach Inkubation mit den Seren RA7-13, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm..... 82
- Abbildung 34:** Fluoreszenzscans des linearen (A) und zyklischen (B) Epitopmappings von Kollagen Typ2 nach Inkubation mit den Seren SjS1-6, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm..... 85
- Abbildung 35:** Heatmap der linearen (A) und zyklischen (B) citrullinierten Kollagen Typ 2 Peptide (Länge: 1473 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA7-13) und Sjögrens Syndrom Seren (SjS1-6). Die Fluoreszenzintensitäten wurden normierten auf das Intensitätsmaximum des jeweiligen Serums. Die blauen Rahmen entsprechen den Bereichen, die zur weiteren Substitutionsanalyse ausgewählt wurden..... 88
- Abbildung 36:** Heatmap Anzahl der Signale an 12 aufeinanderfolgende Peptide der linearen (A) und zyklischen (B) citrullinierten Kollagen Typ 2 Peptide (Länge: 1473 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA7-13) und Sjögrens Syndrom Seren (SjS1-6). Die blauen Rahmen entsprechen den Bereichen, die zur weiteren Substitutionsanalyse ausgewählt wurden. 90
- Abbildung 37:** A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids ZGIVGLPGQZGEZGF nach Inkubation mit Serum RA9 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids ZGIVGLPGQZGEZGF (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz. 93
- Abbildung 38:** A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids KLCHPEWKSGDYWID nach Inkubation mit Serum RA9 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids KLCHPEWKSGDYWID (x-Achse).

Abbildungsverzeichnis

Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	94
Abbildung 39: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids KLCHPEWKSGDYWID nach Inkubation mit Serum SjS5 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids KLCHPEWKSGDYWID (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	95
Abbildung 40: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids ANVPKKNWWSSKSKE nach Inkubation mit Serum RA10 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids ANVPKKNWWSSKSKE (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	97
Abbildung 41: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids ANVPKKNWWSSKSKE nach Inkubation mit Serum RA13 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids ANVPKKNWWSSKSKE (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	98
Abbildung 42: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GKGKTVIEYZSQKT nach Inkubation mit Serum RA10 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GKGKTVIEYZSQKT (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten	

Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	100
Abbildung 43: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GKWGKTVIEYZSQKT nach Inkubation mit Serum RA12 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GKWGKTVIEYZSQKT (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	101
Abbildung 44: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GPEQEFGVDIGPVCF nach Inkubation mit Serum RA7 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GPEQEFGVDIGPVCF (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	103
Abbildung 45: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids GPEQEFGVDIGPVCF nach Inkubation mit Serum RA8 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Aminosäuren-Plot des Originalpeptids GPEQEFGVDIGPVCF (x-Achse). Korrelation der relativen Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) der substituierten Peptidsequenz in Bezug auf die ursprüngliche Aminosäure (Intensität 100 %) der Originalsequenz.....	104
Abbildung 46: Fluoreszenzscans des Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ2 und Vimentin nach Inkubation mit den Seren RA14-16, den gesunden Kontrollseren hC1 und hC2, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 7,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm	109
Abbildung 47: Heatmap von citrullinierten Kollagen Typ 2 Peptide (Länge: 1473 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA14-16) und	

Abbildungsverzeichnis

Kontrollseren (hC1-2). Die Fluoreszenzintensitäten wurden normiert auf das Intensitätmaximum des jeweiligen Serums. Die blauen Rahmen entsprechen den Peptiden 12-17, die in Kap. 5.2.2 bereits näher analysiert wurden.....	111
Abbildung 48: Heatmap von citrullinierten Vimentin Peptide (Länge: 914 Peptidsequenzen) sowie Inkubation mit Rheumaseren (RA14-16) und Kontrollseren (hC1-2). Die Fluoreszenzintensitäten wurden normiert auf das Intensitätmaximum des jeweiligen Serums.....	112
Abbildung 49: Fluoreszenzscan des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 3,00 und 9,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	119
Abbildung 50: Heatmap des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum. Die hellblaue Markierung entspricht der später analysierten Sequenz PRtPARVtGGVFLVD.....	120
Abbildung 51: Fluoreszenzscan der Wiederholung des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum, sowie Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Die hellblaue Umrandung zeigt die Position des später analysierten Epitops. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 9,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	121
Abbildung 52: Heatmap der Wiederholung des Epitopmappings von phosphorylierten Hepatitis B Peptiden nach Inkubation mit einem Anti-HBs Serum. Die hellblaue Markierung entspricht der später analysierten Sequenz PRtPARVtGGVFLVD.....	122
Abbildung 53: A) Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids PRtPAVtGGVFLVD nach Inkubation mit Anti-HBs Serum und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 9,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,25 cm. B) Heatmap der Substitutionsanalyse des Peptids PRtPAVtGGVFLVD. Normierte Fluoreszenzintensitäten der substituierten Peptidsequenz auf die ursprüngliche Aminosäure der Originalsequenz.....	124
Abbildung 54: Darstellung eines Epitopmappings zur Identifizierung von Antikörperbindungsstellen. A) Epitopmapping eines Proteins in überlappenden	

Peptiden. B) Substitutionsanalyse eines Peptids durch Austausch der originalen Aminosäuren eines Peptids nacheinander durch alle proteinogenen Aminosäuren	129
Abbildung 55: Fluoreszenzscan der Synthese von Peptiden aus der Literatur nach Inkubation mit gesunden Humanseren hC1 (oben) und hC2 (unten) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	186
Abbildung 56: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 1-5, 7-8 und 10-11 nach Inkubation mit Serum RA1-3 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	187
Abbildung 57: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 1 5, 7 8 und 10 11 nach Inkubation mit Serum RA4-6 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	188
Abbildung 58: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 6, 9 und 11 nach Inkubation mit Serum RA8-11+13 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	188
Abbildung 59: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 12-17 nach Inkubation mit Serum RA7-10 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm.....	190
Abbildung 60: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 12-17 nach Inkubation mit Serum RA11-13 uns SjS5 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ±	

Abbildungsverzeichnis

37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm..... 190

Abbildung 61: Fluoreszenzscan der Synthese des Epitopmappings von HBV nach Inkubation mit einem gesunden Humanserum hC3 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 6,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm 191

Abbildung 62: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids PRtPAVtGGVFLVD nach Inkubation mit Anti-HBs Serum und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 9,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,25 cm..... 192

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beladungsmessungen (Extinktion) der Fmoc-Entschützungen der Synthesoberflächen, sowie nach der Kupplung aus Lösung von Phosphoserin und ggf. eines Ahx-Spacers	40
Tabelle 2: Bindung der Seren RA1-13 an ausgewählte Peptidsequenzen 1-11. Die Bindung eines Serums wurde in hellblau dargestellt.	66
Tabelle 3: Ausgewählte Peptidsequenzen mit Zuordnung zum Ursprungsprotein sowie der Position des substituierten Arginins durch Citrullin.....	66
Tabelle 4: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz EGAEZGLSAIR für Serum RA1. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	69
Tabelle 5: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz KIHAREIFDSRGNPT für Serum RA11. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	71
Tabelle 6: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz LEGTTZLTK für Serum RA2 und RA6. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	73
Tabelle 7: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz MAZHLREYQDLLNVK für Serum RA10. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	74
Tabelle 8: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz YLQYTDETFZTTIEK für Serum RA1 und RA6. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	77
Tabelle 9: Zusammenfassung der detektierten möglichen Bindungsmotive. Die originalen Aminosäuren sind hervorgehoben.	78
Tabelle 10: Bindung der Seren RA7-13 und SjS1-6 an ausgewählte lineare Peptide des citrullinierten Kollagen Typ 2 Arrays zur Substitutionsanalyse mit ihrer jeweiligen Position im gemappten Protein.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 11: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz ZGIVGLPGQZGEZGF für Serum RA9. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung)	94
Tabelle 12: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz KLCHPEWKSGDYWID für Serum RA9 und SjS5. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	96
Tabelle 13: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz ANVPKKNWWSSKSKE für Serum RA10 und RA13. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	99
Tabelle 14: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz GKGKTVIEYZSQKT für Serum RA10 und RA12. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	102
Tabelle 15: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz GPEQEFGVDIGPVCF für Serum RA7 und RA8. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	104
Tabelle 16: Zusammenfassung der detektierten möglichen Bindungsmotive von citrulliniertem Kollagen Typ 2. Die originalen Aminosäuren sind hervorgehoben. ..	105
Tabelle 17: Zusammenfassung der möglichen Epitope von citrulliniertem Kollagen Typ 2 (COL) und Vimentin (VIM), sowie die Bindungseigenschaften der Seren RA14-RA16. ((x) = Fluoreszenzintensität liegt unter 10 % der max. Intensität)	113
Tabelle 18: Darstellung des Bindungsmotivs der Sequenz PRtPAVtGGVFLVD für das Anti-HBs Serum. Essenzielle Aminosäuren sind hellblau dargestellt. (x = alle Substitutionsvarianten führen zu einer Antikörperbindung; ! = Aminosäuren, die eine Antikörperbindung verhindern)	125
Tabelle 19: Berechnete Einwaage zur Donorbeschichtung für 30,0 µmol der geschützten, proteinogenen Aminosäuren und der zugehörigen Matrix in 1,00 mL DCM. Zuerst wurde DMF (falls es verwendet wurde) und dann die Matrix in DCM zur Aminosäure hinzugegeben.	177
Tabelle 20: Berechnete Einwaage zur Donorbeschichtung für 30,0 µmol der geschützten, nicht proteinogenen Aminosäuren und der zugehörigen Matrix in 1,00 mL	

Gesamtvolumen (LM: DCM). Zuerst wurde DMF (falls es verwendet wurde) und dann die Matrix in DCM zur Aminosäure hinzugegeben.....	178
Tabelle 21: Berechnete Einwaage zur Donorbeschichtung der benötigten Reagenzien und der zugehörigen Matrix für 1,00 mL DCM.....	178
Tabelle 22: Optimierte Transferparameter für die verwendeten Aminosäuren zur Peptidsynthese. Optimiert wurde auf 200 µm Spotdurchmesser und 20.000 a.u. Fluoreszenzintensität. Der Übertrag und Kupplung von Arginin muss vierfach durchgeführt werden.....	179
Tabelle 23: Optimierte Transferparameter zur Massenbestimmung über MALDI-TOF	180
Tabelle 24: Optimierte Transferparameter der verwendeten GBB Reagenzien	180
Tabelle 25: Anonymisierte Patientendaten zu Seren der rheumatoiden Arthritis, sowie Kontrollseren (engl.: healthy Control, hC).....	181
Tabelle 26: Anonymisierte Patientendaten zu Seren des Sjögrens Syndrom	181
Tabelle 27: Anonymisierte Patientendaten zu Serum von HBV sowie des Kontrollserum (engl.: healthy Control, hC).....	182
Tabelle 28: Peptidsequenzen der Arraysynthese von diversen Sequenzen aus der Literatur. (Z = Cit, X = HCit, k = Lys(Ac), p = Hyp).....	182
Tabelle 29: Maximale Fluoreszenzintensitäten der Peptidsynthese aus der Literatur nach Inkubation mit den Rheumaseren RA7-13 und den Sekundärantikörper Inkubation mit Anti human IgG AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 5,00.	187
Tabelle 30: Maximale Fluoreszenzintensitäten des linearen Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 nach Inkubation mit den Rheumaseren RA1-13 und der Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 5,00.	189
Tabelle 31: Maximale Fluoreszenzintensitäten des zyklischen Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 nach Inkubation mit den Rheumaseren RA1-13 und der Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 5,00.	189
Tabelle 32: Maximale Fluoreszenzintensitäten des Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 und Vimentin nach Inkubation mit den Seren RA14-16 und hC1-2, sowie der Sekundärantikörper Inkubation mit Anti human IgG AF647.	

