

INAUGURAL- DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen - Mathematischen - Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Ines Block

aus Bremerhaven

Tag der mündlichen Prüfung:

Herstellung und Anwendung
von
hochkomplexen Peptidbibliotheken

Gutachter: PD Dr. F. Ralf Bischoff

Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Herstellung und Anwendung von hochkomplexen Peptidbibliotheken“ selbständig verfasst sowie die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Ines Block

Heidelberg, im Februar 2009

Kurzfassung

Die Fähigkeit von Proteinen physische Interaktionen mit anderen Proteinen und Biomolekülen einzugehen bildet eine wichtige Grundlage ihrer Funktion im menschlichen Organismus. Störungen in diesen Interaktionen können Fehlfunktionen in den beteiligten Signal- oder Stoffwechselwegen hervorrufen und letztlich zu Krankheit und Tod führen. Für das molekulare Verständnis der beteiligten Prozesse ist es wichtig, die Protein-Interaktionen im Detail zu studieren. Neben genetischen, zellbiologischen und komplexen biochemischen Ansätzen gewinnen Array-basierte Verfahren zur systematischen Suche nach Protein-Interaktionspartnern zunehmend an Bedeutung. Die Nutzung von entsprechenden Protein- und Peptid-Arrays wird derzeit aber noch durch deren schlechte Verfügbarkeit erschwert. Peptidarrays, die sich hervorragend für die Hochdurchsatzsuche nach Agonisten und Antagonisten und somit für die Entwicklung von peptidischen Wirkstoffen eignen, werden bis dato kommerziell nach dem etablierten SPOT-Verfahren mit Arraydichten von 25 Peptiden pro cm^2 gefertigt. Um die Komplexität der Peptidarrays zu steigern und die hohen Kosten der Peptidsynthese zu senken, wurde in der Arbeitsgruppe *Chipbasierte Peptidbibliotheken* (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg/Deutschland) eine neue Synthesetechnik entwickelt. Dieses Verfahren beruht auf Aminosäurepartikeln, in deren Matrix die Aminosäuren für die kombinatorische Peptidsynthese eingebettet sind. Die Partikel werden mit einem modifizierten Laserdrucker oder durch Einsatz von speziellen Mikrochips an die Syntheseorte auf dem Array gebracht. Anschließend wird der Träger erhitzt, wodurch sich die Partikelmatrix verflüssigt und die Kopplung der Aminosäuren an den Träger initiiert wird. Durch wiederholtes Ablagern, Koppeln und Waschen können die gewünschten Peptidbibliotheken kombinatorisch erzeugt werden. Die Methode übertrifft den Stand der Technik bezüglich ihrer Komplexität mit bis zu 400 Peptidspots/ cm^2 für den Laserdrucker und mit 10.000 - 40.000 Peptidspots/ cm^2 für den Mikrochip um ein Vielfaches und das bei deutlich geringeren Herstellungskosten.

Vor der Etablierung der Synthesemethode und der breiten Nutzung der „gedruckten“ Peptidarrays sollten diese zunächst im Rahmen meiner Arbeit umfassend charakterisiert werden. In biologischen, medizinischen und biotechnologischen Modellanwendungen sollte zudem die Verwendung der Peptidarrays als funktionelles Werkzeug getestet werden.

In Phosphorylierungsexperimenten wurden Substratpeptide unterschiedlicher Kinasen, darunter die cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) und c-Src, kombinatorisch synthetisiert und auf dem Array phosphoryliert. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde durch die PKA primär die Serin-Seitenkette phosphoryliert, wenn diese in der Erkennungssequenz RRXS (X = variable Aminosäure) vorlag. Durch diesen Versuch wurde die Anwendbarkeit der mit Hilfe von festen Aminosäurepartikeln synthetisierten Peptidarrays zur Identifizierung von spezifischen Proteinkinasesubstraten belegt.

Die Experimente zur Suche nach katalytisch aktiven Peptiden beruhten auf Studien von *Berkessel et al.* die komplexbildende Peptide und Peptidderivate identifiziert hatten, welche die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern katalysieren. Trotz umfangreicher Versuche konnten diese Ergebnisse allerdings nicht auf die von uns synthetisierten Peptidarrays übertragen werden. Die durch die hydrolytische Spaltung entstehenden gefärbten Reaktionsprodukte konnten nicht eindeutig

nachgewiesen und damit eine katalytische Aktivität der metallhaltigen Peptidderivate nicht belegt werden.

In einem weiteren Modellversuch wurde nach metallbindenden Peptiden gesucht, die bspw. in der Nuklearmedizin eingesetzt werden können. Viele Radiopharmazeutika enthalten das metastabile ^{99m}Tc , das als metallorganischer Komplex an ein bioaktives Molekül zur Erkennung einer Zielstruktur gebunden ist. Um $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -bindende Peptide zu identifizieren, wurde ein Hexapeptid-Array mit 133.224 individuellen Peptidspots ($\text{XAs}_1\text{As}_2\text{As}_3\text{As}_4\text{X}$; X= Aminosäuregemisch) auf einer chemisch modifizierten Glasplatte ($21 \times 22 \text{ cm}^2$) unter Verwendung des Peptidlaserdruckers hergestellt. Die Peptidbibliothek wurde nach $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ - und - als Kontrolle - nach $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ -bindenden Peptiden durchsucht. Mit der Einschränkung, dass in der ersten und letzten Position der identifizierten Hexapeptide noch ein Gemisch von Aminosäuren vorliegt und eine abschließende Verifizierung der Resultate (z.B. HPLC) noch aussteht, wurden Peptidkandidaten bestimmt, die den Technetiumcarbonylkomplex stabil binden. Die Untersuchungen unterstreichen das Potential der „gedruckten“ Peptidarrays als Werkzeug zur Identifizierung von medizinisch relevanten Metall-Peptid-Komplexen.

In einem weiteren Projekt wurde die grundsätzliche Realisierbarkeit der kombinatorischen Peptidsynthese auf einem Mikrochip anhand einfacher immunologischer Anwendungen dokumentiert.

Summary

Proteins ability to physically interact with other proteins or biomolecules provides the essential basic of protein function in human organisms. Interferences of these interactions can result in male-function of engaged signal transduction and metabolic pathways finally causing diseases and death. Protein interactions have to be studied in detail to understand molecular basis of involved processes. In addition to genetic, cell biological and complex biochemical approaches array-technologies become more important for systematically identification of protein interaction partners. Usage of such protein and peptide arrays is still limited by low availability. Peptide arrays, which are appropriate tools for high-throughput-screenings of agonists and antagonists and therefore for development of drugs, are commercially generated by established SPOT-synthesis techniques resulting in array densities of 25 peptides per cm². Therefore, at the German Cancer Research Center (Heidelberg/Germany) a novel method was developed to synthesise peptide arrays with higher complexities and low expenditures of time and material resulting in significant reduced manufacturing costs. This technique is based on solid amino acid particles whereby the particles consist of one pre-activated L-amino acid and several other additives embedded in a solid matrix. These particles can be addressed to defined reaction regions of a solid supports by either a custom-built laser printer or specific microchips. Afterwards by heating the support the particle matrix liquefies and initiates coupling of the amino acids onto chemical modified supports. Repetitive addressing, coupling and washing cycles finally result in the combinatorial synthesis of a peptide array. This novel method outperforms established synthesis techniques regarding their complexity of 400 peptide spots per cm² in case of laser printing and 10,000 – 40,000 peptide spots using the microchip approach whereby production costs were minimized.

Prior to establishing this novel synthesis method peptide arrays should be comprehensively characterized and usefulness evaluated in different model applications.

Specific peptide substrates of different kinases e.g. cAMP-dependent protein kinase (PKA) and c-Src were combinatorially synthesized and phosphorylated. In accordance with literature the specific phosphorylation of serine embedded in the recognition sequence RRXS (X = variant amino acid) by cAMP-dependent protein kinase could be detected. This example proofed the usefulness of the novel peptide array synthesis using solid amino acid particles for the identification of specific kinase substrates.

Experiments for the identification of catalytic active metallopeptides are based on results achieved by *Berkessel et al.*, who identified specific metal-peptide complexes and metal binding peptide derivates catalyzing hydrolytical cleavage of phosphate esters and phosphodiesteres. Despite intensive experiments all attempts were in vain to apply this approach to the synthesized peptide arrays. The stained reaction products were not detected unambiguously, which is why specific catalytic activity of tested metallopeptides could not be verified.

Further model approaches yield in identification of metal binding peptides, which can be used in nuclear medicine. Radiopharmaceuticals often contain the metastable ^{99m}Tc bound to a bioactive molecule as organometallic complex, which recognizes a target structure. For the identification of new [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-binding peptides, a hexapeptide library with 133,224 peptide

spots was generated on a chemically modified glass support (21 x 22 cm) with the laser printer. Although the first and last amino acids of the hexapeptides were not identified and final verification of results (e.g. HPLC) is not completed by now, specific peptide candidates were identified, which bind [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ or -as a matter of reference- $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ under given reaction conditions. The results provide evidence for the usefulness of our new peptide arrays synthesized via a laser printer for the development of medical relevant metal-peptide complexes.

In a further proof-of-concept experiment the essential feasibility of combinatorial synthesis on a microchip was documented by simple immunoassaying.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	IV
Kurzfassung	V
Summary	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Peptidsynthese an festen Phasen	1
1.1.1 Aktivierungsreagenzien	4
1.1.2 Linker, Spacer und Capping-Schritte	6
1.2 Herstellung von Peptidbibliotheken	7
1.2.1 Photolithographie	9
1.2.2 Split-Mix-Synthese	10
1.2.3 Die SPOT-Synthese	11
1.2.4 Peptidsynthese mit Hilfe fester Aminosäurepartikel	12
1.2.4.1 Die Aminosäurepartikel	14
1.2.4.2 Die Oberflächenmodifikation	15
1.2.4.3 Der Peptidlaserdrucker	17
1.2.4.4 Mikrochips	18
1.3 Anwendung von Peptidbibliotheken	20
1.3.1 Proteinkinase-Assay	21
1.3.1.1 Struktur und Regulierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase	23
1.3.2 Metallopeptide	24
1.3.2.1 Katalytische Metallopeptide und -peptidderivate	25
1.3.2.2 Nickel-bindende Peptide	25
1.3.2.3 ^{99m} Tc-Technetium-bindende Peptide	26
1.4 Zielsetzung	30
2 Ergebnisse und Diskussion	31
2.1 Ergebnisse – Proteinkinase-Assay	31
2.1.1 Etablierung eines Modellsystems	31
2.1.1.1 Alternative Detektionsmethoden	33
2.1.1.2 Einfluss von Linkern und Blockierungsreagenzien	34
2.1.2 Kinase-Assay mit kombinatorisch synthetisierten Peptiden	36
2.1.2.1 Optimierung des Waschprotokolls	37
2.1.2.2 Optimierung der Kopplungsausbeuten	38
2.1.2.3 Optimierung des Kinase-Assays	41
2.1.2.4 Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der PKA	42
2.1.3 Identifizierung spezifischer Kinasesubstrate innerhalb eines kombinatorisch synthetisierten Dekapeptid-Arrays	43
2.1.3.1 Vorversuch zum Einsatz von PEGMA/MMA-Polymerfilmen	45
2.2 Proteinkinase Array - Diskussion	47
2.3 Katalytische Peptide und Peptidderivate - Ergebnisse	49
2.3.1 Katalytische Peptide	49
2.3.2 Katalytische Peptidderivate	50
2.4 Katalytische Peptide und Peptidderivate - Diskussion	54
2.5 Metallopeptide - Ergebnisse	55
2.5.1 Ni(II)-bindende Peptide	55
2.5.1.1 Oberflächenstrukturierung mittels Perfluorierter Filme	56
2.5.2 [^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺ -bindende Peptide	61
2.5.2.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen	61
2.5.2.2 Synthese eines Peptidarrays mit 133.224 Peptidspots	63
2.5.2.3 Detektion von [^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺ -bindenden Peptidmotiven	64
2.5.2.4 Detektion von ^{99m} TcO ³⁺ -bindenden Peptidmotiven	69
2.6 Metallbindende Peptide - Diskussion	72
2.6.1 Ni(II)-bindende Peptide	72
2.6.2 [^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺ -bindende Peptide	72
2.7 Peptidsynthese auf Mikrochips - Ergebnisse	76
2.7.1 Immunologische Modellanwendung	76

2.7.2 Peptidsynthese auf Mikrochips	77
2.8. Peptidsynthese mit dem Mikrochip – Diskussion	81
3 Zusammenfassung und Ausblick	82
4 Materialien und Methoden	85
4.1 Materialien	85
4.1.1 Chemikalien	85
4.1.1.1 Produkte chemischer Synthesen	86
4.1.2 Pufferreagenzien, Antikörper, Peptide und Proteinkinasen	87
4.1.3 Generatoren und Kits	88
4.1.4 Geräte und Zubehör	89
4.2 Methoden	90
4.2.1 Bestimmung des Derivatisierungsgrades	90
4.2.2 <i>Cook</i> -Assay	90
4.2.3 Proteinbestimmung nach <i>Bradford</i>	91
4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	92
4.3 Analytik	94
5 Durchführung	97
5.1 Modifizierung der Syntheseträger	97
5.1.1 Reinigung der Oberflächen	97
5.1.2 Synthese der Polymerfilme	97
5.1.2.1 Synthese von PEGMA-Filmen mittels UV-induzierter Graftpolymerisation	97
5.1.2.2 Synthese von PEGMA-Filmen mittels ATRP	98
5.1.3 Aminoterminierung der PEGMA-Filme	99
5.1.3.1 Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-β-Alanins	99
5.1.3.2 Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-NH-(CH ₂) _n -COOH-Derivaten	100
5.1.4 Einfügen von Linkern und Anbindung von vorsynthetisierten Peptiden	100
5.1.4.1 Kovalente Anbindung des SMCC-Linkers	100
5.1.4.2 Kopplung von Cystein-terminierten Peptiden an SMCC-Oberflächen	100
5.1.4.3 Kovalente Anbindung des Rink-Amid-Linkers	101
5.1.4.4 Kopplung von Peptiden an den Rink-Amid-Linker	101
5.1.5 Oberflächenmodifikation durch Ankopplung von perfluorierten Gruppen	101
5.1.5.1 Graftpolymerisation von Heptafluoroacrylsäure	101
5.1.5.2 Kovalente Anbindung von Pentadecafluorooctanoylchlorid	102
5.1.5.3 Kovalente Anbindung von Pentafluoro-1-oktansulfonylfluorid	102
5.2 Kombinatorische Peptidsynthese	102
5.2.1 Peptidsynthese mittels Fmoc-Aminosäure-OPfp Estern aus Lösung	102
5.2.2 Synthese von Peptidbibliotheken mittels des Peptidlaserdruckers	103
5.2.3 Mikrochip-basierte Peptidsynthese	103
5.2.4 Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen	104
5.3 Bildung von katalytisch aktiven Peptidderivaten	104
5.4 Nachweis von Peptidinteraktionen	105
5.4.1 Proteinkinase Assay	105
5.4.1.1 Puffer und Reaktionslösungen	105
5.4.1.2 Blockieren mit Bovine Serum Albumin (BSA)	106
5.4.1.3 Blockieren mit nicht radioaktivem Adenosintriphosphat (ATP)	106
5.4.1.4 Phosphorylierungsexperimente	106
5.4.1.5 Nachweis mittels Pro-Q [®] Diamond Microarray Stain	110
5.4.2 Metallionen-bindende katalytisch aktive Peptide und Peptidderivate	111
5.4.2.1 BCIP-Assay	111
5.4.2.2 Berliner-Blau-Assay	111
5.4.2.3 Kresylviolett-Assay	112
5.4.3 Nachweis von Metallopeptiden	112
5.4.3.1 Nachweis von Ni(II)-bindenden Peptiden	112
5.4.3.2 Nachweis von [Re(CO) ₃] ⁺ -bindenden Peptiden	113
5.4.3.3 Nachweis von [^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺ -bindenden Peptiden	113
5.4.3.4 Nachweis von ^{99m} TcO ₃ ⁺ - und ^{99m} TcO ₄ ⁺ -bindenden Peptiden	114
5.4.4 Antikörperbindungstudien	114