Tabellenverzeichnis

Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 7,00	191
--	-----

12. Literaturverzeichnis

- [1] F. Breitling, A. Nesterov, V. Stadler, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff, *Mol Biosyst* **2009**, 5, 224-234.
- [2] L. B. Hansen, S. Buus, C. Schafer-Nielsen, *PLoS One* **2013**, 8, e68902.
- [3] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Guttler, M. Groning, K. Konig, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, 7132-7135.
- [4] L. K. Weber, A. Palermo, J. Kugler, O. Armant, A. Isse, S. Rentschler, T. Jaenisch, J. Hubbuch, S. Dubel, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling, F. F. Loeffler, *J Immunol Methods* **2017**, 443, 45-54.
- [5] T. C. Förtsch, Karslsruher Institut für Technologie **2017**.
- [6] 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. R. Bischoff, L. Hahn, M. A. R. Meier, S. Bräse, A. K. Powell, T. S. Balaban, F. Breitling, A. Nesterov-Mueller, 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. R. Bischoff, L. Hahn, M. A. R. Meier, S. Bräse, A. K. Powell, T. S. Balaban, F. Breitling, A. Nesterov-Mueller, *Nature Communications* **2016** 7:1 **2016-06-14**, 7.
- [7] D. S. Mattes, *Synthese von Peptiden, Peptoiden und Protein-ähnlichen Strukturen im μ Arrayformat*, PhD thesis, **2018**.
- [8] T. Thanh Le, Z. Andreadakis, A. Kumar, R. Gómez Román, S. Tollesen, M. Saville, S. Mayhew, *Nature Reviews Drug Discovery* **2021** 19:5 **2020-04-09**, 19.
- [9] M. Li, H. Wang, L. Tian, Z. Pang, Q. Yang, T. Huang, J. Fan, L. Song, Y. Tong, H. Fan, M. Li, H. Wang, L. Tian, Z. Pang, Q. Yang, T. Huang, J. Fan, L. Song, Y. Tong, H. Fan, *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022** 7:1 **2022-05-03**, 7.
- [10] N. Conrad, S. Misra, J. Y. Verbakel, G. Verbeke, G. Molenberghs, P. N. Taylor, J. Mason, N. Sattar, J. J. V. McMurray, I. B. McInnes, K. Khunti, G. Cambridge, *The Lancet* **2023/06/03**, 401.
- [11] T. M. Karve, A. K. Cheema, *Journal of Amino Acids* **2011/01/01**, 2011.
- [12] G. Opdenakker, P. Proost, J. V. Damme, *Trends in Molecular Medicine* **2016/09/01**, 22.
- [13] T. Gazitt, C. Lood, K. B. Elk, *Rambam Maimonides Med J* **2016**, 7.
- [14] P. Migliorini, F. Pratesi, C. Tommasi, C. Anzilotti, *Autoimmun Rev* **2005**, 4, 561-564.
- [15] R. Yamada, A. Suzuki, X. Chang, K. Yamamoto, *Front Biosci* **2005**, 10, 54-64.
- [16] A. J. Fulthorpe, I. M. Roitt, D. Doniach, K. Couchman, *Journal of clinical pathology* **1961 Nov**, 14.
- [17] C. Benoist, D. Mathis, *Current opinion in immunology* **1992 Apr**, 4.
- [18] J. Rossjohn, S. Gras, J. J. Miles, S. J. Turner, D. I. Godfrey, J. McCluskey, *Annual review of immunology* **2015**, 33.
- [19] P. Deitiker, M. Z. Atassi, *Critical reviews in immunology* **2015**, 35.
- [20] A. S. Johar, J.-M. Anaya, D. Andrews, H. R. Patel, M. Field, C. Goodnow, M. Arcos-Burgos, *Autoimmunity reviews* **2015 Mar**, 14.
- [21] F. Melchers, E. T. Boekel, T. Seidl, X. C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A. G. Rolink, J. Andersson, *Immunological Reviews* **2000/06/01**, 175.

Literaturverzeichnis

- [22] Y. Merbl, M. W. Kirschner, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2011/05/01**, 3.
- [23] S. Gaseitsiwe, D. Valentini, S. Mahdavifar, I. Magalhaes, D. F. Hoft, J. Zerweck, M. Schutkowski, J. Andersson, M. Reilly, M. J. Maeurer, *PLoS one* **2008**, 3.
- [24] J.-R. Lee, D. J. Haddon, N. Gupta, J. V. Price, G. M. Credo, V. K. Diep, K. Kim, D. A. Hall, E. C. Baechler, M. Petri, M. Varma, P. J. Utz, S. X. Wang, *ACS Nano September* **2016**, 10.
- [25] E. S. Witze, W. M. Old, K. A. Resing, N. G. Ahn, E. S. Witze, W. M. Old, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Nature Methods* **2007 4:10 2007-09-27**, 4.
- [26] A. Vigil, C. Chen, A. Jain, R. Nakajima-Sasaki, A. Jasinskas, J. Pablo, L. R. Hendrix, J. E. Samuel, P. L. Felgner, *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2011 Oct**, 10.
- [27] C. J. Pickens, S. N. Johnson, M. M. Pressnall, M. A. Leon, C. J. Berkland, *Bioconjugate Chemistry December* **29, 2017**, 29.
- [28] Preeti Chauhan, Ragendu V., Mohan Kumar, Rajib Molla, S. Dev Mishra, Sneha Basa, Vishal Rai, Preeti Chauhan, Ragendu V., Mohan Kumar, Rajib Molla, S. Dev Mishra, Sneha Basa, Vishal Rai, *Chemical Society Reviews* **2024/01/02**, 53.
- [29] F. M. Veronese, M. Morpurgo, *II Farmaco* **1999/08/30**, 54.
- [30] F. J. Quintana, G. Getz, G. Hed, E. Domany, I. R. Cohen, *Journal of Autoimmunity* **2003/08/01**, 21.
- [31] O. N. Silva, C. de la Fuente-Nunez, E. F. Haney, I. C. Fensterseifer, S. M. Ribeiro, W. F. Porto, P. Brown, C. Faria-Junior, T. M. Rezende, S. E. Moreno, T. K. Lu, R. E. Hancock, O. L. Franco, *Sci Rep* **2016**, 6, 35465.
- [32] S. B. Ebrahimi, D. Samanta, S. B. Ebrahimi, D. Samanta, *Nature Communications* **2023 14:1 2023-04-27**, 14.
- [33] R. Volkmer, V. Tapia, C. Landgraf, *FEBS letters* **08/14/2012**, 586.
- [34] X. Yu, B. Petritis, J. LaBaer, *Proteomics* **2016 Apr**, 16.
- [35] E. Fischer, M. Bergmann, *Untersuchungen über aminosäuren, polypeptide und proteine*, J. Springer, Berlin,, **1906**.
- [36] P. Krosgaard-Larsen, K. Strømgaard, U. Madsen, *Textbook of drug design and discovery*, 4th ed., CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, **2010**.
- [37] A. Ambrogelly, S. Paliorua, D. Söll, *Nature chemical biology* **2007 Jan**, 3.
- [38] W. u. B. Müller-Esterl, U., *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2009**.
- [39] H. Lin, X. Su, B. He, *ACS Chem Biol* **2012**, 7, 947-960.
- [40] K. Dasuri, P. J. Ebenezer, R. M. Uranga, E. Gavilan, L. Zhang, S. O. Fernandez-Kim, A. J. Bruce-Keller, J. N. Keller, *J Neurosci Res* **2011**, 89, 1471-1477.
- [41] E. R. Stadtman, R. L. Levine, *Amino Acids* **2003**, 25, 207-218.
- [42] I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, *Clin Chem* **2006**, 52, 601-623.
- [43] J. F. Ward, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1988**, 35, 95-125.
- [44] E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, D. Pain, *Cancer Lett* **2012**, 327, 48-60.
- [45] K. L. Rock, A. L. Goldberg, *Annu Rev Immunol* **1999**, 17, 739-779.
- [46] S. Lee, *Toxicol Res* **2013**, 29, 81-86.
- [47] T. Hunter, *Cell* **1995**, 80, 225-236.
- [48] C. Choudhary, B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, M. Mann, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, 15, 536-550.
- [49] E. L. Greer, Y. Shi, *Nat Rev Genet* **2012**, 13, 343-357.
- [50] D. Komander, M. Rape, *Annu Rev Biochem* **2012**, 81, 203-229.

- [51] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger, in *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed., Cold Spring Harbor (NY), **2015**.
- [52] E. A. V. Moelants, A. Mortier, J. V. Damme, P. Proost, T. Loos, *Drug Discovery Today: Technologies* **2012/12/01**, 9.
- [53] G. H. Hur, C. R. Vickery, M. D. Burkart, *Nat Prod Rep* **2012**, 29, 1074-1098.
- [54] U. Arnold, *Biotechnology letters* **2009 Aug**, 31.
- [55] Y. Lu, S. Freeland, *Genome Biol* **2006**, 7, 102.
- [56] A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga, *Curr Opin Chem Biol* **2008**, 12, 159-167.
- [57] B. Merrifield, *Science* **1986**, 232, 341-347.
- [58] R. B. Merrifield, **May 1, 2002**.
- [59] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach*, Oxford University Press, New York, **2000**.
- [60] L. A. Carpino, G. Y. Han, *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37.
- [61] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005/11/14**, 61.
- [62] D. E. Walters, **July 18, 2003**.
- [63] S. Bräse, J. Bülle, A. Hüttermann, *Organische und bioorganische Chemie: Das Basiswissen für Master- und Diplomprüfungen*, Wiley, **2008**.
- [64] R. Frank, *J Immunol Methods* **2002**, 267, 13-26.
- [65] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, T. W. Greene, *Greene's protective groups in organic synthesis*, 4th ed., Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., **2007**.
- [66] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Springer Spektrum, Berlin, **2015**.
- [67] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science (New York, N.Y.)* **02/15/1991**, 251.
- [68] C. Katz, C. Katz, L. Levy-Beladev, L. Levy-Beladev, S. Rotem-Bamberger, S. Rotem-Bamberger, T. Rito, T. Rito, S. G. D. Rüdiger, S. G. D. Rüdiger, A. Friedler, A. Friedler, *Chemical Society Reviews* **2011/04/18**, 40.
- [69] F. Falk, *Der Kampf gegen Staphylococcus aureus - Ubiquitäres Anti-Emp und die Detektionsbasis für stochastische Peptidarrays*, PhD Thesis, KIT **2024**.
- [70] Y. Lu, S. Ling, A. M. Hegde, L. A. Byers, K. Coombes, G. B. Mills, R. Akbani, *Semin Oncol* **2016**, 43, 476-483.
- [71] W. Hueber, P. J. Utz, L. Steinman, W. H. Robinson, *Arthritis Res* **2002**, 4, 290-295.
- [72] G. Paris, A. Klinkusch, J. Heidepriem, A. Tsouka, J. Zhang, M. Mende, D. S. Mattes, D. Mager, H. Riegler, S. Eickelmann, F. F. Loeffler, *Applied Surface Science* **2020/04/01**, 508.
- [73] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Third edition. ed., Elsevier/AP, London ; Waltham, MA, **2013**.
- [74] H.-H. Gerdes, C. Kaether, *FEBS Letters* **1996/06/24**, 389.
- [75] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem Rev* **2013**, 113, 1904-2074.
- [76] K. Lang, J. W. Chin, *Chem Rev* **2014**, 114, 4764-4806.
- [77] P. Agarwal, C. R. Bertozzi, *Bioconjug Chem* **2015**, 26, 176-192.
- [78] J. L. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, T. T. J. L. Guesdon, S. Avrameas, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1979-08-01**, 27.
- [79] V. Chudasama, A. Maruani, S. Caddick, *Nat Chem* **2016**, 8, 114-119.
- [80] G. H. Hutchins, S. Kiehstaller, P. Poc, A. H. Lewis, J. Oh, R. Sadighi, N. M. Pearce, M. Ibrahim, I. Drienovská, A. M. Rijs, S. Neubacher, S. Hennig, T. N. Grossmann, *Chem* **2024/02/08**, 10.

Literaturverzeichnis

- [81] O. Koniev, O. Koniev, A. Wagner, A. Wagner, *Chemical Society Reviews* **2015/07/20**, 44.
- [82] P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Applied microbiology and biotechnology* **2006**, 73.
- [83] H.-P. Gerber, P. D. Senter, I. S. Grewal, *mAbs* **2009-5-1**, 1.
- [84] E. A. Bayer, J. J. Grootjans, R. Alon, M. Wilchek, *Biochemistry* **1990**, 29, 11274-11279.
- [85] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, *Pharmaceutical Research* **2007** 25:7 **2008-01-03**, 25.
- [86] S. A. Walper, K. B. Turner, I. L. Medintz, *Current Opinion in Biotechnology* **2015/08/01**, 34.
- [87] L. Davis, J. W. Chin, L. Davis, J. W. Chin, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012** 13:3 **2012-02-15**, 13.
- [88] C. C. Liu, P. G. Schultz, C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annual Review of Biochemistry* **2010/07/07**, 79.
- [89] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, 48, 6974-6998.
- [90] H. Jiang, G. D. D'Agostino, P. A. Cole, D. R. Dempsey, *Chemical Tools for Imaging, Manipulating, and Tracking Biological Systems: Diverse Methods for Optical Imaging and Conjugation* **2020/01/01**, 639.
- [91] D. N. Turvy, J. S. Blum, *Current Protocols in Immunology* **2000/04/01**, 36.
- [92] S. D. Tilley, N. S. Joshi, M. B. Francis, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* **2008**.
- [93] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, 41, 2596-2599.
- [94] Fahmi Himo, Timothy Lovell, Robert Hilgraf, Vsevolod V. Rostovtsev, Louis Noodleman, †, K. Barry Sharpless, ‡ and, Valery V. Fokin*, *Journal of the American Chemical Society December* **8, 2004**, 127.
- [95] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 15046-15047.
- [96] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem Soc Rev* **2010**, 39, 1272-1279.
- [97] J. Dommerholt, F. Rutjes, F. L. van Delft, *Top Curr Chem (Cham)* **2016**, 374, 16.
- [98] O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1928/01/01**, 460.
- [99] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001/06/01**, 40.
- [100] C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem Biol* **2014**, 21, 1075-1101.
- [101] J. Li, P. R. Chen, *Nat Chem Biol* **2016**, 12, 129-137.
- [102] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed., W.H. Freeman, New York, **2008**.
- [103] P. Trinder, *Journal of Clinical Pathology* **1969-03-01**, 22.
- [104] S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein, *Fed Proc* **1958**, 17, 1107-1115.
- [105] B. Ridder, B. Ridder, D. S. Mattes, D. S. Mattes, A. Nesterov-Mueller, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling, F. Breitling, M. A. R. Meier, M. A. R. Meier, *Chemical Communications* **2017/05/17**, 53.
- [106] H. Bienaymé, K. B. 1, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **09/04/1998**, 37.
- [107] C. Blackburn, B. Guan, P. Fleming, K. Shiosaki, S. Tsai, *Tetrahedron Letters* **1998/05/28**, 39.
- [108] K. Groebke, L. Weber, F. Mehlin, *Synlett* **1998/06**, 1998.
- [109] M. Stahlberger, N. Schwarz, C. Zippel, J. Hohmann, M. Nieger, Z. Hassan, S. Bräse, *Chemistry – A European Journal* **2022/01/13**, 28.

- [110] R. Brandes, F. Lang, R. F. Schmidt, *Physiologie des Menschen*, **2019**.
- [111] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. G. jr., L. Stryer, *Stryer Biochemie*, **2018**.
- [112] K. Murphy, C. Weaver, *Janeway Immunologie* **2018**.
- [113] M. Kirschfink, *Pädiatrie* **2014**.
- [114] S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, *Nat Immunol* **2001**, 2, 675-680.
- [115] K. Murphy, C. Weaver, *Janeway Immunologie*, **2018**.
- [116] R. R. Rich, D. D. Chaplin, *Clinical Immunology* **2019/01/01**.
- [117] G. J. V. NOSSAL, J. LEDERBERG, G. J. V. NOSSAL, J. LEDERBERG, *Nature* **1958** 181:4620 **1958/05**, 181.
- [118] I. A. Wilson, K. C. Garcia, *Curr Opin Struct Biol* **1997**, 7, 839-848.
- [119] K. C. Garcia, M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton, I. A. Wilson, *Science (New York, N.Y.)* **10/11/1996**, 274.
- [120] G. Evers, M. Thrull, H. Wittkowski, L. H. Schmidt, M. Mohr, *Pneumologie* **2019/02**, 73.
- [121] R.-A. A., in *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]* (Ed.: S. Y. Anaya JM, Rojas-Villarraga A, et al.), El Rosario University Press, Bogota (Colombia), **2013**.
- [122] J.-F. Bach, *Journal of autoimmunity* **2005**, 25 Suppl.
- [123] G. S. Cooper, F. W. Miller, J. P. Pandey, *Environ Health Perspect* **1999**, 107 Suppl 5, 693-700.
- [124] C. A. Dendrou, J. Petersen, J. Rossjohn, L. Fugger, *Nat Rev Immunol* **2018**, 18, 325-339.
- [125] L. Rink, A. Kruse, H. Haase, *Immunologie für Einsteiger* **2012**.
- [126] Y. Shi, *Cell* **10/30/2009**, 139.
- [127] S. Wang, A. O. Osgood, A. Chatterjee, *Current opinion in structural biology* **2022 Jun**, 74.
- [128] S. M. Janssen, M. C. Lorincz, *Nature reviews. Genetics* **2022 Mar**, 23.
- [129] K. Albrecht, S. Binder, K. Minden, D. Poddubnyy, A. C. Regierer, A. Strangfeld, J. Callhoff, K. Albrecht, S. Binder, K. Minden, D. Poddubnyy, A. C. Regierer, A. Strangfeld, J. Callhoff, *Zeitschrift für Rheumatologie* **2023 82:9 2023-01-02**, 82.
- [130] R. Malhotra, M. R. Wormald, P. M. Rudd, P. B. Fischer, R. A. Dwek, R. B. Sim, *Nature medicine* **1995 Mar**, 1.
- [131] J. H. Kim, G. W. Kim, M. Y. Lee, J. Y. Shin, Y. G. Shin, S. B. Koh, C. H. Chung, *Diabetes & Metabolism Journal* **2012/02**, 36.
- [132] T. F. Scanlin, M. C. Glick, *Respiratory Research* **2001**, 2.
- [133] M. Takahashi, Y. Tsujioka, T. Yamada, Y. Tsuboi, H. Okada, T. Yamamoto, Z. Liposits, *Acta neuropathologica* **1999 Jun**, 97.
- [134] Y. Chen, Y. Teng, P. Xu, S. Wang, Y. Chen, Y. Teng, P. Xu, S. Wang, *Biomolecules* **2024**, Vol. 14, Page 400 **2024-03-26**, 14.
- [135] R. A. Mageed, *Manual of Biological Markers of Disease* **1996**.
- [136] J. R. Lisse, *Postgraduate Medicine* **1993-11-1**, 94.
- [137] P. T., T. R., S. T., A. K., *Annals of the Rheumatic Diseases* **2003**, 62, 261-263.
- [138] G. A. Schellekens, H. Visser, B. A. W. De Jong, F. H. J. Van Den Hoogen, J. M. W. Hazes, F. C. Breedveld, W. J. Van Venrooij, *Arthritis & Rheumatism* **2000**, 43, 155-163.
- [139] G. C. Pinheiro, M. A. Scheinberg, M. A. d. Silva, S. Maciel, *Annals of Internal Medicine* **2003**, 139, 234-235.
- [140] E. R. Vossenaar, W. J. v. Venrooij, *Clinical and Applied Immunology Reviews* **2004/05/01**, 4.
- [141] G. A. Schellekens, B. A. d. Jong, F. H. v. d. Hoogen, L. B. v. d. Putte, W. J. v. Venrooij, *The Journal of Clinical Investigation* **1998/01/01**, 101.

Literaturverzeichnis

- [142] A. Union, L. Meheus, R. L. Humbel, K. Conrad, G. Steiner, H. Moereels, H. Pottel, G. Serre, F. D. Keyser, *Arthritis & Rheumatism* **2002/05/01**, 46.
- [143] C. Fernandes-Cerqueira, E. Ossipova, S. Gunasekera, M. Hansson, L. Mathsson, A. I. Catrina, Y. Sommarin, L. Klareskog, K. Lundberg, J. Rönnelid, U. Göransson, P.-J. Jakobsson, *Arthritis research & therapy* **06/10/2015**, 17.
- [144] Y. Takizawa, A. Suzuki, T. Sawada, M. Ohsaka, T. Inoue, R. Yamada, K. Yamamoto, *Annals of the rheumatic diseases* **2006 Aug**, 65.
- [145] A. Taldaev, V. Rudnev, L. Kulikova, K. Nikolsky, A. Efimov, K. Malsagova, A. Kaysheva, A. Taldaev, V. Rudnev, L. Kulikova, K. Nikolsky, A. Efimov, K. Malsagova, A. Kaysheva, *Proteomes* **2022, Vol. 10, Page 8 2022-02-11**, 10.
- [146] E. R. Vossenaar, N. Després, E. Lapointe, A. van der Heijden, M. Lora, T. Senshu, W. J. van Venrooij, H. A. Ménard, E. R. Vossenaar, N. Després, E. Lapointe, A. van der Heijden, M. Lora, T. Senshu, W. J. van Venrooij, H. A. Ménard, *Arthritis Res Ther* **2004 6:2 2004-02-05**, 6.
- [147] M. Taraborelli, F. Inverardi, M. Fredi, A. Ceribelli, I. Cavazzana, A. Tincani, F. Franceschini, *Reumatismo* **2012/12/11**, 64.
- [148] A. Nezos, I. Cinoku, C. P. Mavragani, H. M. Moutsopoulos, *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **2017 Oct**, 183.
- [149] C. Rotondo, A. Corrado, D. Cici, S. Berardi, F. P. Cantatore, *Therapeutic Advances in Chronic Disease* **2021**, 12.
- [150] Y. Li, R. Jia, Y. Liu, S. Tang, X. Ma, L. Shi, J. Zhao, F. Hu, Z. Li, *Lupus* **2020 Mar**, 29.
- [151] B. Bergum, C. Koro, N. Delaleu, M. Solheim, A. Hellvard, V. Binder, R. Jonsson, V. Valim, D. S. Hammenfors, M. V. Jonsson, P. Mydel, *Annals of the rheumatic diseases* **2016 Aug**, 75.
- [152] L. A. Trouw, T. Rispens, R. E. M. Toes, L. A. Trouw, T. Rispens, R. E. M. Toes, *Nature Reviews Rheumatology* **2017 13:6 2017-03-09**, 13.
- [153] J. Shi, R. Knevel, P. Suwannalai, M. P. v. d. Linden, G. M. C. Janssen, P. A. v. Veelen, N. E. W. Levarht, A. H. M. v. d. H.-v. Mil, A. Cerami, T. W. J. Huizinga, R. E. M. Toes, L. A. Trouw, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **10/18/2011**, 108.
- [154] T. Kissel, S. Reijm, L. Slot, M. Cavallari, C. Wortel, R. Vergroesen, G. Stoeken-Rijnsbergen, J. Kwekkeboom, A. Kampstra, E. Levarht, J. Drijfhout, H. Bang, K. Bonger, G. Janssen, P. v. Veelen, T. Huizinga, H. Scherer, M. Reth, R. Toes, *Annals of the Rheumatic Diseases* **2020-04-01**, 79.
- [155] S. Sharma, K. C. Sarathlal, R. Taliyan, *CNS & neurological disorders drug targets* **2019**, 18.
- [156] H. Uysal, R. Bockermann, K. S. Nandakumar, B. Sehnert, E. Bajtner, Å. Engström, G. Serre, H. Burkhardt, M. M. G. M. Thunnissen, R. Holmdahl, *The Journal of Experimental Medicine* **2009/02/02**, 206.
- [157] T. Bishop, P. J. Ratcliffe, *Circulation research* **06/19/2015**, 117.
- [158] A. R. Clark, J. L. Dean, *The Open Rheumatology Journal* **2012/9/7**, 6.
- [159] E. L. Ashby, J. S. Miners, S. Kumar, J. Walter, S. Love, P. G. Kehoe, *Neuropathology and Applied Neurobiology* **2015/06/01**, 41.
- [160] S. Kumar, O. Wirths, S. Theil, J. Gerth, T. A. Bayer, J. Walter, *Acta neuropathologica* **2013 May**, 125.
- [161] C. H. Na, G. Sathe, L. S. Rosenthal, A. R. Moghekar, V. L. Dawson, T. M. Dawson, A. Pandey, *Clinical Proteomics* **2020**, 17.
- [162] R. Li, Y. Lei, A. Rezk, D. A. Espinoza, J. Wang, H. Feng, B. Zhang, I. P. Barcelos, H. Zhang, J. Yu, X. Huo, F. Zhu, C. Yang, H. Tang, A. C. Goldstein,