5.4.4.1 Inkubation mit spezifischen und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern	114
--------------------------------------------------------------------------------------	-----

6 Literatur	115
--------------------	------------

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	122
Publikationen	125
Danksagung	126

1 Einleitung

Der Bauplan für die Herstellung spezifischer Proteine liegt in den Genen. Durch Proteinbiosynthese entstehen Polypeptide und Proteine, die sich aus den 20 verschiedenen sog. proteinogenen *L*-Aminosäuren zusammensetzen (Lehninger & Nelson, 1998). Dabei tragen die Aminosäuren innerhalb des Proteins unterschiedliche Seitengruppen, deren chemische Charakteristika in der Summe die Tertiärstruktur und damit auch die Eigenschaften des Proteins bestimmen. In vielen Fällen sind Proteine darüber hinaus durch posttranslationale Modifikationen funktionalisiert, die über deren Aktivität im Organismus bestimmen (Knippers, 2001). Proteine bestimmen unser Erscheinungsbild und beeinflussen fast alle zellulären Prozesse (Min & Mrksich, 2004; Campell, 1997). Sie fungieren z.B. als Elemente von Stützstrukturen, als Komponenten des Bewegungsapparates, als Transporteinheiten für verschiedenste Stoffwechselprodukte und erfüllen zahlreiche enzymatische Funktionen (Campell, 1997). Zudem spielen sie eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion, der Immunabwehr und in der Regulierung des Metabolismus. Um all diese Abläufe zu bewältigen und zu koordinieren, interagieren Proteine untereinander und mit verschiedenen anderen Molekülen wie z.B. RNA, Metallionen, Lipiden etc.. Kommt es zu Störungen in diesen Interaktionen, und kann kein anderes Protein die gestellte Aufgabe übernehmen, kann es zum Ausfall der betroffenen Prozesse und zur Ausbildung von Krankheiten kommen.

Nicht immer muss der Gesamtkontext des Proteins zur Ausübung einzelner Teilfunktionen gewahrt sein. In manchen Fällen können bestimmte Aspekte der Proteinfunktion auch durch kurze Peptide dargestellt werden, die nur einen Teil des Proteins repräsentieren. So kann beispielsweise eine komplexe enzymatische Umsetzung in der Regel in einzelne Teilreaktionen zerlegt werden, bei denen es zu Bindungsereignissen in unterschiedlichen Domänen des Proteins kommen kann.

In der Medikamentenentwicklung spielen im Besonderen Peptide eine Rolle die als Aktivator oder Inhibitor wirken und damit Einfluss auf die biologische Aktivität oder Funktion von definierten Proteinen nehmen (Eichler, 2005). Daher wurden in den vergangenen zwanzig Jahren verschiedene Techniken zur chemischen Synthese von Peptidbibliotheken entwickelt, die die Suche nach Peptid-Molekül-Wechselwirkungen im Hochdurchsatzverfahren erlauben (Panicker et al., 2004; Frank, 2002a).

1.1 Peptidsynthese an festen Phasen

Die Basis der chemischen Synthesetechniken zur Herstellung von Peptiden bildet die von *Merrifield* 1963 publizierte Methode zur kombinatorischen Peptidsynthese an Festphasen (Merrifield, 1963; Merrifield 1964). Dabei werden die Peptide vom C- zum N-Terminus schrittweise Aminosäure für Aminosäure aufgebaut (Abb.1). Dazu wird die am N-Terminus und an der Seitengruppe geschützte erste Aminosäure über ihre Carboxygruppe an den funktionalisierten polymeren Träger (z.B. quervernetztes Polystyrol) gekoppelt. Die Seitenschutzgruppe ist in der Abbildung 1 als blaues Rechteck, die N-terminale Gruppe als rotes Rechteck und der polymere Träger als grauer Kreis dargestellt. Im zweiten Schritt wird die N-terminale Schutzgruppe der gebundenen Aminosäure abgespalten. Daraus entsteht eine freie endständige Aminogruppe, an die die nächste Aminosäure binden kann. Die Aminosäure wird am Carboxyterminus mit Hilfe von Kopplungsreagenzien (z.B. als

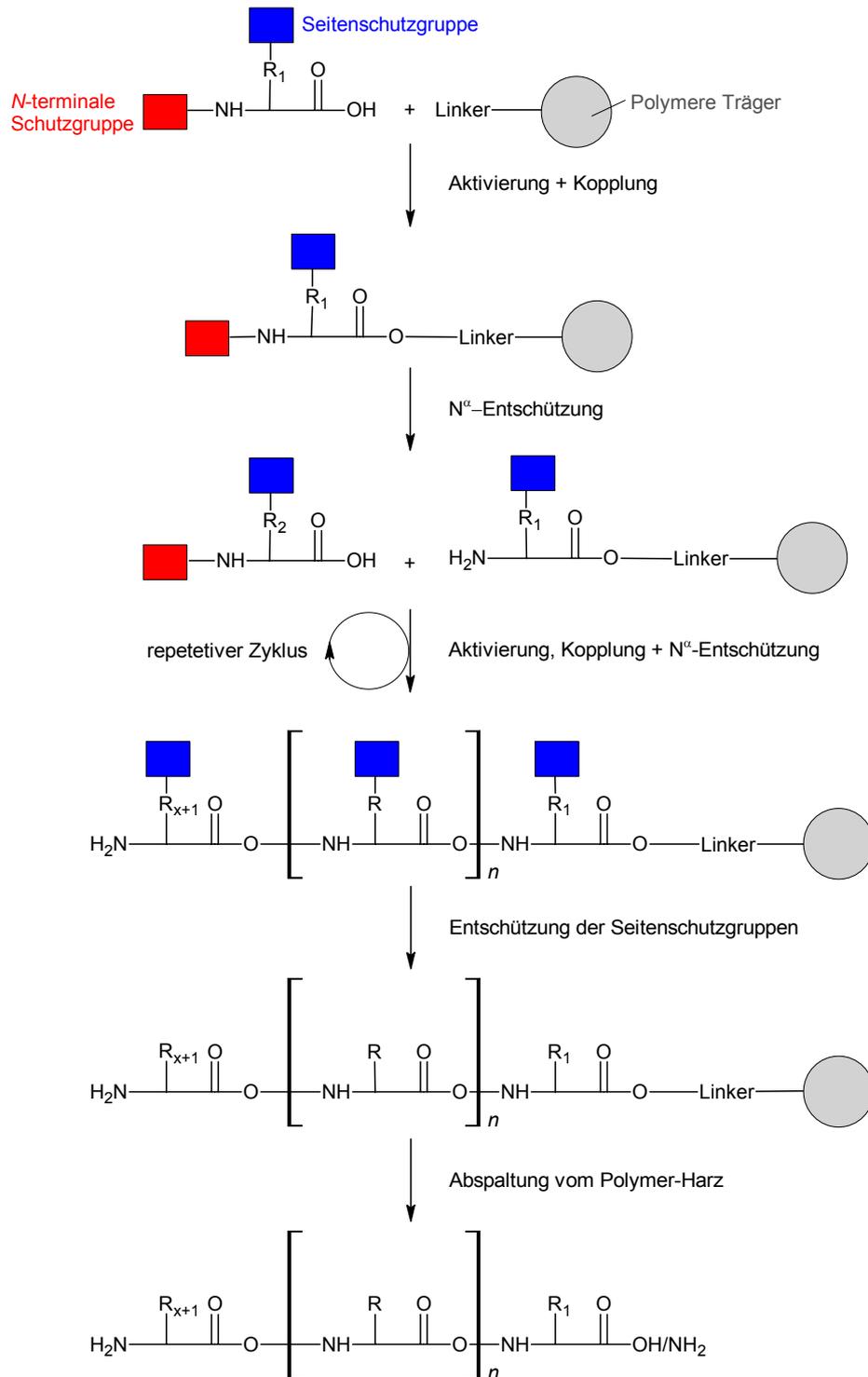


Abb. 1 Schematische Darstellung der Peptidsynthese an festen Phasen nach Merrifield; die Aminosäuren werden sukzessive an ein polymeres Harz (grau) gekoppelt und vom C- zum N-Terminus aufgebaut, eine N-terminale Schutzgruppen (rot) und Seitenschutzgruppen (blau) verhindern unerwünschte Nebenreaktionen (Chan & White, 2000).

Ester) aktiviert, um dann die typische Amidbindung mit dem freien N-Terminus zu bilden. Durch wiederholtes Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe und Anbindung weiterer Aminosäuren entsteht das Peptid mit der gewünschten Aminosäureabfolge. In einem letzten Schritt werden die

Seitenschutzgruppen des Peptides und schließlich das Peptid vom polymeren Träger unter definierten Reaktionsbedingungen abgespalten. Dabei entsteht am C-Terminus je nach Art des eingesetzten Linkers eine Carbonsäure oder ein Amid (Chan & White, 2000). Diese vorteilhafte Synthesemethode konnte sich durchsetzen, da durch einen hohen Überschuss an Aminosäure-Monomeren in der Reaktionslösung erstmalig sehr hohe Kopplungsausbeuten bei der chemischen Peptidsynthese erzielt werden konnten ($\geq 99\%$). Zudem erübrigt sich durch die Immobilisierung der Reaktionsprodukte an fester Phase eine aufwendige Reinigung der Zwischenprodukte, da die eingesetzten Reagenzien bzw. überschüssige Reaktanden einfach von der Trägermatrix abgespült werden können. Nach Abschluss der Peptidsynthese können die Reaktionsprodukte selektiv von der festen Phase abgespalten und die gewünschten Peptide isoliert werden (Bülle & Hüttermann, 2000).

Bei der verbesserten Peptidsynthese nach Merrifield werden sowohl am N-Terminus als auch an den funktionellen Seitengruppen säurelabile Schutzgruppen eingesetzt, die auf Benzyl- und *t*-Butylderivaten basieren (Merrifield 1964). Die selektive Abspaltung der N-terminalen *t*-Butoxycarbonylgruppe (*t*-Boc) erfolgt in jedem Synthesesyklus mit Hilfe von TFA. Die stabileren Benzylgruppen, die zum Schutz der Seitengruppen eingesetzt werden, benötigen eine stärkere Säure zur Abspaltung und werden in einem letzten Schritt mit Hilfe von Flusssäure abgespalten. Eine vollständige Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen wird mit dieser Methode jedoch nicht erzielt. Zudem können einige labilere Peptide durch die aggressive Flusssäure degradiert werden. Daher wurden die stabilen Benzyl-Linker und -Seitenschutzgruppen z.B. durch labilere *t*-Butyl/Benzyl-Systeme ersetzt, die unter Säureeinfluss in höheren Ausbeuten abgespalten werden können (Chan & White, 2000). Neben *N*-Trityl-, *o*-Nitrophenylsulphenyl- und α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonylgruppen wurden auch Biphenylisopropoxycarbonyl-(Bpoc)-Schutzgruppe

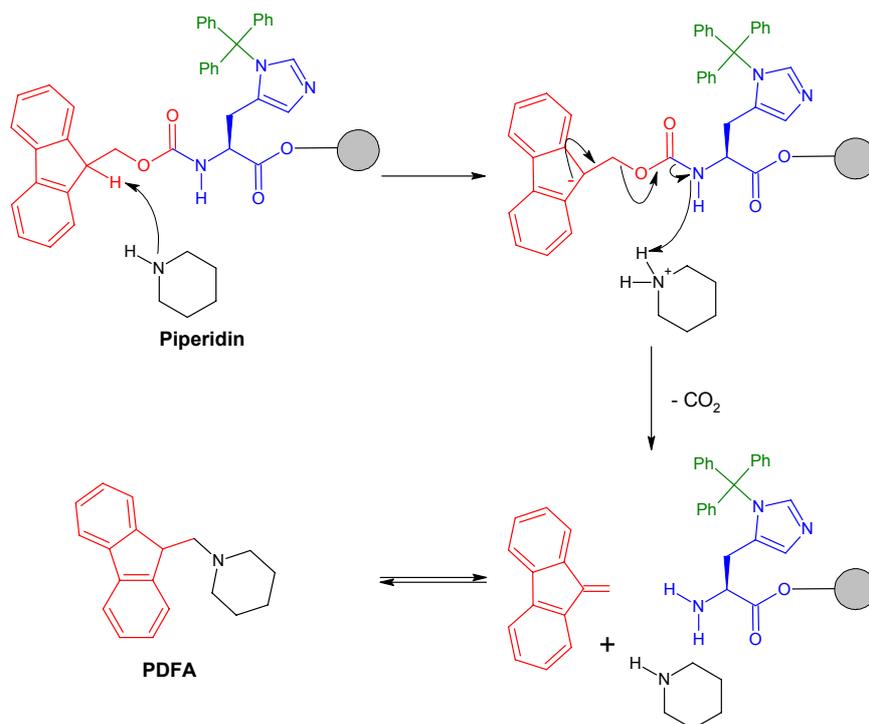


Abb. 2 Abspaltung der Fmoc-Gruppe unter Bildung des Piperidin-Dibenzofulven-Addukts (Beyer, 2005)

(Wang & Merrifield, 1969) eingesetzt (Chan & White, 2000).