- B. L. Banwell, H. Hakonarson, H. Xu, M. Mingueneau, B. Sun, H. Li, A. Bar-Or, *Science immunology* **05/03/2024**, 9.
- [163] Robert Koch Institut, Statista, **02.05.2024**.
- [164] Y. T. Lan, J. Li, W. Liao, J. Ou, *Virology* **07/05/1999**, 259.
- [165] M.-L. Fogeron, L. Lecoq, L. Cole, R. Montserret, G. David, A. Page, F. Delolme, M. Nassal, A. Böckmann, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, 8.
- [166] E. R. Vossenaar, W. J. van Venrooij, E. R. Vossenaar, W. J. van Venrooij, *Arthritis Res Ther* **2004** 6:3 **2004-04-19**, 6.
- [167] M. Mende, A. Tsouka, J. Heidepriem, G. Paris, D. S. Mattes, S. Eickelmann, V. Bordoni, R. Wawrzinek, F. F. Fuchsberger, P. H. Seeberger, C. Rademacher, M. Delbianco, A. Mallagaray, F. F. Loeffler, *Chemistry – A European Journal* **2020/08/06**, 26.
- [168] A. Klinkusch, *Miniaturisierte Synthese von kombinatorischen Arrays fluoreszierender Moleküle via nano3D-Laserprinting*, PhD thesis, KIT **2021**.
- [169] C. Gedigk, *Entwicklung von Peptidarrays für die Erforschung von Autoimmunerkrankungen*, Master Thesis thesis, KIT **2021**.
- [170] S. Ramazi, J. Zahiri, *Database* **2021/09/29**, 2021.
- [171] S. Clark, P. S. Francis, X. A. Conlan, N. W. Barnett, *Journal of Chromatography A* **2007/08/17**, 1161.
- [172] P. J. Butterworth, *Cell Biochemistry and Function* **2005/07/01**, 23.
- [173] P. Szpak, *Journal of Archaeological Science* **2011/12/01**, 38, 3358-3372.
- [174] P. Tsipouras, F. Ramirez, *J Med Genet* **1987**, 24, 2-8.
- [175] A. De Paepe, *Verh K Acad Geneeskd Belg* **1998**, 60, 463-482; discussion 482-464.
- [176] S. Heinonen, M. Mannikko, J. F. Klement, D. Whitaker-Menezes, G. F. Murphy, J. Uitto, *J Cell Sci* **1999**, 112 (Pt 21), 3641-3648.
- [177] J. S. Kern, J. Kohlhase, L. Bruckner-Tuderman, C. Has, *J Invest Dermatol* **2006**, 126, 1006-1012.
- [178] F. Malfait, R. J. Wenstrup, A. De Paepe, *Genet Med* **2010**, 12, 597-605.
- [179] A. Forlino, W. A. Cabral, A. M. Barnes, J. C. Marini, *Nat Rev Endocrinol* **2011**, 7, 540-557.
- [180] J. Fan, I. Toth, R. J. Stephenson, *Bioconjugated Materials Part 2 Applications in Drug Delivery, Vaccine Formulations and Important Conjugates for Cancer Therapy* **2023**, 103, 59-103.
- [181] Y. C. Ho, S. K. Boey, A. M. V. Mathews, H. G. See, N. C. Hwang, *Anesthesia, Essays and Researches Jan-Mar 2018*, 12.
- [182] Y. Huang, K. H. Weisgraber, L. Mucke, R. W. Mahley, *Journal of molecular neuroscience : MN* **2004**, 23.
- [183] L. Stefanis, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012/02**, 2.
- [184] H. Altenbach, *Untersuchung von donorspezifischen Antikörpern bei Transplantatabstoßung mit Peptidarrays*, Master Thesis thesis, KIT **2022**.
- [185] D. J. Essig, J. R. Balboa, K. Strømgaard, *Methods in Molecular Biology* **2021**.
- [186] A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo, in *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. E 22b, 4th Edition Supplement*, **2004**.
- [187] D. s. M. M. Jaradat, H. Hamouda, C. P. R. Hackenberger, *European Journal of Organic Chemistry* **2010/09/01**, 2010.
- [188] I. Haro, R. Sanmartí, M. J. Gómara, *International Journal of Molecular Sciences* **2022/12**, 23.
- [189] H. d. Rocquigny, V. Rat, F. Pastor, J. L. Darlix, C. Houroux, P. Roingeard, *Viruses* **07/08/2020**, 12.

Literaturverzeichnis

- [190] M. Sebbag, N. Moinard, I. Auger, C. Clavel, J. Arnaud, L. Nogueira, J. Roudier, G. Serre, *European Journal of Immunology* **2006/08/01**, 36.
- [191] M. Scinocca, D. A. Bell, M. Racapé, R. Joseph, G. Shaw, J. K. McCormick, D. D. Gladman, J. Pope, L. Barra, E. Cairns, *The Journal of Rheumatology* **2014-02-01**, 41.
- [192] J. J. B. C. v. Beers, C. M. Schwarte, J. Stammen-Vogelzangs, E. Oosterink, B. Božič, G. J. M. Pruijn, *Arthritis & Rheumatism* **2013/01/01**, 65.
- [193] L. Rink, Kruse, A., and Haase, H., eds., *Immunologie für Einsteiger*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2015**.
- [194] H. Burkhardt, B. Sehnert, R. Bockermann, A. Engström, J. R. Kalden, R. Holmdahl, *European journal of immunology* **2005 May**, 35.
- [195] C. Ge, D. Tong, B. Liang, E. Lönnblom, N. Schneider, C. Hagert, J. Viljanen, B. Ayoglu, R. Stawikowska, P. Nilsson, G. B. Fields, T. Skogh, A. Kastbom, J. Kihlberg, H. Burkhardt, D. Dobritzsch, R. Holmdahl, *JCI insight* **07/06/2017**, 2.
- [196] S. Haag, N. Schneider, D. E. Mason, J. Tuncel, I. E. Andersson, E. C. Peters, H. Burkhardt, R. Holmdahl, *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* **2014 Jun**, 66.
- [197] H. Uysal, K. S. Nandakumar, C. Kessel, S. Haag, S. Carlsen, H. Burkhardt, R. Holmdahl, *Immunological Reviews* **2010/01/01**, 233.
- [198] E. R. Vossenaar, N. Després, E. Lapointe, A. v. d. Heijden, M. Lora, T. Senshu, W. J. v. Venrooij, H. A. Ménard, *Arthritis Research & Therapy* **2004**, 6.
- [199] J. M. Heaton, *British Medical Journal* **1959/02/02**, 1.
- [200] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02458/entry>, CO2A1_HUMAN (P02458), date accessed: 04.10.2023, last updated 23.01.2007 ed., UniProt Consortium.
- [201] J. E. Pope, M. Movahedi, E. Rampakakis, A. Cesta, J. S. Sampalis, E. Keystone, C. Thorne, C. Bombardier, *RMD Open* **2018-11-01**, 4.
- [202] J. Sokolove, D. S. Johnson, L. J. Lahey, C. A. Wagner, D. Cheng, G. M. Thiele, K. Michaud, H. Sayles, A. M. Reimold, L. Caplan, G. W. Cannon, G. Kerr, T. R. Mikuls, W. H. Robinson, *Arthritis & Rheumatology* **2014**, 66, 813-821.
- [203] M. K. Verheul, U. Fearon, L. A. Trouw, D. J. Veale, *Clinical Immunology* **2015/11/01**, 161.
- [204] S. Fadda, N. Khairy, H. Fayed, H. Mousa, R. Taha, *The Egyptian Rheumatologist* **2018/07/01**, 40, 155-160.
- [205] T. Jónsson, S. Arinbjarnarson, J. Thorsteinsson, K. Steinsson, Á. J. Geirsson, H. Jónsson, H. Valdimarsson, *Scandinavian Journal of Rheumatology* **1995-1-1**, 24.
- [206] A. Willemze, L. A. Trouw, R. E. M. Toes, T. W. J. Huizinga, A. Willemze, L. A. Trouw, R. E. M. Toes, T. W. J. Huizinga, *Nature Reviews Rheumatology* **2012 8:3 2012-01-31**, 8.
- [207] D. Aletaha, F. Alasti, J. S. Smolen, *Arthritis research & therapy* **08/26/2015**, 17.
- [208] L. Barra, J. E. Pope, J. E. Orav, G. Boire, B. Haraoui, C. Hitchon, E. C. Keystone, J. C. Thorne, D. Tin, V. P. Bykerk, a. t. C. Investigators, *The Journal of Rheumatology* **2014-12-01**, 41.
- [209] N. Sobhy, S. A. Ghoniem, B. M. Eissa, A. Kamal, A. Medhat, N. Y. Elsaied, *The Egyptian Rheumatologist* **2022/10/01**, 44.
- [210] E. A. James, V. M. Holers, R. Iyer, E. B. Prideaux, N. L. Rao, C. Rims, V. S. Muir, S. E. Posso, M. S. Bloom, A. Zia, S. E. Elliott, J. Z. Adamska, R. Ai, R. C. Brewer, J. A. Seifert, L. Moss, S. Barzideh, M. K. Demoruelle, C. C. Striebich, Y. Okamoto, E. Sainbayar, A. A. Crook, R. A. Peterson, L. A. Vanderlinden, W. Wang, D. L. Boyle, W. H. Robinson, J. H. Buckner, G. S. Firestein, K. D. Deane, *Nature Communications* **2023 14:1 2023-11-22**, 14.

- [211] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08670/entry#sequences>, VIME_HUMAN (P08670), date accessed: 08.04.2024, last updated 23.01.2007 ed., UniProt Consortium.
- [212] C. Mauri, M. R. Ehrenstein, *Trends in Immunology* **2008/01/01**, 29.
- [213] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A023NK02/entry>, Large envelope protein, S Gene A0A023NK02_HBV, date accessed: 08.08.2023, UniProt Consortium.
- [214] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q15194/entry>, Capsid Protein, C Gene Q15194_HBV, date accessed: 08.08.2023, UniProt Consortium.
- [215] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q2EIE9/entry>, Protein X, X Gene Q2EIE9_HBV, date accessed: 08.08.2023, UniProt Consortium.
- [216] <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A023NJU9/entry>, Protein P, P Gene A0A023NJU9_HBV, date accessed: 08.08.2023, UniProt Consortium.
- [217] E. Drent, R. van Dijk, R. van Ginkel, B. van Oort, R. I. Pugh, *Chem Commun (Camb)* **2002**, 964-965.
- [218] W. N. Washburn, M. Manfredi, P. Devasthale, G. Zhao, S. Ahmad, A. Hernandez, J. A. Robl, W. Wang, J. Mignone, Z. Wang, K. Ngu, M. A. Pelleymounter, D. Longhi, R. Zhao, B. Wang, N. Huang, N. Flynn, A. V. Azzara, J. C. Barrish, K. Rohrbach, J. J. Devenny, S. Rooney, M. Thomas, S. Glick, H. E. Godonis, S. J. Harvey, M. J. Cullen, H. Zhang, C. Caporuscio, P. Stetsko, M. Grubb, B. D. Maxwell, H. Yang, A. Apedo, B. Gemzik, E. B. Janovitz, C. Huang, L. Zhang, C. Freeden, B. J. Murphy, *J Med Chem* **2014**, 57, 7509-7522.

13. Anhang

13.1 Einwaagen der Beschichtungslösungen

Die Donor-Oberflächen wurden nach AAV8 und AAV9 hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 19: Berechnete Einwaage zur Donorbeschichtung für 30,0 µmol der geschützten, proteinogenen Aminosäuren und der zugehörigen Matrix in 1,00 mL DCM. Zuerst wurde DMF (falls es verwendet wurde) und dann die Matrix in DCM zur Aminosäure hinzugegeben.

Aminosäure	geschützte Variante	M [g/mol]	Einwaage [mg]	Einwaage Matrix [mg]	Volumen DMF [µL]
Ala	Fmoc-Ala-OPfp	477,38	14,3	135,7	
Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	19,5	130,5	50,0
Asn	Fmoc-Asn(Trt)-OPfp	762,72	22,9	127,1	
Asp	Fmoc-Asp(OtBu)-OPfp	577,50	17,3	132,7	
Cys	Fmoc-Cys(Trt)-OPfp	751,76	22,6	127,4	
Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OPfp	776,75	23,3	126,7	
Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OPfp	591,52	17,7	132,3	
Gly	Fmoc-Gly-OPfp	463,35	13,9	136,1	
His	Fmoc-His(Trt)-OPfp	785,76	23,6	126,4	
Ile	Fmoc-Ile-OPfp	519,46	15,6	134,4	
Leu	Fmoc-Leu-OPfp	519,46	15,6	134,4	
Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OPfp	634,59	19,0	131,0	
Met	Fmoc-Met-OPfp	537,50	16,1	133,9	
Phe	Fmoc-Phe-OPfp	553,48	16,6	133,4	
Pro	Fmoc-Pro-OPfp	503,42	15,1	134,9	
Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OPfp	549,49	16,5	133,5	
Thr	Fmoc-Thr(tBu)-OPfp	563,51	16,9	133,1	
Trp	Fmoc-Trp(Boc)-OPfp	692,63	20,8	129,2	
Tyr	Fmoc-Tyr(tBu)-OPfp	625,58	18,8	131,2	
Val	Fmoc-Val-OPfp	505,43	15,2	134,8	

Anhang

Tabelle 20: Berechnete Einwaage zur Donorbeschichtung für 30,0 µmol der geschützten, nicht proteinogenen Aminosäuren und der zugehörigen Matrix in 1,00 mL Gesamtvolumen (LM: DCM). Zuerst wurde DMF (falls es verwendet wurde) und dann die Matrix in DCM zur Aminosäure hinzugegeben.

Aminosäure	geschützte Variante	MW [g/mol]	Einwaage [mg]	Einwaage Matrix [mg]	Volumen DMF [µL]
Cit	Fmoc-Cit-OPfp	563,48	16,9	133,1	50,0
HCit	Fmoc-HCit-OPfp	577,51	17,3	132,7	50,0
Lys(Ac)	Fmoc-Lys(Ac)-OPfp	576,52	17,3	132,7	-
pThr	Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH	511,47	15,3	134,7	50,0
pSer	Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH	497,44	14,9	135,1	50,0
pTyr	Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH	573,54	17,2	132,8	50,0
Hyp	Fmoc-Hyp(tBu)-OH	409,48	12,3	137,7	50,0
Lys(N ₃)	Fmoc-Lys(N3)-OH	394,43	11,8	137,2	50,0
Abg	Fmoc-Abg(Boc)-OH	468,54	14,1	135,9	50,0
Aea	Fmoc-Aea-OH	411,45	12,3	137,7	50,0
D-Asp	Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH	411,45	12,3	137,7	50,0
D-Cys	Fmoc-D-Cys-OH*H ₂ O	343*18	10,8	139,2	50,0
D-Pro	Fmoc-D-Pro-OH	337,37	10,1	139,9	50,0
Pra	Fmoc-Pra-OH	335,35	10,1	139,9	50,0
Tmb	Fmoc-Tmb-Gly-OH	477,51	14,3	135,7	50,0
Asp-4-ae	Fmoc-Asp-4-Allylester	395,41	11,9	137,1	50,0

Tabelle 21: Berechnete Einwaage zur Donorbeschichtung der benötigten Reagenzien und der zugehörigen Matrix für 1,00 mL DCM

Reagenz	MW [g/mol]	Einwaage [mg]	Stoffmenge [µmol]	Einwaage Matrix [mg]
DIC	126,20	9,40	56,0	142
Oxyma Pure	142,11	8,00	56,0	142
DIPEA	129,24	19,6	112	130
2-Aminopyrazin	95,10	15,0	158	135
1-Adamantylisocyanid	161,24	15,0	93,2	135
TCA	163,39	15,0	92,0	135

13.2 Parameter des laserbasierten Transfers mit dem nano3D Drucker

Der laserbasierte Transfer wurde nach AAV10 durchgeführt. Im Fall eines mehrfachen Transfers wurde ein Kupplungsschritt nach AAV11 vorgenommen und der Prozess wiederholt. Die verwendeten Donoroberflächen wurden nach AAV8 und AAV9 hergestellt. Die Peptidsynthesen wurden zudem 10,0 mm außerhalb der Fokusebene des Lasers durchgeführt.

Tabelle 22: Optimierte Transferparameter für die verwendeten Aminosäuren zur Peptidsynthese. Optimiert wurde auf 200 µm Spotdurchmesser und 20.000 a.u. Fluoreszenzintensität. Der Übertrag und Kupplung von Arginin muss vierfach durchgeführt werden.

Aminosäure	Abkürzung	Laserenergie [mW]	Laserzeit [ms]
Ala	A	140	10,0
Arg	R	240	28,0
Asn	N	170	12,0
Asp	D	140	8,00
Cys	C	170	12,0
Gln	Q	170	12,0
Glu	E	130	8,00
Gly	G	130	8,00
His	H	170	12,0
Ile	I	150	8,00
Leu	L	150	8,00
Lys	K	150	14,0
Met	M	120	8,00
Phe	F	150	8,00
Pro	P	140	8,00
Ser	S	130	8,00
Thr	T	140	6,00
Trp	W	170	10,0
Tyr	Y	170	8,00
Val	V	140	8,00
Cit	Z	180	14,0
HCit	X	180	14,0
Lys(Ac)	k	180	14,0
Hyp	p	160	12,0

Anhang

Tabelle 23: Optimierte Transferparameter zur Massenbestimmung über MALDI-TOF

Aminosäure	Laserenergie [mW]	Laserzeit [ms]
Cit	180	14,0
HCit	180	14,0
Lys(Ac)	180	14,0
pThr	200	16,0
pSer	200	16,0
pTyr	200	16,0
Hyp	160	12,0
Lys(N ₃)	180	8,00
Abg	200	10,0
Aea	200	14,0
Pra	140	8,00
Tmb	200	10,0
Asp-ae	160	10,0

Die eingesetzten Edukte der GBB Reaktion, sowie deren Optimierung sind in der Dissertation von Jannik Schlindwein beschrieben.

Tabelle 24: Optimierte Transferparameter der verwendeten GBB Reagenzien

Reagenz	Laserenergie [mW]	Laserzeit [ms]
Fmoc-Aea-OH	200	14,0
2-Aminopyrazin	260	16,0
1-Adamantylisocyanid	240	14,0
TCA	180	10,0

13.3 Anonymisierte Daten zu den verwendeten Patientenserien

Tabelle 25: Anonymisierte Patientendaten zu Seren der rheumatoiden Arthritis, sowie Kontrollseren (engl.: healthy Control, hC)

Serum	Diagnose	Kategorie	Anti-CCP [IU/ml]	Alter	Geschlecht
RA1	RA	spät (RF-)	negativ	58	f
RA2	RA	spät (RF+)	positiv	49	f
RA3	RA	spät (RF-)	negativ	79	m
RA4	RA	spät (RF+)	positiv	76	m
RA5	RA	spät (RF-)	positiv	50	f
RA6	RA	spät (RF+)	positiv	32	m
RA7	RA	spät	77,7	-	-
RA8	RA	spät	169,3	-	-
RA9	RA	spät	83,9	-	-
RA10	RA	spät	> Max	-	-
RA11	RA	spät	> Max	-	-
RA12	RA	spät	162,1	-	-
RA13	RA	spät	Pos.	-	-
RA14	RA	früh	132,6	-	-
RA15	RA	früh	140,7	-	-
RA16	RA	früh	0	-	-
hC1	gesund	-	0	-	-
hC2	gesund	-	0	-	-

Tabelle 26: Anonymisierte Patientendaten zu Seren des Sjögrens Syndrom

Serum	Diagnose	Anti-Ro/ Ro-52	Anti-La	Nukleosome
SjS1	SjS	+++/+++	-	
SjS2	SjS	+++/+++	-	
SjS3	SjS	+++/+++	+++	
SjS4	SjS	+++/+++	-	
SjS5	SjS	+++/+++	+	(+)
SjS6	SjS	+++/+++		

Tabelle 27: Anonymisierte Patientendaten zu Serum von HBV sowie des Kontrollserum (engl.: healthy Control, hC)

Serum	Diagnose	Anti-HBs [IU/L]	Alter	Geschlecht
HBs	HBV	>1.000	46	f
hC3	gesund	0	46	f

13.4 Daten und Fluoreszenzscans zu den biologischen Anwendungen

a) Peptidliste zu der Peptidsynthese aus der Literatur

Die folgenden Peptidsequenzen in Tabelle 28 sind hauptsächlich aus Peptiden der Proteine Filaggrin^[141-142, 190], Fibrinogen^[142-145, 154, 191], Vimentin^[142, 145-146, 154], α -Enolase^[142, 145, 154, 192], Apolipoprotein (A-C, E)^[142, 145, 192], sowie diverse weitere Peptide^[142, 145, 156, 192] zusammengesetzt. Dabei wurden die PTMs Citrullin (Cit, Z), Homocitrullin (HCit, X), Acetylysin (Lys(Ac), k) und Hydroxyprolin (Hyp, p) integriert.

Tabelle 28: Peptidsequenzen der Arraysynthese von diversen Sequenzen aus der Literatur. (Z = Cit, X = HCit, k = Lys(Ac), p = Hyp)

Peptidsequenz	Peptidsequenz	Peptidsequenz
AAANQMRNFLVRASC	GZGAEDSLADQAANK	SEQGVYTCTAQGIWK
AAAPPPAVPCAPAEN	GZTSTADYAMFXVGP	SEVXQLIXAIQLTYN
AAZLPVAPLRKGGGG	GZYSISRTEAADLCK	SEZDFALLSLQVPLK
ADLSGITGAZNLAVS	GZYYWGGQYTWDMAK	SEZGDAVCTESGWRP
ADZDQYELLCLDNTZ	HENMZRPYFPVAVGK	SEZQRNVEHKVAAIK
AEFTGZHDAHLNGKG	HGGLYHENMZRPYFP	SFVERCIDWNRELLK
AEGGGVkGPkVVEKH	HHPGIAEFPSRGKSS	SGGGYRARPAKAAAT
AEGGGVRGPRVVERH	HHPGIEFPSZGKSSS	SGGGYRAZPAKAAAT
AEGGGVXGPXVVEXH	HLSLLTTLSNZVCSQ	SGGGYZARPAKAAAT
AEGGGVZGPZVVEZH	HMIDDSMICAGNLQK	SGGSDZTIAYENKGG
AEGGGVZGPZVVEZH	HNDDEQYAWESSAGG	SGQDVSQAQZQIKGG
AEILELAGNAAZDNK	HPGIAEFPSZGXSSS	SGQWQTTPGATZSLSK
AESSSGVPGTADSRS	HQPQEFPYVEPTND	SGSTTTTZZSCSXT
AEZFSSZGGRLGSSR	HSASQDGQDTIZGHP	SGXECEEIIIZXGET
AGFAGDDAPZAVFPS	HSGIGHGQASSAVRD	SHALQLNNZQIRGLE
AHGVQTESSTVTPTL	HSTSQEQQDTIHZH	SHHPGIAEFPSZGKS
AHPGSRRGGZHGYHH	HTFVQSGSHLAAZEK	SHQESTRGRSRGRSG
AHPGSRZGGRHGYHH	HTFYNELZVAPEEHP	SHQESTRGRSRGZSG
AHPGSZRGGRHGYHH	HVIPMNPNTNDLFNA	SHQESTRGRSZGRSG
AHPGSZZGGRHGYHH	HYGGFTVQNEANXYQ	SHQESTRGRSZGRSG
AKPALEDLZQGLPV	HZGYSGSQASDNEGH	SHQESTZGRSRGRSG
ALENDPDCZHVIPMN	IAEFPSZGKSSYSK	SHQESTZGRSRGZSG
ALGHLDLSGNZLRKG	IAFPSIGSGZNGFPK	SHQESTZGRSZGRSG
ALYLQYTDETFTTI	IAXDLLPSZDZQHLP	SHQESTZGZSRGRSG
ALZDVZQQYESVAAK	ICVGCPZDIPTNSPE	SHSFZAMCQNGKG