Als Alternative stehen dem Peptidchemiker baselabile Gruppen zur Verfügung, die zum Schutz der *N*-terminalen Aminogruppen eingesetzt werden und in Kombination mit säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen und Linkern milde Reaktionsbedingungen ermöglichen. Hier hat sich insbesondere die von *Carpino* bereits 1972 entwickelte 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) etabliert (Carpino & Han, 1972; Greene & Wuts, 1999). Die Fmoc-Schutzgruppe wird mit Hilfe des sekundärenamins Piperidin abgespalten, wodurch ein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (PDFA) entsteht (Abb. 2). Dieses Derivat absorbiert bei einer Wellenlänge von 301 nm Licht, so dass die Effizienz der Fmoc-Abspaltung direkt aus der Lösung in einem UV-Spektrophotometer bestimmt werden kann.

Der Schutz des *N*-Terminus mittels einer basenlabilen Fmoc-Gruppe und der Seitengruppen mit Hilfe einer säurelabilen Schutzgruppe (z.B. Trityl-, *t*-Butyl- oder *t*-Butoxycarbonylgruppen) (Chan & White, 2000; Greene & Wuts, 1999) ist ein Beispiel für das orthogonale Synthesekonzept (Abb. 3). Dieses Prinzip beruht auf der Verwendung von zwei Schutzgruppen, die unterschiedlichen Klassen angehören und durch unterschiedliche Mechanismen abgespalten werden (Albericio, 2000). Heute hat die auf diesem Prinzip basierende Fmoc-Synthese die Festphasensynthese nach Merrifield abgelöst (Chan & White, 2000).

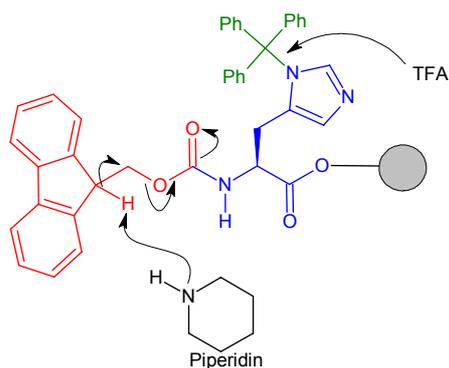


Abb. 3 Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen am Beispiel von *L*-Histidin(Trt) (blau); die baselabile Fmoc-Gruppe (rot) wird durch Piperidin, die säurelabile Tritylgruppe (grün) durch TFA abgespalten.

Zudem konnte dieser Festphasenansatz vergleichsweise einfach parallelisiert werden und führte zur Entwicklung von automatischen Peptidsynthesizern (z.B. der Firmen *Applied Biosystems* oder *Multisynthtech*). Bei diesen modernen Peptidsyntheseeinheiten wird chromatographisches Säulenmaterial als feste Phase eingesetzt, so dass nach dem Abspalten der Polypeptide diese getrennt von Syntheseartefakten eluiert werden, was einem finalen Reinigungsschritt entspricht.

1.1.1 Aktivierungsreagenzien

Die Anknüpfung der Aminosäuren an den *N*-Terminus des Peptides sollte möglichst quantitativ erfolgen und Nebenreaktionen wie die Razemisierung der chiralen Aminosäuren ausschließen. Um die Carbonsäure-Funktionalität einer Aminosäure zu aktivieren, werden häufig Carbodiimide eingesetzt. *Merrifield* nutzte z.B. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Dichlormethan (DCM) zur *in situ*-

Aktivierung. Dabei wird die Aminosäure in einen sehr reaktiven *O*-Acylisoharnstoff überführt, welcher sich jedoch zu unreaktiven *N*-Acylisoharnstoff umlagern oder zur Razemisierung der Aminosäure führen kann (Beyer, 2005). Um diese unerwünschten Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde eine Vielzahl weiterer Aktivierungsreagenzien entwickelt. So können Aminosäure bspw. durch HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) oder HODhbt (3-Hydrox-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin) *in situ* in Aktivester überführt werden. Die entstehenden Ester sind zwar weniger reaktiv als die *O*-Acylisoharnstoffe, verfügen aber über eine höhere Stabilität und eine geringere Anfälligkeit zur Razemisierung (Albericio et al., 2001). Eine Steigerung der Reaktivität und damit höhere

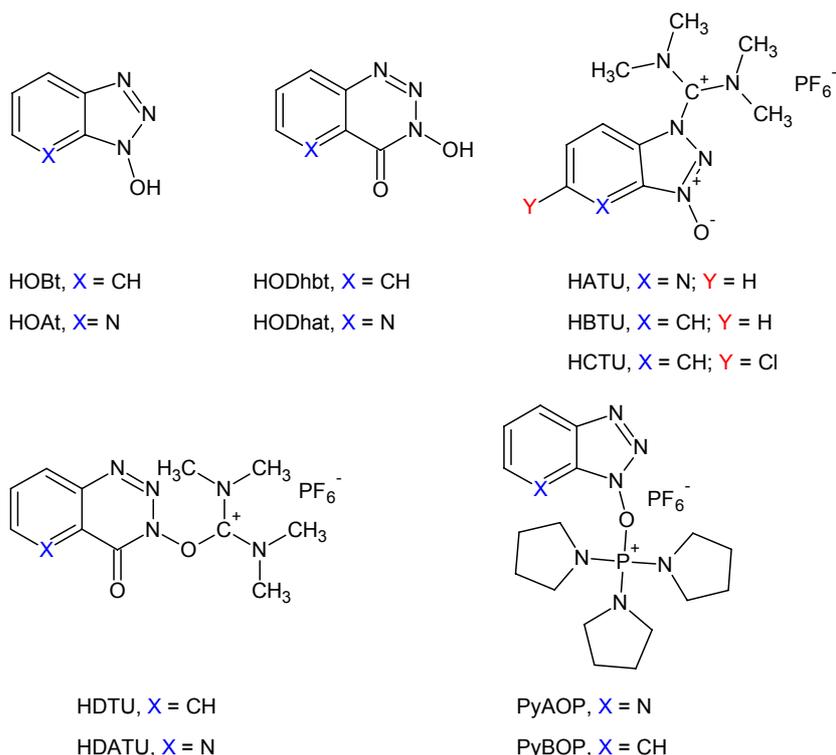


Abb. 4 Strukturformeln der in Kapitel 1.1.1 erwähnten Aktivierungsreagenzien (Beyer, 2005)

Kopplungsausbeuten resultieren aus der Verwendung des ebenfalls von *Carpino* entwickelten HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol) (Carpino, 1993) oder des HODhat (3-Hydrox-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzotriazin) (Carpino et al., 2004).

Aktivester lassen sich auch mit Aminium- (HATU, HBTU, HCTU), Uronium- (HDTU, HDATU) oder Phosphoniumsalzen (PyAOP, PyBOP) in Anwesenheit einer Base erzeugen (Chan & White, 2000). Neben diesen Aktivierungsreagenzien gibt es noch eine Vielzahl weiterer Aktivierungsmethoden. Die Wahl des einzusetzenden Aktivierungsreagenz ist immer abhängig von der Zielstellung der Peptidsynthese (z.B. Aminosäureabfolge, angestrebte Kopplungsausbeute) und den entstehenden Kosten (Chan & White, 2000).

Eine einfachere Aktivierung der *C*-Termini kann beispielsweise auch durch die Umwandlung der Aminosäuren in entsprechende Säurefluoride oder -chloride erzielt werden. Die Aminosäurechloride sind sehr reaktiv, neigen jedoch zur Instabilität und Razemisierung und können nicht über längere

Zeiträume gelagert werden. Die Aminosäurefluoride sind stabiler und werden vielfach bei der Ankopplung von sterisch anspruchsvollen und nicht natürlichen Aminosäuren verwendet (Wenschuh et al., 1994). Zu erwähnen sind in dieser Gruppe die Aktivester des Pentafluorphenols (Pfp). Sie nehmen wie die Chloride und Fluoride eine gesonderte Stellung in der Peptidsynthese ein, da sie bei der Anknüpfung an den *N*-Terminus einer Aminosäure ohne weitere Zusätze koppeln. Die Aminosäure-OPfp-Ester sind zudem in kristalliner Form sehr stabil, fast unbegrenzt lagerfähig, kommerziell erhältlich und erzielen hohe Reaktionsausbeuten (Jones, 2002).

1.1.2 Linker, Spacer und Capping-Schritte

Neben den verschiedenen Aktivierungsreagenzien stehen auch diverse Linker für die Peptidsynthese zur Verfügung. Ein weit verbreitet eingesetzter Linker ist der *Rink*-Linker (Abb. 5, A) (Rink, 1987).

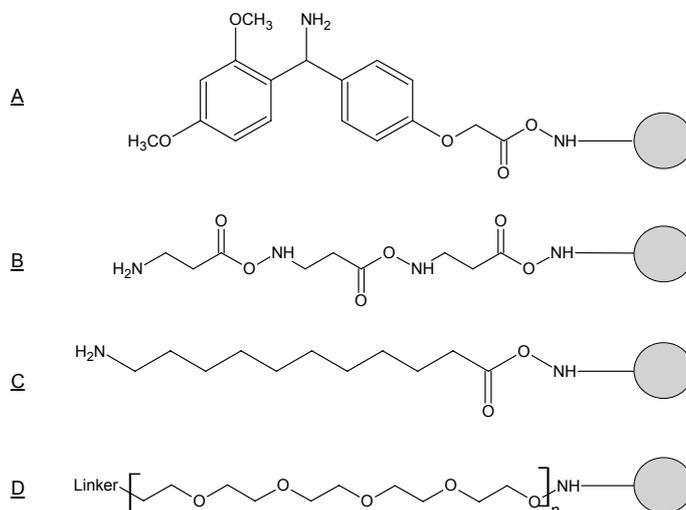


Abb. 5 Struktur einiger im Text erwähnten Linker und Spacer an fester Phase; *Rink*-Linker A; Peptidkette aus drei β -Alanin B; 11-Aminoundecansäure C; Poly(ethylenglykol) gebunden an eine aminoterminierte Festphase D.

Beim Einsatz dieses säurelabilen Linkers werden die Peptide simultan zu den Schutzgruppen im letzten Syntheseschritt mittels TFA abgespalten. Neben dem funktionellen *Rink*-Linker können auch pH-sensitive, Enzym-labile (Reents et al., 2001) oder photolabile Linker eingesetzt werden (Guillier et al., 2000; Eggenweiler, 1998; Scott & Steel, 2006). Um die Peptide stabil an der Oberfläche zu immobilisieren wird häufig die Aminosäure β -Alanin (Abb. 5, B) angebunden (Chan & White, 2000). Es können jedoch auch Glycin, Alanin oder langkettige Carbonsäuren wie z.B. die 11-Aminoundecansäure (Abb. 5, C) verwendet werden. Der Einsatz von Fmoc-Aminosäurederivaten ermöglicht zudem, die Anzahl an funktionellen Startgruppen für die folgende Synthese zu quantifizieren. Darüber hinaus werden verschiedene Spacer als Abstandhalter zwischen Peptid bzw. Linker und Festphase eingesetzt, um die Zugänglichkeit der Peptide für Kopplungsreagenzien zu erhöhen und die Oberflächeneigenschaften (Hydrophobie, Biokompatibilität, Löslichkeit) hinsichtlich der ablaufenden Reaktionen zu optimieren (Sasikumar, et al. 2004). Dabei hat sich der Einsatz von

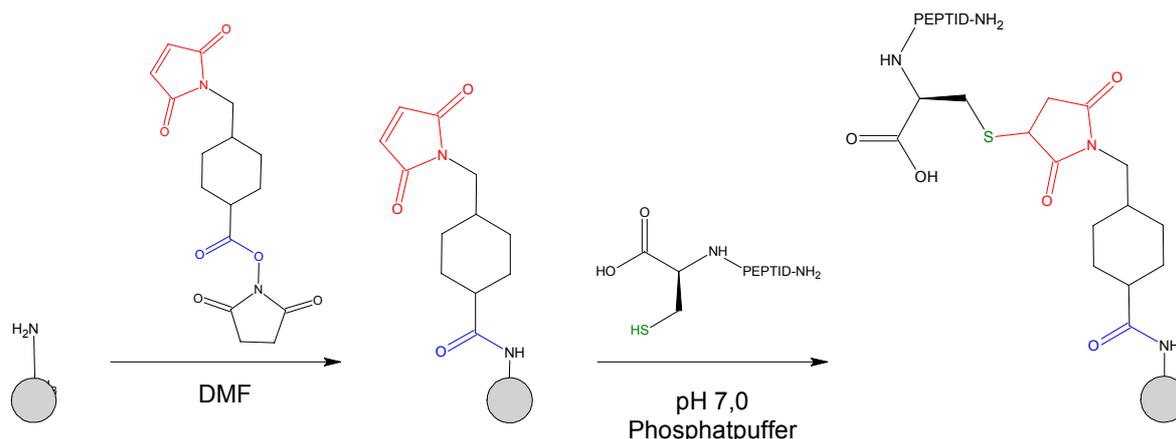


Abb. 6 Schematische Darstellung der Anbindung des SMCC-Linkers an eine feste Phase und Anbindung eines Peptides über die funktionelle Seitengruppe des C-terminalen Cysteins.

Poly- bzw. Oligo(ethylenglykolen) (Abb. 5, D) und ihren Derivaten bewährt (Camperi et al., 2005, Wang et al., 2001; Blackwell, 2006).

Zur Anbindung von vorsynthetisierten Peptiden wird häufig der SMCC-Linker [Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure] eingesetzt (Kuijpers et al., 1993). Dieser setzt jedoch voraus, dass am C-Terminus des Peptids ein freies Cystein vorliegt. Der SMCC-Linker wird zunächst an eine Trägeroberfläche gebunden und anschließend das in Phosphatpuffer gelöste Peptid z.B. mit Hilfe eines Pipettierroboters aufgebracht. Dabei verhindert die Oberflächenspannung des wässrigen Puffers auf planaren Trägern – in Abhängigkeit von den Oberflächeneigenschaften - ein „Breitlaufen“ der Spots, wie es hingegen bei der Verwendung von organischen Lösungsmitteln (z.B. DMF) erfolgt. Die Anbindung eines Peptids über das C-terminale Cystein an den SMCC-Linker ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Sowohl bei der Peptidsynthese als auch bei der Anbindung von vorsynthetisierten Peptiden an die jeweilige Oberfläche erfolgt nach der Kopplung üblicherweise ein sog. Capping-Schritt. Dieser dient dazu, übrige reaktive Gruppen an der Oberfläche zu blockieren. Bei der Verwendung des SMCC-Linkers wird hierzu β -Mercaptoethanol eingesetzt (Kuijpers et al., 1993). Bei der Peptidsynthese wird vielfach Essigsäureanhydrid zur Acetylierung freier, nicht umgesetzter Aminogruppen verwendet (Chan & White, 2000). Damit wird vor Abspaltung einer terminalen Schutzgruppe verhindert, dass nicht abreagierte Peptide weiter an den folgenden Kopplungsreaktionen teilnehmen und unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Die gecappten Peptide bleiben jedoch bis zum Ende der Synthese als Syntheseartefakte erhalten und können falls keine Aufreinigung erfolgt, die Ergebnisse eines Assays beeinflussen.

1.2 Herstellung von Peptidbibliotheken

Die Entwicklung der Peptidsynthese an Festphasen ermöglicht eine automatisierte Herstellung von einzelnen Peptiden in hoher Ausbeute und Reinheit. Um jedoch nicht nur ein Peptid, sondern eine Bibliothek aus Peptiden mit verschiedenen Aminosäureabfolgen zu synthetisieren, wurde dieses

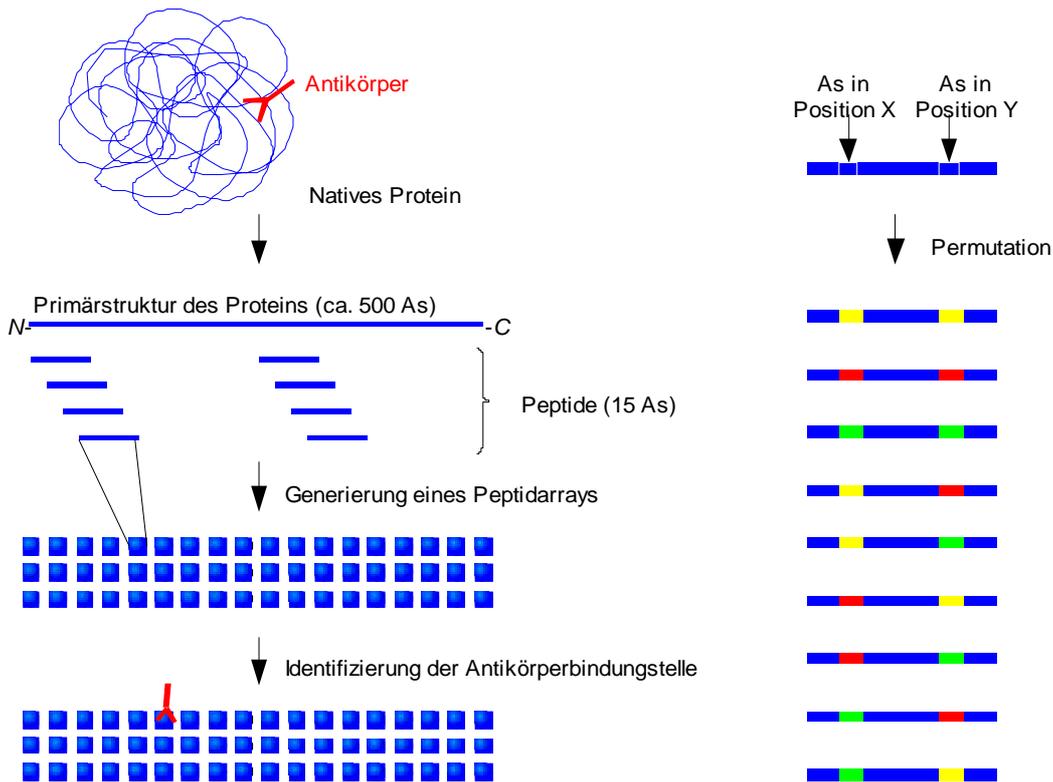


Abb. 7 (linke Seite) Entwicklung einer Peptidbibliothek aus der Primärstruktur eines Proteins (500 As) zur Identifizierung einer spezifischen Antikörperbindungsstelle. Das Protein wird in kurze überlappende Peptide (15 As) auf einem Array präsentiert und auf Interaktionen untersucht; (rechte Seite) Permutation eines Peptides in zwei Positionen (X und Y) und die resultierenden Peptidvarianten beim Einsatz von 3 alternativen Aminosäuren (gelb, rot, grün).

Syntheseprinzip parallelisiert. Dies führte zur Etablierung verschiedener Methoden zur Synthese von Peptidbibliotheken (Chan & White, 2000, Panicker et al., 2004). Eine solche Peptidbibliothek kann bspw. aus überlappenden kurzen Abschnitten der Aminosäureabfolge eines Proteins bestehen. Dies ist z.B. nützlich, wenn die spezifische Bindungsstelle eines Antikörpers an ein definiertes Protein identifiziert werden soll (Abb. 7, linke Seite). Soll nun diese Antikörperbindungsstelle bezüglich der Affinität des Antikörpers optimiert werden, kann die spezifische Aminosäureabfolge in verschiedenen

Tab. 1 Anzahl möglicher Permutationen bei der Synthese einer Peptidbibliothek aus 20 Aminosäuren (As)

Peptidlänge	Permutationen
As	$20^1 = 20$
As-As	$20^2 = 400$
As-As-As	$20^3 = 8.000$
As-As-As-As	$20^4 = 160.000$
As-As-As-As-As	$20^5 = 3.200.000$
As-As-As-As-As-As	$20^6 = 64.000.000$
As-As-As-As-As-As-As	$20^7 = 1.280.000.000$

Positionen variiert werden. Diese Permutationen können ebenfalls in Form eines Peptidarrays untersucht werden (Abb. 7, rechte Seite). Aufgrund der hohen Anzahl an verschiedenen Monomeren (20 proteinogene *L*-Aminosäuren) ergibt sich mit 20^x eine extrem hohe Anzahl an kombinatorisch möglichen Permutationen. Bei der Synthese einer Hexapeptidbibliothek unter Berücksichtigung aller proteinogenen Aminosäuren müssten z.B. 20^6 Peptidvarianten (Tab. 1) auf einem Träger synthetisiert werden. Diese hohe Anzahl verschiedener Bausteine erschwert die parallelisierte Peptidsynthese im Arrayformat und bedingt sowohl die hohen Produktionskosten als auch die geringe Komplexität der bis dato erhältlichen Peptidarrays.

1.2.1 Photolithographie

Fodor et al. entwickelten ein photolithographisches Syntheseprinzip, durch das sie parallel 1024 Peptide auf einem funktionalisierten Glasträger ($1,6 \text{ cm}^2$) *in situ* herstellen konnten (Fodor et al., 1991). Dabei werden Photomasken auf dem funktionalisierten Trägermaterial positioniert und durch Lichteinstrahlung photolabile Schutzgruppen an belichteten Syntheseorten abgespalten. Anschließend werden die Peptide an den belichteten Positionen durch Kopplung einer Aminosäure, um einen Monomerbaustein verlängert. Pro Synthesesyklus kann folglich nur ein Monomer an den Träger gekoppelt werden. Dadurch kommt es im Falle von Peptidarrays bei 20 proteinogenen Aminosäuren als Bausteinen zu einer beträchtlichen Akkumulation von Synthesesyklen, was mit einem enorm hohen Zeit- und Materialaufwand verbunden ist. Aufgrund vergleichsweise geringer Ausbeuten bei der Abspaltung der lichtempfindlichen Schutzgruppen und der Kopplung der Monomere (Panicker, 2004; Beier & Hoheisel, 2000) reichern sich zudem Syntheseartefakte an. Die geringe Synthesequalität ermöglicht zwar die Herstellung sehr kurzer bzw. sorgfältig ausgewählter Sequenzen, schließt jedoch die Synthese eines kombinatorischen Arrays mit einer beliebigen Peptidvielfalt aus (Fodor et al., 1991). *Gao et al.* verbesserten die Synthesequalität der photolithographischen Synthesemethode durch den Einsatz von Photosäuren (Pellois et al., 2002; Gao et al., 2003). Diese Photosäuren werden durch Bestrahlung hergestellt und spalten ortsgenau die säurelabilen und terminalen *t*-Boc-Schutzgruppen mit hoher Effizienz ab (Pellois et al., 2002). Über ein projiziertes, computergeneriertes Lichtmuster lassen sich so einige tausend Peptidsequenzen pro Quadratcentimeter in guter Qualität herstellen (Pellois et al., 2002). Für die Herstellung von Peptidarrays konnte sich die photolithographische Synthesemethode aufgrund der Vielzahl an Synthesesyklen dennoch nicht durchsetzen. Sie wurde jedoch zur Standardsynthesemethode von Oligonucleotid-Arrays, da dabei nur vier Monomerbausteine (Nucleotide) kombinatorisch zu Oligonucleotidsträngen verknüpft werden müssen (Cook & Saylor, 2003). Da die Größe der Syntheseorte nur durch die Photomasken bzw. generierten Lichtmuster begrenzt sind, können extrem dichte Oligonucleotid-Bibliotheken hergestellt werden. Heute werden in der Genomforschung hochkomplexe Oligonucleotid-Arrays im Chipformat (z.B. *Genechips*®, *Affymetrix*, USA) routinemäßig eingesetzt, auf denen mehrere 10.000 Genfragmente pro cm^2 mittels der photolithografischen Synthesemethode hergestellt wurden (Cook & Saylor, 2003).

1.2.2 Split-Mix-Synthese

Basierend auf *Merrifields* Peptidsynthese an festen Polymerbeads wurde die Split-Mix-Synthese entwickelt (Houghten, 1985; Furka et al., 1991; Houghten et al., 1991; Lam et al., 1991; Lam et al., 1997). Dabei werden die funktionalisierten Polymerbeads in Fraktionen eingeteilt und jede Fraktion mit

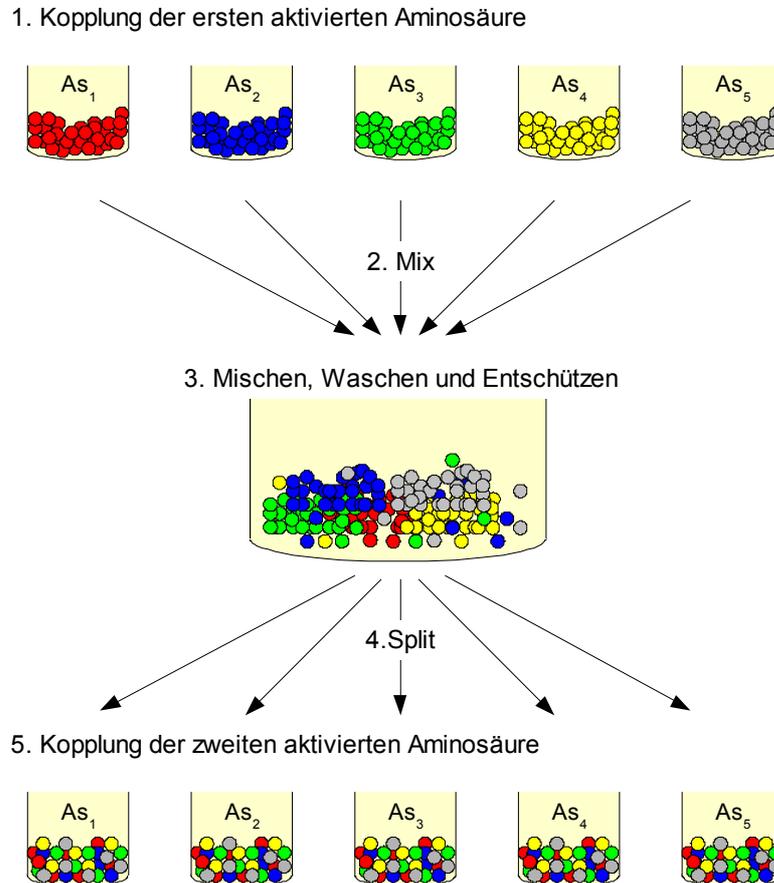


Abb. 8 Schematische Darstellung der Split-Mix-Synthese: Für die Kopplung der einzelnen As werden die Polymerbeads in einzelne Fraktionen eingeteilt („Split“), anschließend werden sie als Gemisch („Mix“) gewaschen und N-terminal entschützt und wieder in Fraktionen (Split) eingeteilt zur Kopplung der nächsten individuellen Aminosäure.

einer bestimmten Aminosäure (z.B. aktivierte Fmoc-OPfp-Ester) in Lösung umgesetzt. An jede Fraktion von Polymerbeads wird jeweils eine andere Aminosäure gekoppelt. Anschließend werden die Polymerbeads vereint, gewaschen und die terminale Schutzgruppe abgespalten. Dann werden die Polymerbeads gründlich gemischt („Mix“) - um eine statistische Verteilung zu erzielen - wiederum fraktioniert („Split“) und die nächste Aminosäure gekoppelt (Abb. 8). Durch wiederholtes Mischen, Teilen und Koppeln von weiteren Aminosäuren entstehen hochkomplexe Peptidgemische, in denen jede kombinatorisch mögliche Aminosäureabfolge vertreten ist. *Houghten et al.* nutzen z.B. dieses Synthesekonzept zur Herstellung einer Bibliothek mit 34 Millionen freien Hexapeptiden, in der er sowohl ein spezifisches Antigen als auch einen möglichen Inhibitor eines monoklonalen Antikörpers identifizieren konnte (Houghten et al., 1991). Da bei dieser Synthesemethode pro Polymerbead nur eine Aminosäuresequenz präsentiert wird („one-bead-one-compound“) (Lam et al., 1997), kann eine spezifische Interaktion durch standardisierte immunologischen Nachweismethoden (z.B. ECL) detektiert und der Polymerbead separiert werden (Lam et al., 1991). Abschließend werden die

Aminosäureabfolgen der an den isolierten Polymerbeads gebundenen Peptide z.B. durch *Edman*-Sequenzierung bestimmt. Diese arbeitsaufwendige Dekodierung ist ein entscheidender Nachteil der Split-Mix-Synthese. Zudem können problematische Aminosäuresequenzen, wie z.B. hydrophobe Peptide, die unspezifisch Proteine binden, aus der Bibliothek nicht ausgeschlossen werden. Das wiederum resultiert in einer Vielzahl von Falsch-Positiv-Resultaten, wenn Proteine als Interaktionspartner eingesetzt werden. Die Vorteile liegen in der parallelen Prozessierung der Reaktionsorte und der vergleichsweise einfachen Synthese einer extrem hohen Anzahl von Oligomeren. Heute wird die Technik in vielen Varianten nicht nur zur Synthese von Peptiden (z.B. auch von Oligocarbamaten, Oligoureas etc.) eingesetzt und ist ein etabliertes Hochdurchsatzverfahren bspw. in der Wirkstoffentwicklung (Lam et al., 1991; Houghten et al., 2008).