AMHVAQPAVVLASSZ	IDEIVLVGGSTZIPK	SIAFPSIGSGZNGFP
ANSZFATTFYQHLAD	IDVPSRTAZAITTzs	SKQFTSSTSNTNRGDS
APPPISGGGYRARPA	IGRELNPRIGTFDLK	SKQFTSSTSNTNZGDS
APPPISGGGYRAZPA	IGRTWNDPSVQQDIK	SLISRZGDMSSNPAK
APPPISGGGYZARPA	IHAkeIFDSkGNPTV	SLQSSSVSEZQRNVE
APZNDLSPASSGNAV	IHAREIFDSRGNPTV	SLZPAPPPISGGGYZ
APZNLLRRVSQTDNSI	IHAXEIFDSXGNPTV	SPFGSSFZTFNATDY
AQALZDNSTMGYMAA	IHAZEIFDSZGNPTV	SPGTZZEYHTEXLVT
AQLNLATZWPCTLL	IHDITGXDCQDIANX	SPPAAVAVAVSAAAP
AQTTVTCMENGWSPT	IHQEMIGGLZNNNEK	SPPLYCDSEIDAELK
AQZIYGNQDTSSQLK	IHWESASLLRSEETK	SPZDYSNFDQEFLNE
ASSARDZGHGRGSRGS	IIGRCTGTAANSZDT	SQDGQDTIZHPGSS
ASSAZDRGHGRGSRGS	IKIZSCZGSCSZALA	SQLVYQSRZGPLVKG
AVTEMNGZIVATKGG	ILAAAANMPVQGPLEK	SQTDNSITLEWRNGK
AVVЛАSSZGIASFVC	INQEEVGLAAPAPTA	SSGNAYDFFIGREL
AWAVARLSQZFPKGG	IPCSQPPPQIEHTIN	SSGQWQTPGATZSLS
AZSEMDKVZVFQATZ	IPEATNZRVWELSKG	SSSFLNFGFANZFSK
CANGZQTWSAVTPK	IREVTQZLNGEIQAL	SSSPVTGYZVTTTPK
CCTESLVRZPCFSA	ISAZFSDGLESNSST	SSVPGVRLLQDSVDF
CGIADFLSTYQTXVD	ISNAZENIQRLTGZG	SSVPGVZLLQDSVDF
CNMGYEYSEZGDAVC	ISPDQLADLYKSFIK	SSYAFFVQTCZEEHK
CSTSSLLEACTFZRP	ITGAZNLAVSQVVHK	SSZSHTLZTCWDGK
CSZALAZEVDLXDYE	ITGMILLEIDNSELLH	SSZTSNPYRVPANLE
CTESGWRPLPSCEEK	ITHZIHWESASLLRS	STATDITGPIILQTY
CTGTAANSZDTIFQK	KGFRLLLASPZSCYK	STRGRSRGRSGZSGS
CTLLFFLLFIPVFCK	KIHAKEIFDSkGNPT	STRGRSRGZSGRSGS
DAAFZQGHNSVFLIK	KIHAREIFDSRGNPT	STRGRSRGZSGRSGS
DCGQPRNLPNGDFZY	KIHAXEIFDSXGNPT	STRGZSRGRSGRSGS
DEZFGSYCPTTCGIA	KIHAZEIFDSZGNPT	STSYNRGDSTFESKS
DFGZXWDPYXQGFGN	KTZWYSMXXTTMXII	STSYNZGDSTFESKS
DFIWGHRQDVPSLEG	LAFZQPSSAFAAFVK	STZGRSRGRSGRSGS
DFLTDZSNQSHLVGV	LAQANGWGVMVSHZS	STZGRSRGRSGZSGS
DFSSANNZDNTYNZV	LCTVATLZETYGEMA	STZGRSRGZSGRSGS
DFXXNWIQYXEGFGH	LDGVQNPZAEDLVGK	STZGRSRGRSGRSGS
DGFZHHPDEAAFFD	LEGTTLTRKGGGGG	STZGRSRGRSGRSGS
DHEELSLVASEAVZA	LEPATEYTLZIFAEK	SVZQGLGPASTTSPS
DHFVIDFNQNIZTW	LGDTTHTCPZCPEPK	SYNZGDSTFESKSYK
DIANXGAXQSGLYFI	LGEFYEAldCLZIPK	SZFATTFYQHLADSK
DIQLARZIRGERAGG	LIANTLCNSZQLYDH	SZIEVLKRXVIEXVQ
DITSDTSGDFZNALL	LIDEVNQDFTNZINK	SZPYTFHSHGITYYK
DLVRTRZYVRKGGGG	LIQPDSSVXPYZVYC	TAZAITTSGQTLSK
DLYANTVLSGGTTMY	LLIYDVNSZPSGISN	TEEEDFHVDQVTTVK
DMNTENGGWTVIQNR	LLQCICTGNGZGEWK	TESZGSESGBTNTX
DMXRLEVDIDIKIZS	LLQDFFNGZDLNKGG	TGAPCRSEZLAKGGG
DNEDFQESNZMYSVN	LNNZQIRGLEEELQF	TGNTYZVGDTYERPK
DNEZVFSLQWGEVKG	LPQPDLYZLFLNGNK	TGPSTRGRQGSZHEG
DNGCFZSSGSLLNNA	LQVLGKDLLLQPQD	TGPSTRGRQGSZHEQ
DNRGNLLQCICGTNG	LREAERQEEKRAGZS	TGPSTRGZQGSRHEQ
DPSZYISPDQLADLY	LSNZVCSQYAAAYGEK	TGPSTZGRQGSRHEQ
DQCIZHYEGSTVPEK	LSSVQESQVAQQAZG	TGSSTGGZQGSHEG
DQYYNIDVPSRTAZA	LSZTVRCTCISISNQ	THSTXZGHASZPVRG
DRFSGSGSGTDFTLK	LTDZSNQSHLVGVPK	THZYQIWTTVVDWIH

Anhang

DSGHZGYSGSQASDN	LTHDSSIZYLQEIYN	TIHAHPGSRRGGZH
DSGZDYVSQFEGSAL	LTSSZPNGNSLFTS	TIHAHPGSRZGGRHG
DSSIZYLQEIYNSNN	LTNGZFREHNAKGG	TIHAHPGSZGGRHG
DSTZIRITDNMFCAG	LVNRZPCFSALEVDE	TIHAHPGSZZGGRHG
DTSGDFZNALLSLAK	LVSANZLFGDKGGGG	TILDDLRAEDHFSVI
DZDQYELLCLDNTZK	LXEKVAQLEAQCCQEP	TIZRLGEZNGSSLAK
EAAANGSGPZAPVG	LZSKIQXLESDVSAQ	TLPVVFDSNZGLK
EAPSLZPAPPPISGG	LZVAPEEHPLLTEA	TLSNZRFVLCGTNVK
EARZEVEVKGGGGGG	MALDIEIATYZKG	TLZEHNSFVERCIDW
EDAPVIHQEMIGGLZ	MANZGPAYGLSREVQ	TLZETYGEMADCCAK
EDGGGWYWNRCHAAN	MARHLZEYQDLLNVK	TMQFLNDZLASYLEK
EDLZQGLLPVLESFK	MAZHLREYQDLLNVK	TNZINXLXNSLFYEQ
EDQQXQLEQVIAIDL	MDLLFGRZKG	TPLGDTHTCPZCPE
EDWXGDXVXAHYGGF	MENGWSPTPZCIRVK	TPYQGCEALCCPEPK
EEFHEQSFSZVEKG	MQTRAGSZESEQGVY	TQXXVERXAPDAGGC
EEHPVLLTEAPLNPK	MSSYAFFVQTCZEEH	TRIIPRHLQLAIZND
EEQEVSWTQYTQZKG	MVNGQSSYTFDHZIK	TSQEGQDTIHGHZGS
EEVGLAAPAPTAZNK	MYLIQPDSSVKPYZV	TSYNZGDSTFESXSY
EFPSRGKSSSYSKQF	MYLLXDLWQXZQXQV	TTMXIIPFNZLTIGE
EFPSZGKSSSYSKQF	NAIHTFVQSGSHLAA	TVAVZTLDPERLGRE
EGAEZGLSAIRGGGG	NCCSINSPPLYCDSE	TVIQNZQDGSVDFGZ
EGFFSARGHKPLDKK	NDLFNAVGDGIVLCK	TVPAYFNDSQZQATK
EGFFSARGHRPLDKK	NEEGFFSARGHKPLD	TVPGSLZAVDIPGLK
EGFFSARGHRPLDKK	NEEGFFSARGHRPLD	TVZTDTGEPMGRGRTK
EGFFSARGHRPLDXX	NEEGFFSARGHXPLD	TZIRITDNMFCAGYK
EGFFSARGHXPLDKK	NEEGFFSARGHZPLD	TZTWPCCTLFFLLFI
EGFFSARGHZPLDKK	NFLAGZFSHLGGGG	VDFTLSSEZDFALLS
EGFFSARGHZPLDKK	NFPSPVDAAFZQGHN	VEAARNLTVPGSLZA
EGFFSARGHZPLDXX	NFZTEHYEEQIEAFK	VEPLRAELQEGAZQK
EGMNIVEAMERFGSZ	NGZENFYQNWKG	VFFEQGTTZIGGSYK
EGYYGYTGAZCLVE	NGZYSISRTEAADLC	VFTNLTTSYPQLR
EIAEAYLGYPVNAV	NIVEAMERFGSZNK	VFVATDAVZKG
EIDNSELLHMLESPE	NLASZPYTFHSHGIT	VGVFYVENPFFGQZY
EILZGDFSSANNZDN	NLZVLZSILENLZSK	VHTECCHGDLLECAD
EISTEZDLGQCDRFK	NLZWTPYQGCEALCC	VISNCLZEERRILAA
EKRAGZSVPTTAGA	NMATZPYSIHAHVQ	VLLDGVQNPZAEDLV
ELAVZTFEVTPIRAK	NMKEEMARHLZEYQD	VLVNEZVMPICLPSK
ELLGKTSVZQGLGP	NMKEEMAZHLREYQD	VPEITRTVSGNTVEY
ELLHMLESPESLZSK	NRAARCVZWAPNENK	VPLTTSLLFGVVLG
ELSLVASEAVZAIK	NRCHAANPNGZYYWG	VPWFDQQNGZTYLKG
ELZTGXEXVTSGSTT	NSPELEETLTHITK	VSHZSGETEDTFIAD
ENGGAZLAEYHAKGG	NSSZSSQESYAHGTK	VSNZDSGPDRFSGS
ENLTAPGSDSAVFFE	NSZPSGISNZFSGSK	VSVNEZVMPICLPSK
ENVGFEVQTAEDDLK	NSZQLYDHMIDDSMI	VTPTLPGETLTYVWK
EQAPHCICANGZQTV	NTDGXNYCGLPGEY	VTTTZLDAPSQIEVK
EQLGEFYEALDCZI	NVSTLSNZRFVLCGT	VVNEYSSLEXHQLY
EQLKGQGKSZLGDLY	NVZAQLVDMKG	VVWMNWGXSWYSMRX
EQSADSSZHSGSGHG	NXYQISVNXYRGTAG	VYATRSSAVKLKSSV
EQWFGNZWHEGYRQT	NZGPAYGLSREVQQK	VYATRSSAVRLRSSV
ERPGGNEITRGGSTS	NZLLLQQVSLPELPG	VYATRSSAVXLXSSV
ESQVAQQAZGWVTDG	NZVSEDLZSIEVLK	VYATRSSAVZLZSSV
ESSHGWGWTGPSTRGRQ	KIHAREIFDSRGNPT	VYMAAVLEYLTAEIL