1.2.3 Die SPOT-Synthese

Eine erste Methode zur Synthese eines Peptidarrays auf einer homogenen und planaren Trägermatrix wurde 1992 von *Ronald Frank* beschrieben (Frank, 1992). Bei der SPOT-Synthese werden nacheinander die 20 voraktivierten Aminosäuren in Lösung tropfenweise auf eine funktionalisierte Oberfläche (z.B. Zellulose) aufgebracht. Dort koppeln die Aminosäuren sofort und ortsaufgelöst im jeweils durch den Tropfen definierten Reaktionsraum (Spot) an den Träger (Abb. 9, linke Seite) (Dittrich et al., 1998). Anschließend wird der Array gewaschen und gemäß der *Merrifield*-Peptidsynthese prozessiert. Durch wiederholtes ortsgenaues Spotten der Reaktionslösungen und sukzessives Koppeln der Aminosäure entstehen die gewünschten Peptide an definierten Syntheseorten. Die Größe der Spots ist dabei abhängig vom eingesetzten Volumen der Reaktionslösungen, den physikalischen Eigenschaften der Trägermatrix sowie dem verwendeten Lösungsmittel. Diese Faktoren definieren den Spot-Spot-Abstand und damit die resultierende Spotdichte pro Flächeninhalt. Der Vorteil der Spot-Synthese gegenüber der Synthese an Polymerbeads besteht im Wesentlichen darin, dass anhand der Position einer nachgewiesenen Wechselwirkung unmittelbar die Sequenz des bindenden Peptids abgelesen werden kann (Beyer, 2005). Darüber hinaus können Falsch-Positiv-Resultate bzw. Kreuzreaktivitäten schnell und einfach

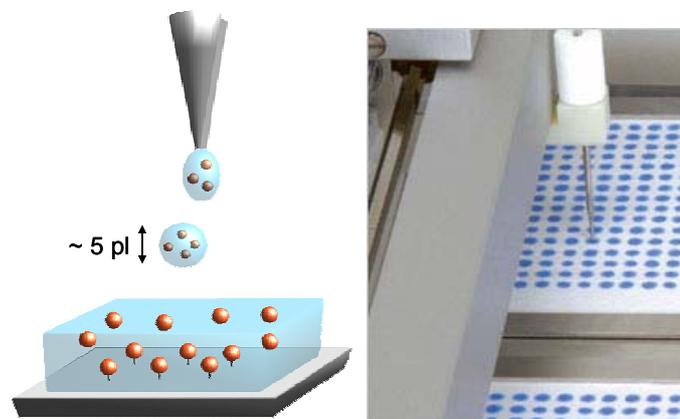


Abb. 9 (links) Schematische Darstellung der SPOT-Synthese; die aktivierten Aminosäuren (orange) koppeln im durch den Lösungsmitteltropfen vorgegebenen Reaktionsraum mit der Oberfläche; (rechts) Mikropipettiereinheit zur kombinatorischen Synthese einer Peptidbibliothek auf Zellulose; Spots sind blau dargestellt.

durch Kontrollfärbungen identifiziert werden.

Die SPOT-Synthese ist eine hoch parallelisierte Synthesemethode, bei der Peptidarrays kombinatorisch mit Hilfe von Mikropipettiereinheiten synthetisiert werden (Abb. 9, rechte Seite). Höhere Peptiddichten können dabei mit der SC² Methode erreicht werden, wobei individuelle Peptide, die auf einem ersten Array kombinatorisch auf Zellulose synthetisiert wurden, dort wieder abgelöst und auf modifizierten Trägermaterialien (z.B. Objektträger oder Discs) erneut gespottet werden. Diese Variante der SPOT-Synthese ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn viele Kopien eines Peptidarrays hergestellt werden sollen (Dikmans et al., 2006; Frank, 2002a; Frank, 2002b).

Aufgrund ihrer Zuverlässigkeit und der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten (Reineke et al., 2001) dominiert die SPOT-Synthese den Markt für Peptidarrays. Vollständig synthetisierte und individuell angepasste Peptidbibliotheken bieten Firmen wie *intavis AG* (Köln, Deutschland, *CelluSpots™-Array*) oder *JPT Peptide Technologies GmbH* (Berlin, Deutschland, *PepSpot™-Array*) an. Diese Arrays haben sich in verschiedenen Applikationen bewährt und erreichen Spottedichten von ca. 25 Spots/cm². Allerdings verhindert ihr Preis (>6,50 €/ Peptidspot), der durch eine material- und zeitaufwendige Herstellung bedingt wird, eine breite Anwendung in der Forschung.

Daneben gibt es eine Vielzahl von Firmen (z.B. *metabion*, *Elim Biopharmaceuticals*, *GL Biochem*, *Genesis Biotech Inc.*), die Peptide kombinatorisch in Mikrotiterplatten (96er-, 192er- oder 384er-Format) synthetisieren. Diese vorsynthetisierten Peptide können wie bei der SC²-Methode auf eine Vielzahl von Objektträgern gespottet (bis zu 100 Spots/cm²), aber und auch in Lösung eingesetzt werden (Reineke et al., 2001). Allerdings muss angemerkt werden, dass die Peptidvielfalt durch das Mikrotiterplattenformat stark eingeschränkt ist und sich durch den anfallenden Materialaufwand beträchtliche Kosten aufsummieren. So bieten *Pepscan Systems* (Lelystad, Niederlande) zwar Arrays mit bis zu 3.000 Peptiden an, diese sind jedoch mit 35.-€ pro Peptid sehr teuer.

1.2.4 Peptidsynthese mit Hilfe fester Aminosäurepartikel

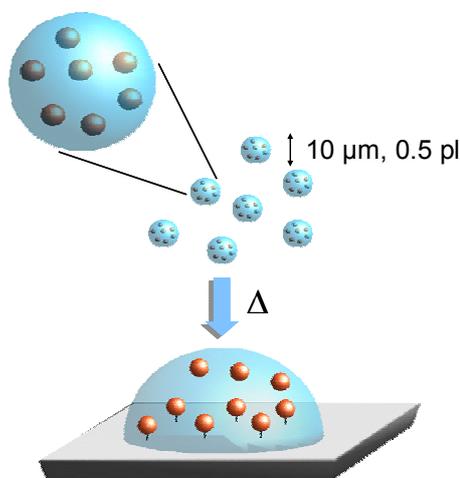


Abb. 10 Schemata, feste Partikel werden auf der Trägeroberfläche adressiert, das Schmelzen der Matrix in der Hitze initiiert die Kopplung der aktivierten As (orange) an den Träger.

Zwei neue Methoden zur Synthese von hoch komplexen Peptidbibliotheken werden in der Arbeitsgruppe Chipbasierte Peptidbibliotheken am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg entwickelt (Stadler et al., 2008a; Felgenhauer et al., 2008; Beyer et al., 2007). Bei diesen Methoden werden feste Partikel eingesetzt, in deren Matrix die 20 proteinogenen L-Aminosäuren in aktivierter Form (Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester) eingebettet sind (Abb. 10). Die Matrix dieser 20 unterschiedlichen Aminosäurepartikel besteht aus einem bei Raumtemperatur festen Lösungsmittel sowie aus verschiedenen Zusätzen, die eine triboelektrische Aufladung der Partikel ermöglichen und ihnen die physikalischen Eigenschaften von

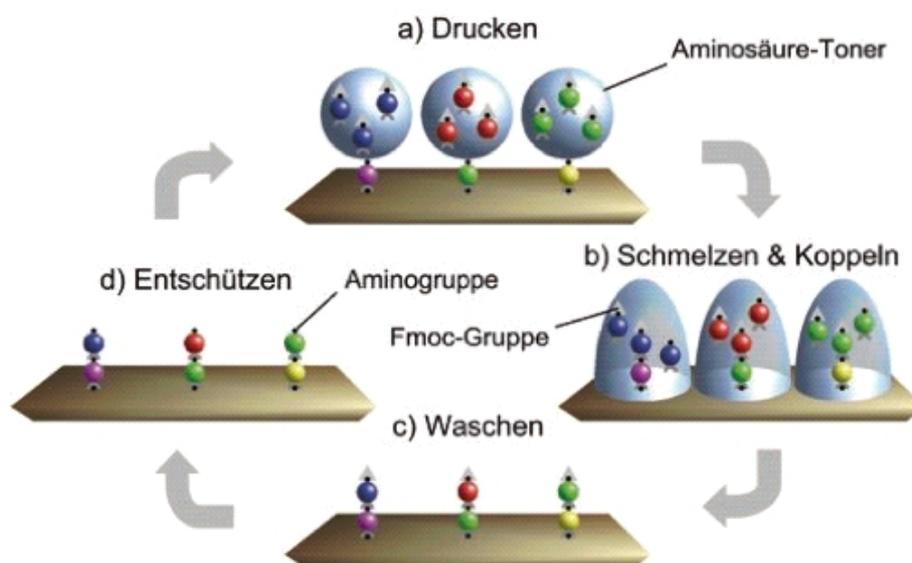


Abb. 11 Schematische Darstellung der Peptidsynthese mittels Aminosäurepartikeln; die Partikel werden ortsgenau auf dem Träger platziert z.B. durch Bedrucken, die Kopplung der Aminosäure durch Schmelzen der Partikelmatrix initiiert; nach dem Waschen und der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird der Adressierungs- und Kopplungsprozess wiederholt (Stadler et al., 2008a).

konventionellen Farntonern verleihen. Die geladenen Partikel werden nacheinander mit Hilfe von elektrischen Feldern bzw. Ladungsmustern, die durch Mikrochips (Beyer et al, 2007; Felgenhauer et al, 2008) oder einen Laserdrucker (Stadler et al, 2008a) erzeugt werden, auf eine funktionalisierte Oberfläche (Beyer, 2005; Beyer et al. 2006) adressiert (Abb.11, a). Das Schmelzen der Partikel und die Verflüssigung der Matrix initiiert die Kopplung der Aminosäuren an den Träger (Abb. 11, b). Es folgt ein Waschschritt, um Partikelmatrixbestandteile und überschüssige Aminosäuren vom Träger zu entfernen (Abb. 11, c), gefolgt von einem Entschützungsschritt zur Entfernung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe (Abb. 11, d). Durch wiederholtes Ablagern der Partikel, Schmelzen, Waschen und Entschützen werden ortsaufgelöst die gewünschten Peptide synthetisiert (Abb. 11). Das Prinzip dieser Peptidsynthese beruht auf der Fmoc-Peptidsynthese an Festphasen, wie sie auch bei der SPOT-Synthese eingesetzt wird. Der einzige Unterschied liegt in der Verwendung eines bei Raumtemperatur festen Lösungsmittels (Partikelmatrix) statt des üblicherweise verwendeten *N,N*-Dimethylformamids. Durch den Verzicht auf ein flüssiges Lösungsmittel werden die Probleme, die bei der Spot-Synthese auftreten können (Verdampfen des Lösungsmittels, Verlaufen der Spots etc.), einfach umgangen. Zudem ist die Spottedichte nicht mehr durch die Lösungsmittelmenge (ca. 5 pl) und die Genauigkeit des Spotters begrenzt, sondern nur noch abhängig von der Größe der Aminosäurepartikel (10 µm im Durchmesser entsprechen ca. 0,5 pl) und dem erzeugten Ladungsmuster. Inzwischen können mit Hilfe des Laserdruckers Peptidarrays mit Spottedichten von 400 Spots/cm² synthetisiert werden, was den Stand der Technik um Faktor 16 übertrifft (Stadler et al., 2008a). Das Mikrochipverfahren kann diese Dichten noch deutlich steigern. Mit Dichten bis zu 40 000 Spots/cm² werden Werte erreicht, die bis dato nur mittels des photolithografischen Prozesses zur Synthese von Genchips erzielt wurden (Beyer et al., 2007).

1.2.4.1 Die Aminosäurepartikel

Um die Aminosäurepartikel selektiv mit dem Laserdrucker und den beschriebenen Mikrochips auf dem Array platzieren zu können, müssen diese verschiedene Anforderungen erfüllen. Die Aminosäurepartikel der einzelnen Kollektive müssen eine möglichst einheitliche Größe aufweisen. Die Agglomeration muss weitestgehend unterdrückt werden. Die Aminosäuren und Zuschlagstoffe sollten sowohl in den einzelnen Partikeln wie auch innerhalb der Partikel eines Kollektivs gleichmäßig verteilt sein. Ebenfalls müssen die Partikel sowohl innerhalb eines Kollektivs als auch die Partikel der unterschiedlichen Kollektive eine möglichst ähnliche triboelektrische Aufladbarkeit besitzen, um das einheitliche Übergangsverhalten im elektrischen Feld zu gewährleisten.

Weiterhin müssen die Partikel ein einheitliches Schmelzverhalten aufweisen, d.h. alle in einer kombinatorischen Ebene aufgetragenen Arten von Aminosäurepartikeln müssen bei nahezu identischen Temperaturen eine Reaktionssphäre ausbilden, welche die Freisetzung der Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester sowie deren Reaktion mit der funktionalisierten Chipoberfläche gewährleistet. Ferner darf es in diesem Reaktionsschritt zu keiner chemischen Reaktion zwischen den übrigen Partikeladditiven und den Monomeren bzw. der Trägeroberfläche kommen. Diese Anforderung ist essentiell, um eine hohe Kopplungseffizienz zu erzielen und Nebenreaktionen zu vermeiden. Nach erfolgter Anbindung der Monomere an den Träger müssen die Additive wie ladungsgebende Agenzien („charge control agents“) und Aerosile durch Waschen restlos vom Träger entfernt werden können, so dass diese im folgenden Zyklus die Kopplungsreaktion nicht beeinflussen.

Um den geforderten chemischen und physikalischen Eigenschaften zu genügen, mussten der Partikelmatrix unterschiedliche Einzelkomponenten zugesetzt werden. Die Matrix besteht aus den aktivierten Monomeren (Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester), sog. Charge Control Agents und Charge Stabilizern [Pyrazolon Orange, *ABCR GmbH* und ein Fe-Naphthol-Komplex (Kawagishi, 1983)], die die triboelektrische Aufladung der Partikel sowie die Verweildauer der Ladungen auf den Partikeln beeinflussen. Darüber hinaus enthält die Matrix ein Polymer (SLEC PLT 7547, *Sekisui*), das die Partikel gegenüber mechanischen Einflüssen stabilisiert und durch seine relative Lage in der triboelektrischen Reihe (Pai & Springett, 1993; Anderson, 2000) das Ladungsvorzeichen der Partikel bestimmt. Eine weitere Komponente bildet das „feste Lösungsmittel“, eine Substanz, die bei Raumtemperatur in einem festen Zustand vorliegt und bei moderater Temperatur eine für die Kopplungsreaktion geeignete, flüssige Reaktionssphäre ausbildet. Hierfür wurden die höheren Homologen der in der Peptidsynthese gängigen Lösungsmittel, DPSO (Di-phenylsulfoxid; $T_s = 69-71^\circ\text{C}$) und DTSO (Di(p-tolyl)-sulfoxid; $T_s = 96^\circ\text{C}$) verwendet.

Bei der Herstellung wird aus den oben beschriebenen Einzelkomponenten zunächst eine Basismatrix hergestellt. Dazu werden diese in einem geeigneten Lösungsmittel (CH_2Cl_2 oder Aceton) vorgelegt, gut durchmischt und das Lösungsmittel schonend bei reduziertem Druck entfernt. Die so entstandene Basismatrix wird über Nacht mit einem Lyophilisator getrocknet. Im nächsten Schritt wird die Basismatrix mittels einer Grob- oder Prallmühle zerkleinert (Partikelgröße $<0.5\text{ mm}$). Durch das anschließende Mahlen der Partikel mit einer Luftstrahlmühle werden Partikelkollektive erzeugt, deren mittlerer Durchmesser nach Bedarf bei rund $10\text{ }\mu\text{m}$ liegt. Gegen Ende des Herstellungsprozesses werden die Monomerpartikel mit Aerosilen (SiO_2 -Partikel mit Durchmessern $<10\text{ nm}$; Aerosil 812, Degussa) behandelt. Diese lagern sich an der Oberfläche der Partikel an und verhindern damit deren

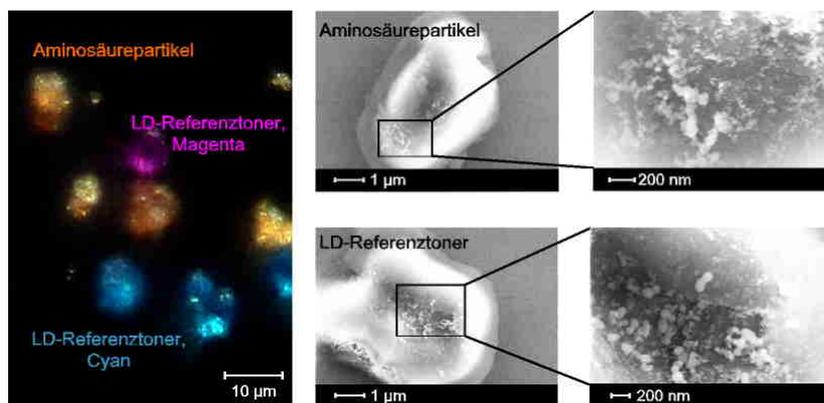


Abb. 12 (links) Vergleich von Struktur und Größe der Aminosäurepartikel mit konventionellem LD-Toner, Mikroskopbild der Aminosäurepartikel im Vergleich zu OKI LD-Farbtönen (Cyan und Magenta), (rechts) Rasterelektronenmikroskopaufnahme der Aminosäurepartikel und der LD-Toner Referenz (Stadler et al., 2008a).

Agglomeration zu größeren Partikelverbänden mit unerwünschten physikalischen Eigenschaften. Im Anschluss an den Herstellungsprozess wird die Qualität der Partikel überprüft. In Anlehnung an das Druckerprinzip werden die Eigenschaften der Partikel mit Farbtönen (LD-Toner) der Firma OKI verglichen. Die hergestellten Aminosäurepartikel zeigen ein einheitliches Schmelzverhalten bei Temperaturen zwischen 60- und 80°C, haben eine vergleichbare Größe und Struktur (Abb. 12, Orange) wie LD-Toner der Farben Magenta und Cyan (Abb. 12, links) und besitzen ein vergleichbares Masse/Ladungs-Verhältnis wie die LD-Toner-Referenz (Stadler et al., 2008a; Beyer et al., 2007).

In weiteren Untersuchungen mittels HPLC stellte sich heraus, dass in Partikelmatrix eingebettete Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester bei Raumtemperatur (25°C) monatelang stabil sind (Zerfall < 1% nach einem Monat). Die Ausnahme bilden die Fmoc-L-Arg(Pbf)-OPfp-Ester, die zu 5 % pro Monat zerfielen (Stadler et al., 2008a). Dies hat den großen Vorteil, dass die Partikel ohne besondere Vorkehrungen in den Tonerpatronen des Druckers aufbewahrt werden können und so jederzeit für einen Druckversuch zur Verfügung stehen (Stadler et al., 2008a). Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass die Komponenten der Partikelmatrix (im Besonderen das „feste“ Lösungsmittel) und das Erhitzen der Partikel während des Kopplungsschrittes zur Razemisierung der Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester führen (Stadler et al., 2008a).

1.2.4.2 Die Oberflächenmodifikation

Die Herstellung von aminoterminalen Oberflächen mit optimierten Quelleigenschaften als Trägermaterial für die Peptidsynthese erfolgt durch Aufbau und Modifikation von wasserlöslichen Poly(ethylenglykol)-polymethacrylat-(PEGMA)-Filmen. Diese Filme sind thermisch und chemisch sehr stabil. Zudem sind sie nahezu inert gegenüber unspezifischen Wechselwirkungen mit biologischem Probenmaterial (z.B. Zellen, Antikörper, Enzyme etc.), wodurch sie optimale Eigenschaften für die Herstellung und Anwendung von Peptidarrays besitzen. Zur Synthese wird zunächst auf dem gereinigten Trägermaterial (z.B. Glas oder Siliziumoxid) eine definierte organische Monoschicht eines Br- substituierten Silans aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Film aus dem kommerziell erhältlichen Monomer Poly(ethylenglykol)-methacrylat ($n = 5$, $MW \approx 360$ g/mol) aufgebaut. Als

Synthesemethode wird dabei auf die 1995 entwickelte ATRP (atom transfer radical polymerization) zurückgegriffen (Wang & Matyjaszewski, 1995), deren Anwendbarkeit für die oberflächeninduzierte Graftpolymerisation erst kürzlich gezeigt wurde (Feng et al., 2005; Xu et al., 2004; Xu et al., 2004). Bei der ATRP wird ausgehend von einem Br-substituierten Silan in einer einstufigen Reaktion unter Schutzgas bei Raumtemperatur über Nacht ein Graftpolymerfilm durch Cu(I)-Katalyse hergestellt (Abb. 13). Ein entscheidender Vorteil der ATRP liegt in den milden Reaktionsbedingungen, wodurch die empfindliche Chipoberfläche bei der Synthese des Polymerfilms geschont wird (Stadler et al., 2007). Zudem ist dieses ATRP-Verfahren einfach kontrollierbar, da die Schichtdicke nahezu linear von der Monomerkonzentration in der Polymerisationslösung abhängt. Weiterhin ist eine Kontrolle der Schichtdicke über die Zeitabhängigkeit der Polymerisation möglich. Nach einem schnellen Anstieg wird gemäß der Literatur nach etwa 15-20 Stunden ein Plateau mit Schichtdicken von rund 100 nm erreicht. Konstante Schichtdicken können somit einfach durch Stehenlassen über Nacht unter Schutzgas erreicht werden, wobei sehr homogene Filme gewonnen werden. Diese PEGMA-Filme sind resistent gegenüber der unspezifischen Absorption von Proteinen auf Oberflächen (Beyer, 2005; Beyer et al., 2006) und ermöglichen daher den Nachweis von Antigen-Antikörper Interaktionen, ohne zusätzlich Blockierungsreagenzien einsetzen zu müssen (Stadler et al., 2008b). Eine weitere charakteristische Eigenschaft ist die hohe Funktionalitätsdichte. Im Maximum können bis zu 40 nmol funktionelle Startgruppen pro cm^2 auf der Oberfläche präsentiert werden. Zudem weisen die Polymerfilme gute optische Eigenschaften auf, was für optische Nachweisverfahren relevant ist

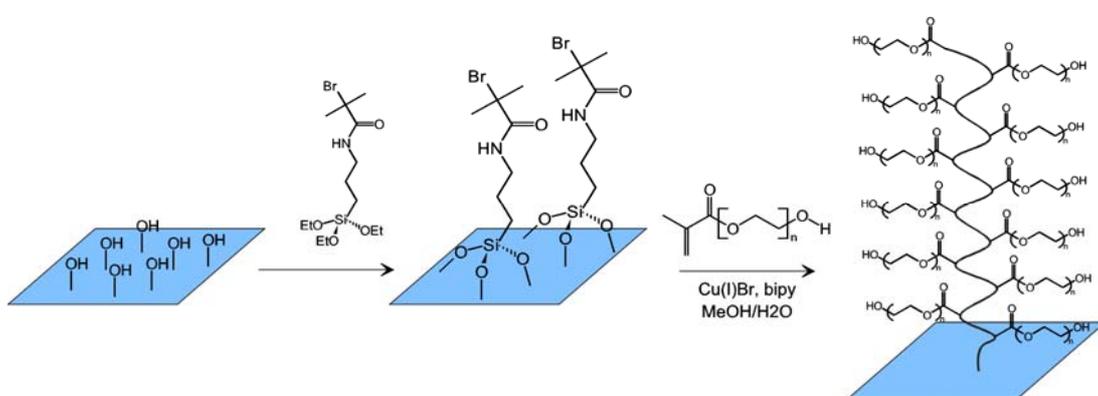


Abb. 13 Schematischer Ablauf der Filmsynthese: Im ersten Schritt wird ein Monolayer des Br-substituierte Silans aufgebracht, im zweiten Schritt wird der PEGMA-Film durch Cu(I)-induzierte ATRP-Graftpolymerisation synthetisiert.

(Beyer, 2005; Beyer et al., 2006). In jüngster Vergangenheit wurden ebenfalls Co-Polymerfilme aus Poly(ethylenglycol)-methacrylat und Methylmethacrylat (MMA) eingesetzt. Diese Filme zeigen vergleichbare Eigenschaften wie die reinen PEGMA-Filme und können ebenfalls einfach durch ATRP synthetisiert werden (Stadler et al., 2008b).

1.2.4.3 Der Peptidlaserdrucker

Der Prototyp des Peptidlaserdruckers orientiert sich am OKI LED-Farbdrucker C7400. Für den farbigen Ausdruck von Dokumenten werden dort die vier Grundfarben Schwarz, Cyan, Magenta und Gelb (CMYK) nacheinander durch hintereinander angeordnete Tonerkartuschen auf die Unterlage aufgebracht. Die Funktionsweise eines Farblaserdruckers ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt. Das wichtigste Bauteil eines Laserdruckers ist die Bild- oder Belichtungstrommel. Diese Walze trägt eine dünne Schicht eines photoleitenden Polymers und wird daher auch als OPC-Walze (organic-photo-compound) bezeichnet. Diese Walze wird über einen Koronadraht oder über eine primäre Ladungswalze elektrisch aufgeladen. Eine hochauflösende Lichtquelle [Licht-emittierende Dioden (LEDs) oder ein Laser] schreibt dann das gewünschte Druckmuster auf die OPC-Walze. Durch das einfallende Licht wird ein Ladungstransport innerhalb des Polymers hervorgerufen und die belichteten Orte auf der Bildtrommel durch Erdung entladen. Die Tonerpartikel werden in der Tonerkartusche durch Reibung zwischen schaumstoffbeschichteten Ladungs- und Transportwalzen elektrostatisch aufgeladen. Die Ladung entspricht der Ladung der Bildtrommel. Mit Hilfe eines Rechens wird eine dünne Partikelschicht erzeugt, die an der Transportwalze haften bleibt. Beim Passieren der OPC-Walze springen die Partikel auf die entladenen Bereiche der Bildtrommel über und erzeugen dort ein latentes Druckbild. Abschließend werden die Tonerpartikel durch das Anlegen von Spannung und

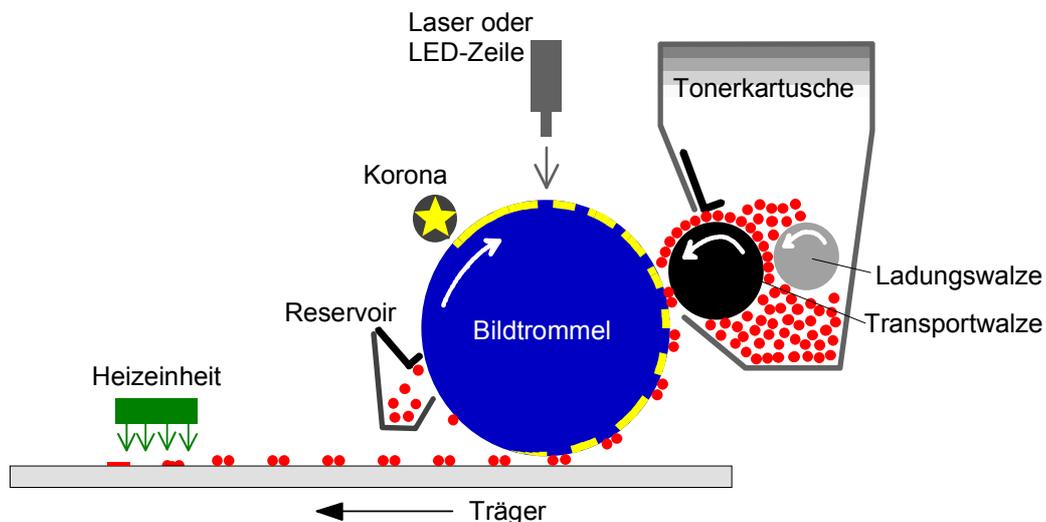


Abb. 14 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Laserdruckers: Die Tonerpartikel werden durch Reibung an der Ladungswalze in der Tonerkartusche geladen und über die Transportwalze zur Bildtrommel transportiert. Die Toner springen auf die Bildtrommel in dem durch die Lichtquelle (LED-Zeile oder Laser) vorgegebenen Muster. Anschließend werden sie auf das Trägermaterial übertragen und durch Hitze fixiert.

teilweise durch direkten Kontakt auf den gewünschten Träger übertragen (Folie, Papier) und durch Hitze endgültig fixiert. Überschüssige Tonerpartikel werden von der Bildtrommel entfernt und die photoleitende Schicht vollständig entladen. Mit dem erneuten Aufladen der Bildtrommel beginnt ein neuer Druckzyklus.

Ebenso wie der OKI LED-Farbdrucker C7400 basiert der Peptidlaserdrucker (Abb.15) auf dem Tandemprinzip, wobei die 20 Druckwerke inklusive der Tonerkassetten linear hintereinander angeordnet sind. Derzeit können mit diesem Prototypen große Glasplatten von 21 x 22 cm² oder alternativ bis zu 10 handelsübliche Objektträger gleichzeitig bedruckt werden. Dazu werden die Träger



Abb. 15 Konstruktionszeichnung des Peptidlaserdruckers, Führungsschiene des Probenhalters (schwarz), der angefertigte Prototyp (von links nach rechts).

durch Anlegen eines Unterdrucks auf einem Probenhalter fixiert und mikrometerngenau in horizontaler Richtung an den parallel ausgerichteten Druckwerken vorbeigeführt. Die Steuerung der LED-Zeilen (ca. 10.000 pro Druckwerk auf 20 cm Breite) der einzelnen Druckwerke erlaubt dabei Druckdichten von bis zu 400 Spots/cm². Dabei beträgt das Rastermaß ca. 510 µm und die Größe der Spots 250 µm x 250 µm². Für entsprechende Anwendungen kann die Spotgröße variiert werden oder auch ein flächiger Druck erfolgen.