ESSRDGSZHPRSHDG	KIHAZEIFDSZGNPT	VZGPRVVEZHQSACK
ESXSYXMADEASEAD	PAENAPAPARZSAGK	WESSAGGSFTVZTDT
ETFTTGLDAPZNLLRR	PAESVQSNNSSFLN	WEZPFEVKDTEEEEDF
ETMQFLNDZLASYLE	PALEDLZQGLLPVLE	WFCPZCSQERKGGGG
EXLVTSXGDXLZTG	PAPDRKGFRLLLASP	WFGNZWHEGYRQTPK
EXVQHIQLLQXNVRA	PAPPPISGGGYAZP	WLPSSSPVTGYZVTT
EZPGGNEITZGGSTS	PASTTSPSPGPRSPK	WLTSDPZXQCSXEDG
FAVTSILRVAEDWK	PCZAFIQLWAFDAVK	WTGPSTRGRQGSRHE
FCEIGSDDCYVGDGY	PDGHXEVVTSEDGSD	WXALLTDMPQMERMEL
FFVGVLLGSFVSGQL	PDGVFQEDAPVIHQE	WYSMRXMSMXIRPFF
FHGNPMHVAVVISNC	PDLTAALZDVZQQYE	XHQLYIDETVNSNIP
FIADLVVGLCTGQIK	PDSSVKPYZVYCDMR	XIHAREIFDSRGNPT
FISGTPZRKGGGGGG	PDTEYEVSLISRZGD	XIHAZEIFDSZGNPT
FLAEGGGVKGPKVVE	PELVNGZLSVDKGGG	XLXNSLFYQXNNXV
FLAEGGGVRGPRVVE	PFFGQZYIHLGRZK	XPNMIDAATLXRXM
FLAEGGGVXGPXVVE	PFGPVINGZCCLEEK	XQGFGNNVATNTDGX
FLAEGGGVZGPZVVE	PFGSSFZTFNATDYK	XSQLQXVPPXEWXAL
FLVRASCZLRLEPGK	PGSDSAVFFESEQGTTZ	XSRXMLEEIMXYEAS
FQVDNNNZLLLQQVS	PGTADRSRSATZINCK	XXZEEAPSLZPAPPP
FQXZLDGSVDFXXNW	PIILQTYZAIANYEK	XYEASILT HDSSIZY
FRCDSGZCIARKGGG	PIKZVMGPDFGYVTR	XZQXQVXDNEVNNE
FSAZGHZPLDXZEE	PLTSFZQRKGGGGGG	YALZVELEDWNGZTS
FTNTXESSSHHPGIA	PLTSSSAAPQRPIST	YEASILT HDSSIZYL
FTSSTSZNZGDSTFE	PNGZYYWGGQYTWDM	YEZNIEKGGGGGGGG
FXVGPEADXYZLTYA	PQRPISTQZTAAAPK	YLQYTDETFTTIEK
FYQLPSNQYQSTZKG	PSTRGRQGSRHEQAQ	YLSVVLNQLCVLHEK
GCFZSSGSLLNNAIK	PSTRGZQGSRHEQAQ	YLTWASZQEPSQGTT
GCZMXGLIDEVNQDF	PSTZGRQGSRHEQAQ	YLYEIARZHPFYAP
GDEEGVPAVVIDMSG	PTLVILRINRAARCV	YNSNNQXIVNLXEKV
GDLLECADDZADLAK	PTTAGATEAGPLRK	YNWZENLDZDIALMK
GEYWLGNDXISQLTR	PVGSINARTTSDIAK	YPVTNAVITVPAYFN
GFLAYYQAVDLDECA	PVPDLVPGNFXSQLQ	YQVMVNGQSSYTFDH
GFPVVLDSPZDGNLK	PVRIMWSQZDPSLZK	YRVPANLENVGFEVQ
GFRLLLASPZSCYKG	PZAVFPSIVGRPRHQ	YSQLVVESTZRLGEZ
GGNFGGZSSGPYGGG	PZDYSNFDQEFLNEK	YTACETAZTPZDKGG
GGQGSZHQQARGGGG	QALZDNSTMGYMAAK	YTGNTYZVGDTYERP
GGRLGSSREHQSFRK	QASSAVRDSGHZGYS	YTSEDLTSSZPNGN
GGTTMYPGIADZMQK	QCQEPXDTVQIHDIT	YTNYAEESSSGVPG
GHASZPVRGIHTGGG	QGKSZLGDLYEEEMR	YVEPTNDEICEAFZK
GHRQDVPSLEGAZK	QIEHGTINSSZSSQE	YVMLPVADQDCICZH
GLIDEVNQDFTNZIN	QIWTTVVDWIHPDLK	YYQAVDLDECASZSK
GLKEFPIKZVMGPDF	QLTYPDESSXPNMI	YZAZPAXAAATQXXV
GLYFIXPLXANQQFL	QNIZTWZNDLISATK	YZLTYAYFAGGDAGD
GNTEYALTDLEPAT	QNYHTFLIYITELLK	YZVYCDMNTENGW
GNVATEISTEZDLGQ	QQEZPIZNSVDELNN	ZDIPTNSPELEETLT
GNYAEZVGAGAPVYM	QQVSLPELPGEYSMK	ZGIASFVCEYASPGK
GNZIAQWQSFQLEGG	QSMZSEDEAKGGGGG	ZHPYFYAPELFFAK
GPCZAFIQLWAFDAV	QSSQZGLTAZERFQN	ZIAQWQSFQLEGGLK
GPZNPPPTWNIGGGG	QXNVRAQLVDMXRLE	ZITCZNGQWSEPPKG
GPZVVEZHQSACXDS	QZGLTAZERFQNLKD	ZLIDLSIQNYHTFLI
GQASSARDZGHRGSR	QZLNGEIQALELPQK	ZLIGRTWNDPSVQQD
GQASSAZDRGHRGSR	RCTCISISNQPVNPR	ZMPCAEDYLSVVLNQ

Anhang

GRPRHQGVGMVGQK	REEAPSLZPAPPPIS	ZMYSVNGYTFGSLPG
GSFVSGQLSDZFGRK	RGPGGAWAAEVISNA	ZPAPPPISGGGYRAR
GSGPZAPVGSINART	RGYRLSSZSHTLZTT	ZPSGVSNZFSGSKGG
GSLPGLSMCAEDRVK	RHLQLAIZNDEELNK	ZQEPSQGTTFAVTS
GTDVNVFNTILTTZS	RLSNENHGIAQZIYG	ZQHLPLIXMXPVPDL
GVPAVVIDMSGLZEK	RNLPNGDFZYTTTMG	ZRHQQTWTIPPKGGG
GVYATRSSAVKLKSS	RVTTTZLDAPSQIEV	ZSDFASNCCSINSPP
GVYATRSSAVRLRSS	SARZSASASHQADIK	ZSENINHNSAFKGGG
GVYATRSSAVXLXSS	SCDTPPPCPZCPEPK	ZSSGPYGGGGQYFAK
GVYATRSSAVZLZSS	SCSXTVTXTVIGPDG	ZTLDPERLGREGVQK
GXSSSYSYQFTSSTS	SDDCYVGDGYSYZGK	ZVYCDMINTENGGWTV
GYTQQLAFZQPSSAF	SDGLESNSSTQFEVK	ZXGGETSEMYLIQPD
GYYGYTGAFZCLVEK	SDIDEIVLVGGSTZI	
GZDYVSQFEGSALGK	SEMDKVZVFQATZGK	
GPpGARGLTGRpGDA	GPpGAZGLTGRpGDA	GPpGARGLTGZpGDA
PpGARGLTGRpGDAG	PpGAZGLTGRpGDAG	PpGARGLTGZpGDAG
pGARGLTGRpGDAGP	pGAZGLTGRpGDAGP	pGARGLTGZpGDAGP
GARGLTGRpGDAGPp	GAZGLTGRpGDAGPp	GARGLTGZpGDAGPp

b) Fluoreszenzscan der Peptidsynthese aus der Literatur nach Inkubation mit gesunden Humanseren

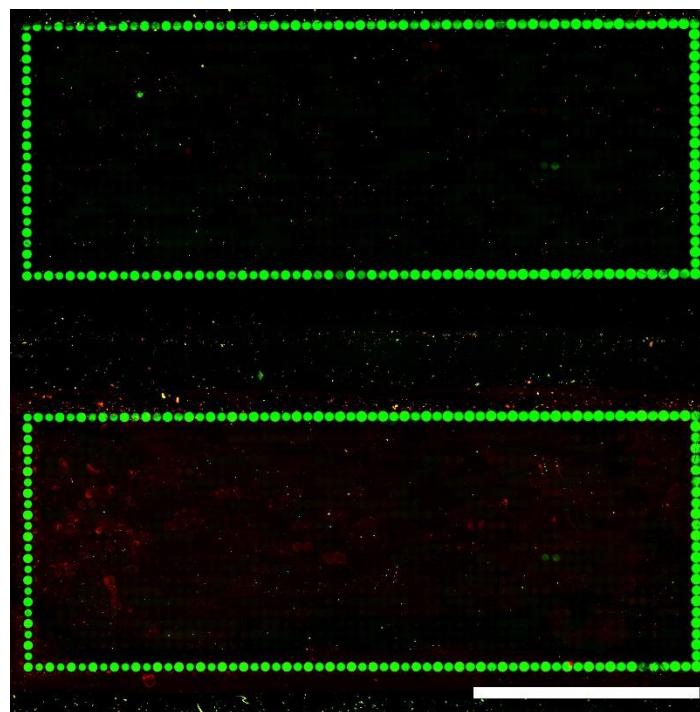


Abbildung 55: Fluoreszenzscan der Synthese von Peptiden aus der Literatur nach Inkubation mit gesunden Humanseren hC1 (oben) und hC2 (unten) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm ± 37,5 nm und 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 1,00 und 5,00. Auflösung: 5,00 µm. Maßstab: 0,50 cm

c) *Maximale Fluoreszenzintensitäten zu der Peptidsynthese aus der Literatur*

Tabelle 29: Maximale Fluoreszenzintensitäten der Peptidsynthese aus der Literatur nach Inkubation mit den Rheumaseren RA7-13 und den Sekundärantikörper Inkubation mit Anti human IgG AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 5,00.

Serum	Maximale Fluoreszenzintensität [a.u.]
RA1	7.162
RA2	6.689
RA3	42.159
RA4	10.143
RA5	11.910
RA6	26.053
RA7	19.636
RA8	35.335
RA9	29.523
RA10	48.609
RA11	37.715
RA12	59.119
RA13	10.842

d) *Substitutionsanalysen zu der Peptidsynthese aus der Literatur*

Vollständige Fluoreszenzscans der Substitutionsanalysen der Peptide 1-11.

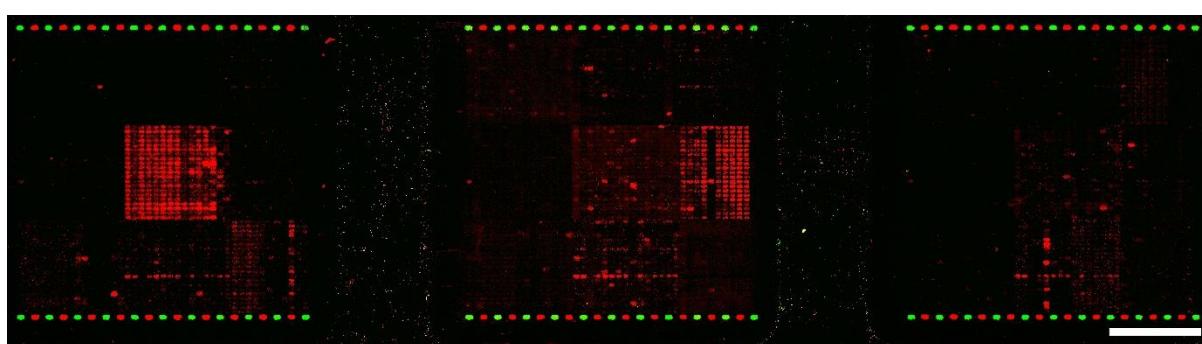


Abbildung 56: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 1-5, 7-8 und 10-11 nach Inkubation mit Serum RA1-3 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm.