1.2.4.4 Mikrochips

Eine weitere Methode zur Adressierung von Aminosäurepartikeln basiert auf einem Mikrochip-Konzept. Der Begriff „Chip“ oder „Biochip“ wird in der Biologie vielfach verwendet. Er beschreibt meist einen Glasträger im Objektträgerformat (2,6 x 7,6 cm²), auf den Moleküle kombinatorisch synthetisiert oder gespottet werden (z.B. auch Genchips). Bei der hier beschriebenen Methode zur Peptidsynthese muss der Begriff „Chip“ jedoch nicht nur als Träger einer Molekülbibliothek verstanden werden, sondern als ein im Rahmen der Halbleitertechnologie hergestellter Mikrochip. Dieser Mikrochip besteht aus einzelnen elektronisch ansteuerbaren Pixelelektroden, auf denen sich lokal begrenzt elektrische Ladungsfelder erzeugen lassen. Abbildung 16 (rechte Seite) zeigt einen solchen CMOS-Chip (Complementary Metal Oxide Semiconductor; komplementärer Metalloxid-Halbleiter) auf einer Platine.

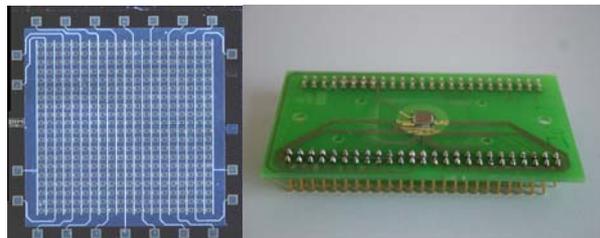


Abb. 16 Platinenchip in der Aufsicht (links), CMOS-Chip auf einer Platine (rechts)

Der dargestellte Platinenchip (Abb.

16, linke Seite) hat eine Größe von 4 x 4 mm². Das Elektrodenrastermaß beträgt 100 µm, was einer Dichte von 10.000 Pixelelektroden/cm² entspricht. Während der Entwicklung des Chip-Konzeptes

wurden verschiedene Mikrochips konstruiert und auf ihre Eignung getestet. Diese Mikrochips wurden in Kooperation mit der Gruppe *Technischen Informatik* am *Kirchhoff Institut für Physik (Universität Heidelberg)* konzipiert, an der *TU Dresden*, und dem *Institut für Mikroelektronik in Stuttgart* angefertigt. Die CMOS-Chips wurden über das *Europractice* Konsortium prozessiert (Prozess: AMIS C07M I²T100) und von *AMI Semiconductors* (seit März 2008 *ON Semiconductors*[®]) hergestellt. Es stellte sich heraus, dass sowohl das Design der Chips (z.B. Größe der Elektroden, anlegbare Spannung) als auch die Zusammensetzung der verschiedenen Lagen (SiO₂, Aluminiumoxid, Si₃N₄-Passivierung) maßgeblich die Peptidsynthese (Partikelübertrag, Stabilität der aufgebrachtten PEGMA-Filme) und die Stabilität der integrierten Schaltungen beeinflussen. Die genauen Zusammenhänge und das jeweilige Chipdesign wurden in verschiedenen Publikationen diskutiert (Nesterov-Müller, 2006; König, 2005). Die Peptidsynthese erfolgt durch die selektive Abscheidung der einzelnen Partikelkollektive auf den Pixelelektroden (Abb. 17). Dazu werden die Partikel mit Hilfe einer sog. Aerosolkammer in ein homogenes Aerosol überführt (Nesterov et al., 2008). Dort werden die Partikel durch Luftdruck beschleunigt und durch die Reibung an die Wände eines Zyklotrons triboelektrisch aufgeladen (Nesterov et al, 2007). Die geladenen Partikel im Aerosol werden von den induzierten Ladungsfeldern auf den einzelnen Pixelelektroden des Chips angezogen (Abb. 17) und lagern sich spezifisch ab (Nesterov-Müller, 2006; König, 2005; Beyer et al. 2007). Die Partikel bleiben durch hohe

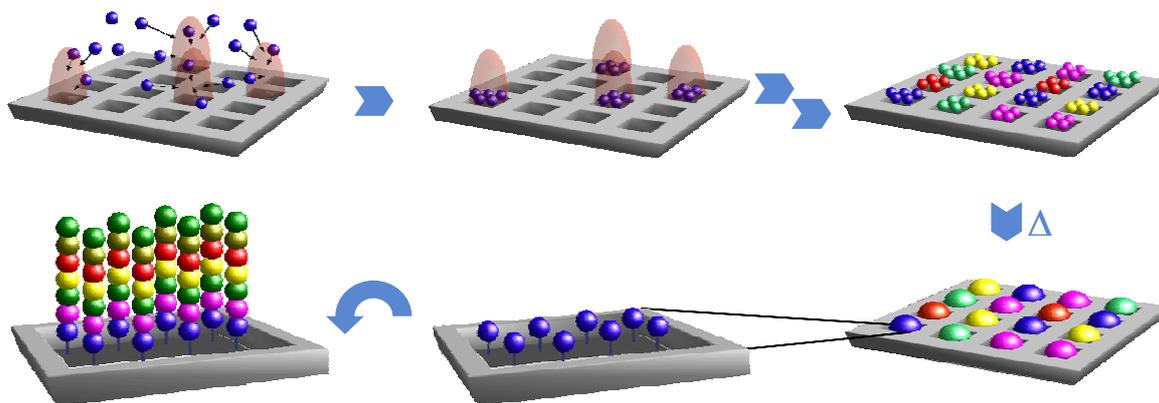


Abb. 17 Schematische Darstellung der selektiven Ablagerung der Aminosäurepartikel durch die Induktion von Ladungsfeldern auf den Pixelelektroden des Mikrochips; nacheinander werden die verschiedenen Partikelkollektive auf der Oberfläche abgelagert und anschließend in der Hitze gekoppelt. Durch wiederholte Syntheseyklen entstehen auf jeder individuellen Elektrode Peptide mit definierter Aminosäureabfolge (Felgenhauer et al., 2008)

Adhäsionskräfte an den Elektroden haften, so dass in weiteren Schritten verschiedene Aminosäurepartikel sukzessiv abgelagert werden können (Abb. 17). Nach diesem Adressierungsschritt folgt parallel das Ankoppeln der verschiedenen Aminosäuren durch Schmelzen der Partikel (Abb. 17). Abbildung 18 zeigt Mikroskopiebilder von abgelagerten und anschließend geschmolzenen Aminosäurepartikeln. Die ölige Schmelze bildet dabei Reaktionsräume, die die Elektroden vollständig bedecken. Die verflüssigte Matrix der Partikel ermöglicht die Kopplung der Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester an die Oberfläche der Chips (Abb. 17). Im nächsten Schritt werden die Chips gewaschen, um die Bestandteile der Tonermatrix zu entfernen. Die gebundenen Aminosäuren werden gemäß der Fmoc-Peptidsynthese prozessiert (vergleiche auch Abb. 11), um die

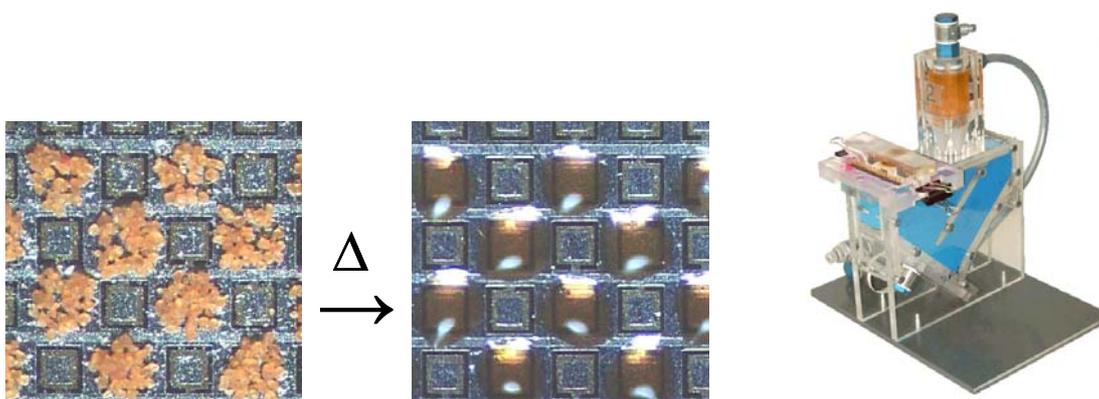


Abb. 18 Ablagerung der Aminosäurepartikel im schachbrettartigen Muster, in der Hitze bilden die Partikel eine Schmelze auf den zuvor adressierten Elektroden; Aerosolkammer (von links nach rechts)

Bindung der nächsten Aminosäure zu ermöglichen. Anschließend wird eine neue Lage Aminosäurepartikel auf den Elektroden abgelagert und der Syntheseprozess wiederholt. In repetitiven Kopplungszyklen werden die gewünschten Peptide synthetisiert (Abb. 17). Durch die variable Ansteuerung der einzelnen Elektroden kann auf jeder Pixelelektrode eine andere Aminosäureabfolge hergestellt werden. Diese Methode ermöglicht eine weitere Miniaturisierung der bestehenden Methoden zur kombinatorischen Synthese von Peptidarrays, da die Auflösung dieser Arrays nur noch durch die Partikelgröße und das Rastermaß der Pixelelektroden begrenzt ist (Beyer et al., 2007).

Um die einzelnen Aminosäuren koppeln zu können, werden die Chipoberflächen (Aluminium- oder Siliziumoxid) silanisiert und mit dem bereits beschriebenen PEGMA-Film modifiziert (Stadler et al., 2007). Dieses Polymer kann einfach durch das Anknüpfen eines Linkers funktionalisiert werden, so dass zur Kopplung der Aminosäuren freie Aminogruppen zur Verfügung stehen.

1.3 Anwendung von Peptidbibliotheken

Das menschliche Genom enthält 30.000 bis 40.000 proteinkodierende Gene (International Humane Genome Sequencing Consortium, 2001). Aus einem dieser Proteine kann jedoch durch mRNA-Splicing oder posttranslationale Modifikationen wiederum eine Vielzahl weiterer Varianten entstehen. Bei der Untersuchung dieser Vielzahl von Proteinen können Peptidbibliotheken eine wichtige Rolle übernehmen. Lineare Epitope ermöglichen die Betrachtung kurzer Abschnitte der Primärstruktur des jeweiligen Proteins, wobei die Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und höhere Ordnungen nicht berücksichtigt werden. Allerdings sind z.B. für die Antikörperbindung ohnehin oft nur kurze Epitope von ca. 10 Aminosäuren nötig. Auch an Rezeptor-Ligand-Bindungen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip sind häufig nur begrenzte Bereiche auf dem Protein beteiligt (Min & Mrksich, 2004). Hier würden sich insbesondere durch das Auffinden inhibitorisch wirkender Peptide wertvolle Anknüpfungspunkte für das Verständnis der Proteinfunktion ergeben.

Peptidbibliotheken, die durch Split-Mix-Synthese oder SPOT-Synthese hergestellt wurden, wurden trotz der beschriebenen technologischen Nachteile bereits in verschiedenen Anwendungen eingesetzt. Einige dieser Applikationen sind in den folgenden Kapiteln dargestellt (Frank, 2002a;

Eichler, 2005; Walsh & Chang, 2004), aus denen sich die in der Zielsetzung formulierte Aufgabenstellung ergab.

1.3.1 Proteinkinase-Assay

Die Phosphorylierung von Proteinen und Peptiden hat Einfluss auf verschiedene essentielle Zellfunktionen wie z.B. die Signaltransduktion, den Metabolismus der Zelle oder die Zellteilung (Bossemeyer, 1995; Johnson, 1996) und ist daher eine der wichtigsten Schlüsselmodifikationen der Zelle (Schutkowski et al, 2004). Die Phosphorylierung wird durch eine Vielzahl von Proteinkinasen katalysiert, wenn zum einen ein Protein mit spezifischer Phosphorylierungsstelle (bspw. eine spezifische Aminosäuresequenz) und zum anderen die Kinase im aktiven Zustand vorliegen. Durch die spezifische Anbindung einer Phosphatgruppe werden in der Regel Faltung und Funktion des Zielproteins beeinflusst. Dadurch kann z.B. die Aktivität von Enzymen und ihre Spezifität gegenüber einem Substrat reguliert, die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle bestimmt oder die Bildung oder der Abbau von Proteinkomplexen herbeigeführt werden (Johnson et al., 2001).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass Proteinkinasen - nach G-Protein-gekoppelten Rezeptoren - die zweitgrößte Gruppe an Zielstrukturen für die Entwicklung von Medikamenten in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie bilden (Garber, 2006). Im Besonderen wird die Charakterisierung der verschiedenen Proteinkinasen im Bezug auf ihre katalytische Aktivität, physiologische Funktionalität und Spezifität zur Entwicklung von Wirkstoffen vorangetrieben. Gleiches gilt für die Identifizierung kurzer Peptide, die als spezifische Substrate (Phosphorylierungsstelle) für eine bestimmte Kinase dienen oder als deren Inhibitor fungieren (Kemp & Pearson, 1990). Insgesamt liegen 30 bis 50 % aller humanen Proteine als Phosphoproteine vor und mehr als 100.000 potentielle Phosphorylierungsstellen wurden im menschlichen Proteom bereits identifiziert (Kalumne et al., 2003). Allerdings konnte erst ein kleiner Teil dieser Phosphorylierungsstellen spezifischen Kinasen (2% des humanen Proteoms) zugeordnet werden (Kobe et al, 2005). In verschiedenen Datenbanken (z.B. *PhosphoBase*, *SWISS-PROT*) werden die spezifischen Phosphorylierungsstellen von Proteinen gesammelt (Kreegipuu et al., 1999; Bairoch & Apweiler, 2000) bzw. können durch bestimmte Algorithmen aus Datenbanken extrahiert werden (Schwartz & Gygi, 2005; Yaffe et al., 2001). Die daraus gewonnenen Ergebnisse müssen jedoch durch *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen auf ihre Relevanz überprüft werden.