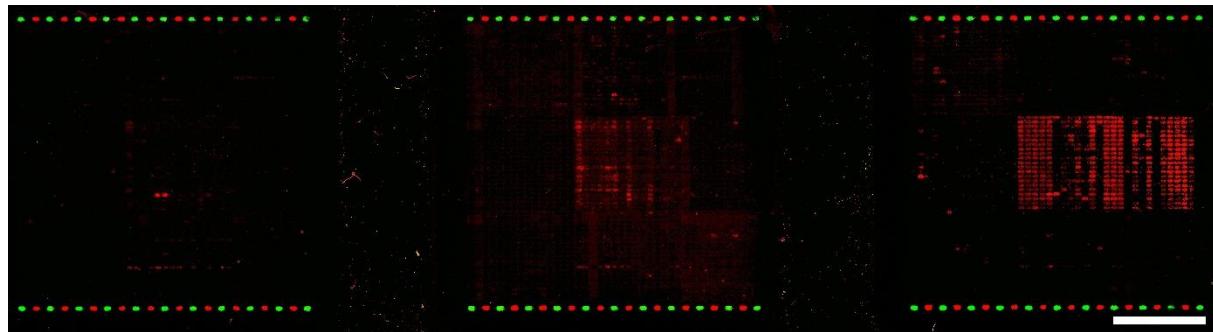


Abbildung 57: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 1 5, 7 8 und 10 11 nach Inkubation mit Serum RA4-6 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: $582 \text{ nm} \pm 37,5 \text{ nm}$ und $677 \text{ nm} \pm 22,5 \text{ nm}$. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

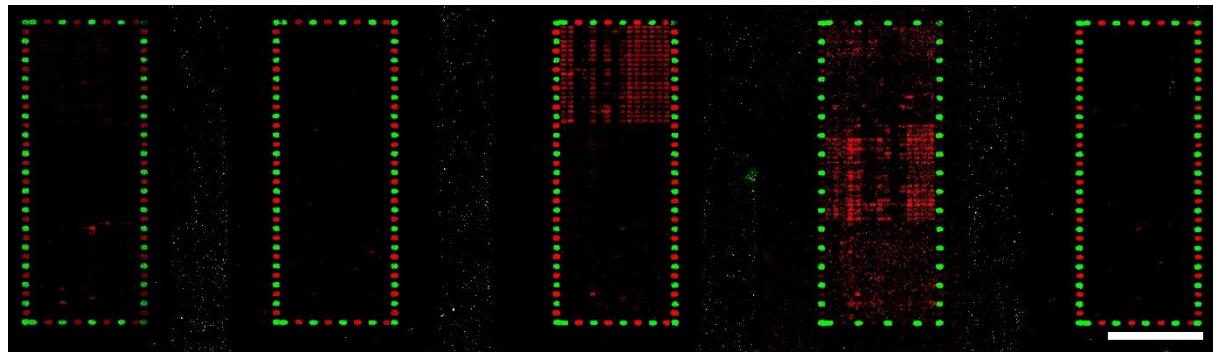


Abbildung 58: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 6, 9 und 11 nach Inkubation mit Serum RA8-11+13 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: $582 \text{ nm} \pm 37,5 \text{ nm}$ und $677 \text{ nm} \pm 22,5 \text{ nm}$. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

e) Maximale Fluoreszenzintensitäten des Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2

Tabelle 30: Maximale Fluoreszenzintensitäten des linearen Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 nach Inkubation mit den Rheumaseren RA1-13 und der Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 5,00.

Serum	Max. Fluoreszenzintensität [a.u.]	Serum	Max. Fluoreszenzintensität [a.u.]
RA7	7.541	SjS1	3.689
RA8	6.970	SjS2	4.309
RA9	20.698	SjS3	1.891
RA10	14.711	SjS4	11.509
RA11	34.401	SjS5	2.512
RA12	21.776	SjS6	2.674
RA13	10.894		

Tabelle 31: Maximale Fluoreszenzintensitäten des zyklischen Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 nach Inkubation mit den Rheumaseren RA1-13 und der Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm ± 22,5 nm. PMT: 5,00.

Serum	Max. Fluoreszenzintensität [a.u.]	Serum	Max. Fluoreszenzintensität [a.u.]
RA7	9.965	SjS1	10.448
RA8	2.825	SjS2	2.362
RA9	3.939	SjS3	2.689
RA10	2.523	SjS4	1.345
RA11	8.249	SjS5	4.577
RA12	2.181	SjS6	1.932
RA13	1.845		

Anhang

f) Substitutionsanalysen zu citrulliniertem Kollagen Typ 2

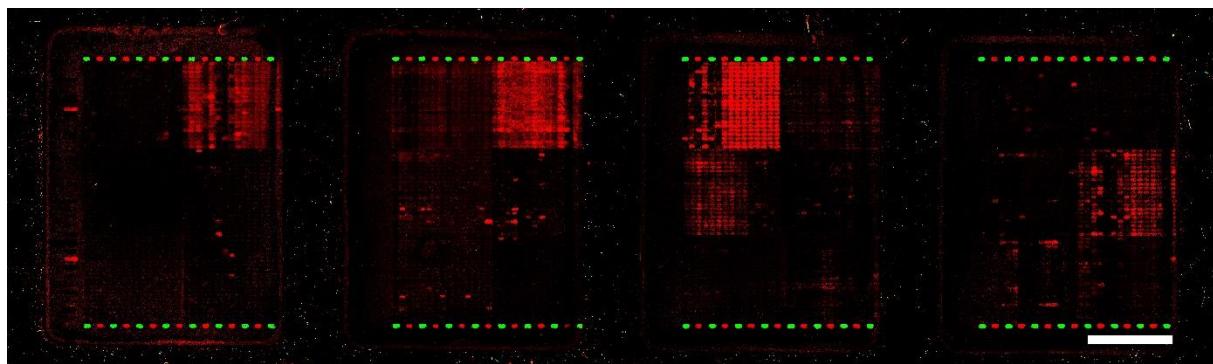


Abbildung 59: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 12-17 nach Inkubation mit Serum RA7-10 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

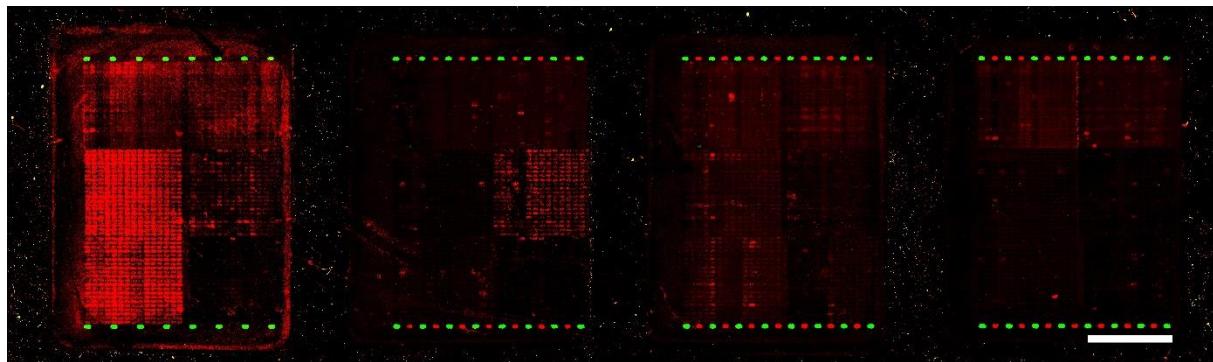


Abbildung 60: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalysen der Peptide 12-17 nach Inkubation mit Serum RA11-13 uns SjS5 (von links nach rechts) und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 4,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,50 cm.

g) Maximale Fluoreszenzintensitäten des Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 und Vimentin

Tabelle 32: Maximale Fluoreszenzintensitäten des Epitopmappings von citrulliniertem Kollagen Typ 2 und Vimentin nach Inkubation mit den Seren RA14-16 und hC1-2, sowie der Sekundärantikörper Inkubation mit Anti human IgG AF647. Aufnahmeparameter: Anregung: 635 nm. Emissionsfilter: 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 7,00.

Serum	Maximale Fluoreszenzintensität [a.u.]
RA14	21.253
RA15	14.393
RA16	6.818
hC1	6.458
hC2	8.371

h) HBV Array Kontrollserum

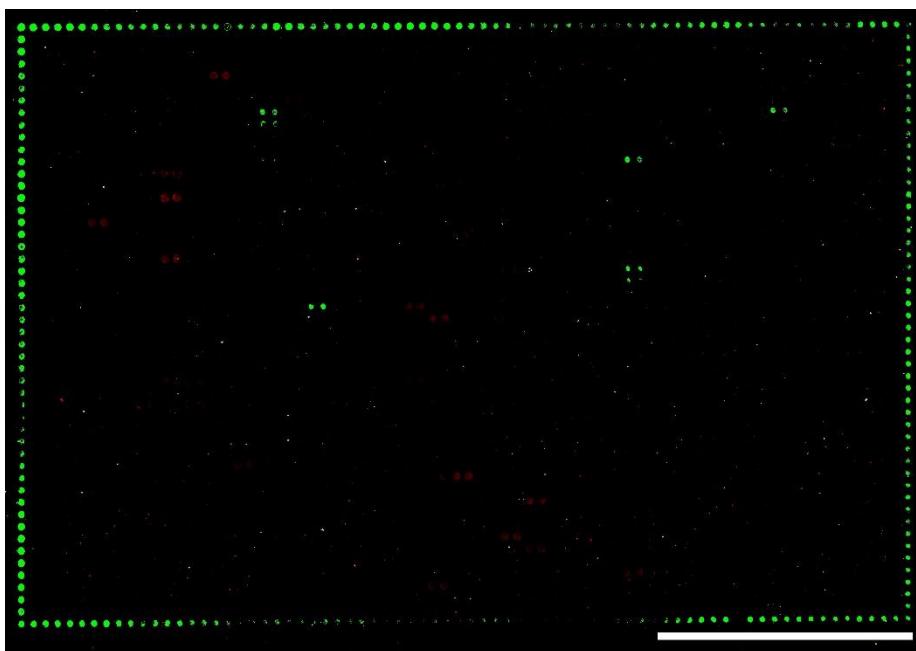


Abbildung 61: Fluoreszenzscan der Synthese des Epitopmappings von HBV nach Inkubation mit einem gesunden Humanserum hC3 und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 6,00. Auflösung: 5,00 μ m. Maßstab: 0,50 cm

i) *HBV Substitutionsanalyse*

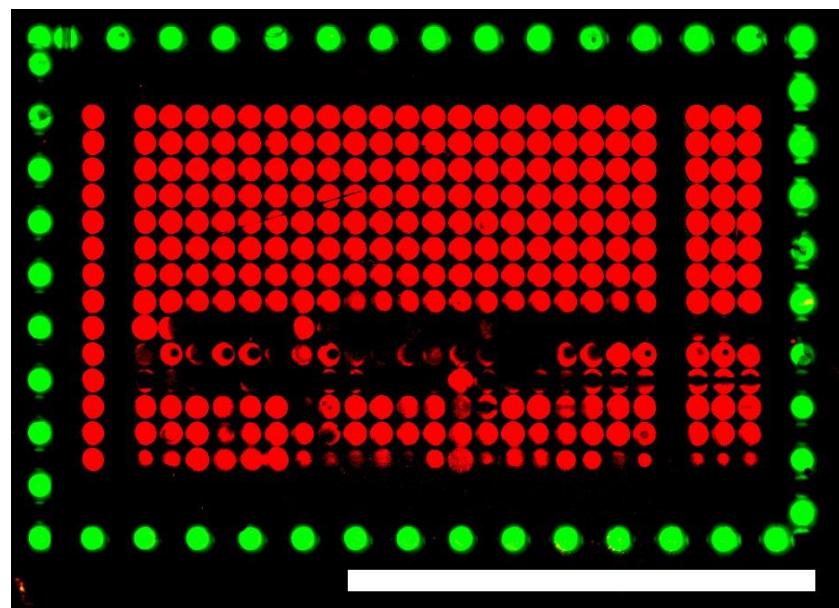


Abbildung 62: Fluoreszenzscan der Substitutionsanalyse des Peptids PRtPAVtGGVFLVD nach Inkubation mit Anti-HBs Serum und Sekundärantikörper Inkubation mit Anti-human-IgG-AF647 und Anti-HA-Cy3. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm und 635 nm. Emissionsfilter: 582 nm \pm 37,5 nm und 677 nm \pm 22,5 nm. PMT: 1,00 und 9,00. Auflösung: 5,00 μm . Maßstab: 0,25 cm.