Phage-Display-Bibliotheken (Smith & Petrenko, 1997), in denen die Peptide auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert werden, erlauben die Hochdurchsatzsuche und Identifizierung von spezifischen Kinasesubstraten in Bibliotheken mit mehreren Millionen Peptidkandidaten. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass die Peptide zusammen mit anderen Hüllproteinen auf der Phagen-Oberfläche präsentiert werden, was eine Erkennung durch eine Proteinkinase beeinflussen kann. Bei der chemischen Peptidsynthese an Festphasen tritt dieses Problem nicht auf, da die Peptide isoliert vorliegen. In den vergangenen Jahren wurden daher verschiedene Methoden vorgestellt, wonach Peptidbibliotheken durch SPOT-Synthese hergestellt und nach Kinasesubstraten durchsucht wurden (Schutkowski et al, 2005). *Kramer et al. (1994)* und *Tegge et al.(1995)* synthetisierten Peptidarrays auf Zelluloseträgern. *Schutkowski et al. (2004)* und *Panse et al. (2004)*

nutzten modifizierte Objektträger und *Houseman et al. (2002)* verwendeten funktionalisierte Goldoberflächen als Trägermatrix. *Tegge et al. (1995)* bspw. synthetisierten Peptidbibliotheken bestehend aus Oktameren, bei denen zwei Positionen in der Aminosäuresequenz definiert waren (Ac-XXXAs₁As₂XXX; X = Gemisch aus den 20 proteinogenen Aminosäuren). Die resultierende Bibliothek mit 400 Spots/Träger bestand folglich aus $2,56 \times 10^{10}$ Peptidvarianten und hatte eine mit den Phage-Displays vergleichbare Komplexität. In einem ersten Schritt wurden die Sequenzen Ac-XXXRRXXX und Ac-XXXRKXXX als beste Substrate für die PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) und die PKG (cGMP-abhängige Proteinkinase) unter Verwendung von radioaktivem [γ -³²P]ATP identifiziert. Dabei entfiel die arbeitsaufwendige Dekodierung durch *Edman*-Abbau bzw. die genetische Identifizierung von Phagen, da die spezifische Substratsequenz einfach anhand der Position des radioaktiven Signals auf dem Array abgelesen werden konnte. Durch die schrittweise Bestimmung der einzelnen Aminosäuren konnten die optimalen Substratsequenzen (Ac-KRAERKASIY und Ac-TQKARKKSNA) bestimmt werden (Tegge et al., 1995).

Allgemein katalysieren Proteinkinasen die spezifische Bindung einer γ -Phosphatgruppe des ATPs (Adenosintriphosphat) an eine spezifische Hydroxylgruppe des Zielproteins (Abb. 19) (Lehninger & Nelson, 1998). Dabei werden die Kinasen entsprechend ihrer spezifischen Phosphorylierungsstellen in Serin-Threonin-Proteinkinasen und Tyrosin-Proteinkinasen unterteilt. Eine weitere Einteilung in verschiedene Untergruppen erfolgt anhand ihrer Aminosäuresequenz. Die in einer Untergruppe zusammengefassten Proteinkinasen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten, haben eine ähnliche Spezifität und werden auf vergleichbare Art reguliert. *Hanks & Hunter (1995)* unterteilen die Serin/Threonin-Proteinkinasen in drei Klassen mit insgesamt 10 Subklassen. Bei den Tyrosin-Proteinkinasen wird grundsätzlich zwischen den transmembranen (sieben Subklassen) und nicht-transmembranen (fünf

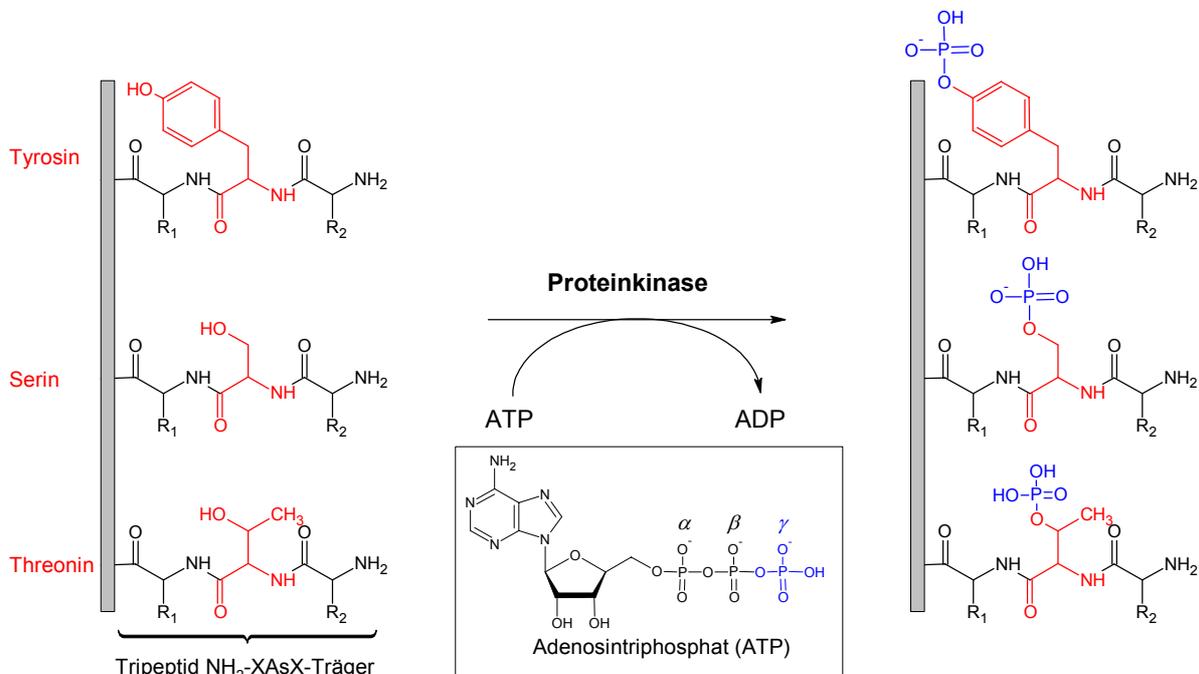


Abb. 19 Schematische Darstellung der Übertragung der γ -Phosphatgruppe (blau) des Adenosintriphosphats an die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Tyrosin, Threonin oder Serin (rot) innerhalb eines immobilisierten Tripeptides (XAsX; X = variable As) durch eine Proteinkinase.

Subklassen) Kinasen unterschieden. Es können jedoch auch seltene Aminosäuren wie das Hydroxyprolin oder andere funktionelle Gruppen modifiziert werden, so z.B. Stickstoff- (Histidin, Lysin), Schwefel- (Cystein) oder Acylgruppen (Glutaminsäure, Asparaginsäure) (Yaffe et al, 2001).

Auf einem Array kann die spezifische Phosphorylierung vergleichsweise einfach durch die Verwendung von radioaktivmarkiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Adenosinriphosphat; Abb. 19) oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern (z.B. anti-Phosphoserin-Antikörper) detektiert werden.

1.3.1.1 Struktur und Regulierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Da die katalytische Phosphorylierung essentiell für das Überleben der Zelle ist, werden die Funktionen der Proteinkinasen stark reguliert. Aus diesem Grund bestehen Proteinkinasen meist aus großen Komplexen verschiedener Subdomänen, bei denen die katalytisch aktive Domäne nur einen kleinen Teil des Gesamtkomplexes einnimmt. Die Zusammensetzung dieser Proteinkomplexe ist hoch dynamisch, so dass sie zwischen inaktiven und aktiven Konformationen und zwischen ihren Wirkorten in der Zelle wechseln können (Taylor et al., 2005).

Unter den Serin-Threonin-Proteinkinasen wird die gut charakterisierte cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A) - die bereits 1968 entdeckt wurde (Walsh et al., 1968) - oft als Prototyp dieser Proteinkinase-Familie angesehen und soll hier als Beispielkinase zum besseren Verständnis betrachtet werden. Das inaktive Holoenzym der cAMP-abhängigen Proteinkinase besteht aus zwei regulierenden (R) und zwei katalytischen Untereinheiten (C). Die gleichzeitige Bindung des Botenstoffes cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) an zwei Bindungsdomänen der R-Untereinheit induziert eine Konformationsänderung, durch die die C-Untereinheiten freigesetzt werden (Abb. 20) (Johnson et al., 2001). Nur in diesem Zustand sind die Substratbindungsstellen der C-Untereinheiten frei zugänglich, was die katalytische Phosphorylierung eines Proteins ermöglicht

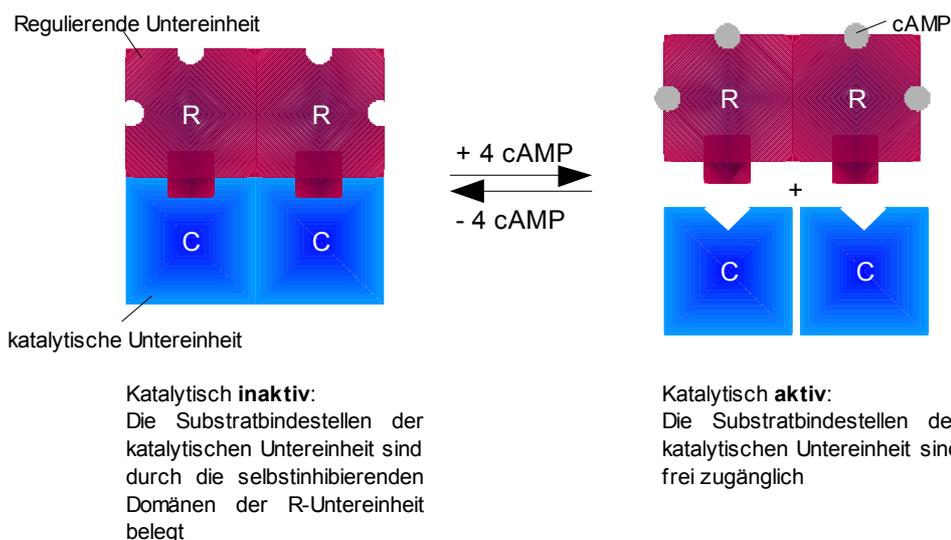


Abb. 20 Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase; Die Bindung von 4 cAMP-Molekülen an die R-Untereinheiten induziert eine Konformationsänderung des Holoenzym, wodurch sich die C-Untereinheiten vom Proteinkomplex trennen; die freien C-Untereinheiten sind aufgrund ihrer freien Substratbindungsstelle katalytisch aktiv und können Proteine phosphorylieren (Lehninger & Nelson, 1998).

(Lehninger & Nelson, 1998). Die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase bindet spezifisch die γ -Phosphatgruppen des ATPs an die Hydroxylgruppe der Serin-Seitenkette, wenn diese Aminosäure in der Sequenz RRXS (X = variable Aminosäure) vorliegt (Kemp & Pearson, 1990; Kenelly & Krebs, 1991). Neben der Konformation des Proteinkomplexes ist die katalytische Aktivität des Enzyms abhängig von der Erkennung des Substrates, von der Anwesenheit von Pseudosubstraten, der Lokalisation in der Zelle, der Interaktion mit der Zielstruktur, Cofaktoren und Regulatoren, um nur einige zu nennen (Engh & Bossemeyer, 2001).

1.3.2 Metallopeptide

Eine ebenso wichtige posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Komplexierung von Metallionen. Diese Cofaktoren haben eine entscheidende Aufgabe bei der Steuerung der Proteinaktivität in allosterischen und katalytischen Domänen (Licini & Scrimin, 2003). Im Zentrum von Enzymen führen sie z.B. zur Lewis-Säure/Lewis-Base-gestützten Katalyse oder erzeugen Radikale, die zu einer katalytischen Umwandlung von Substratmolekülen führen können. Zudem sind redoxaktive Metallzentren für den Transport von Elektronen für den Energiehaushalt wichtig (Winter, 1996; Kaim & Schwederski, 1995).

Peptidbibliotheken im Arrayformat erlauben die Untersuchung von Metallopeptiden, die bspw. die katalytische Domäne eines Proteins darstellen (Kramer et al., 1994; Francis et al., 1996; Discherl & König, 2008). Zudem können katalytisch aktive Metallopeptide zielgerichtet für biotechnologische Anwendungen entwickelt (Berkessel, 2003; Licini & Scrimin, 2003) oder spezifische Komplexbildner von radioaktiven Metallisotopen zur Entwicklung von Radiopharmazeutika identifiziert werden (Kramer et al., 1994; Malin et al., 2006). Je nach Anwendung steht dabei die kinetische bzw. thermodynamische Stabilität, die Spezifität oder die Aktivität der Komplexe im Vordergrund.

Bei der Konzeption derartiger Bibliotheken wird häufig auf Aminosäuresequenzen zurückgegriffen, von denen bekannt ist, dass sie für die Koordinierung von bestimmten Metallionen charakteristisch sind (Licini & Scrimin, 2003; Xing & DeRose, 2001). Grundsätzlich sind für die Komplexierung von Metallionen bestimmte funktionelle Gruppen verantwortlich. Die Amidgruppe der Peptide, die durch die Verknüpfung der Aminosäuren entstanden ist, ist nur zur schwach ausgeprägten Metallkoordination fähig. Als Metall-Liganden sind vor allem die funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren Histidin, Methionin, Cystein, Tyrosin, Glutamat und Aspartat geeignet. Ebenfalls für die Metallkoordination relevant sind Aminosäuren mit einfachen Hydroxyl- und Aminosäurefunktionen wie etwa Serin, Threonin, Lysin und Tryptophan. In der Histidin-Seitenkette wird meist das basische δ -N- und zum Teil auch das ϵ -N-Atom im Imidazolring zur Komplexierung genutzt. Nach einer Deprotonierung des Histidins können jedoch auch beide Stickstoffatome zur Bindung des Metallions zur Verfügung stehen. Methionin koordiniert über das neutrale δ -Schwefelatom des Thioethers. Cystein enthält nach Deprotonierung ein negativ geladenes γ -Thiolatzentrum, welches dann ggf. sogar verbrückend Metallzentren koordinieren kann. Tyrosin koordiniert primär über das negativ geladene Phenolat-Sauerstoffatom. Eine Metallbindung kann jedoch auch durch die phenolische Neutralform sowie durch ein oxidiertes Tyrosyl-Radikal erfolgen. Glutamat und Aspartat koordinieren über die negativ geladenen Carboxygruppe. Diese Carboxylate

können als terminale, als chelatbildende oder als verbrückende Liganden fungieren. Nehmen nun die funktionellen Gruppen der koordinationsfähigen Aminosäuren in einer Proteinsequenz eine geeignete und durch die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins festgelegte Position ein, binden diese Metallionen mit hoher Selektivität und Stabilität. Oft bedarf es sogar einer definierten Aminosäureabfolge, um die Koordinierung eines bestimmten Metallions hervorzurufen (Kaim & Schwederski, 1995). Zusätzlich kann die bestehende Vielfalt an koordinierenden Strukturmotiven bei der Synthese von Peptidbibliotheken erweitert werden, indem die vorhandenen Aminosäurereste modifiziert (z.B. methyliert, hydroxyliert, phosphoryliert) oder nicht-natürliche Aminosäuren z.B. mit Phosphinseitengruppen eingeführt werden (Licini & Scrimin, 2003).

1.3.2.1 Katalytische Metallopeptide und -peptidderivate

Peptidbibliotheken erlauben die Suche nach katalytischen Metallopeptiden, deren Sequenzen sich z.B. an nativen katalytischen Metall-Protein-Komplexen orientieren. Weiterführend können Katalysatoren für Reaktionen entwickelt werden, die kein biologisches Gegenstück und somit keine Sequenzvorinformation haben (Licini & Scrimin, 2003). *Francis & Jacobsen (1999)* konnten in einer durch Split-Mix-Synthese generierten kombinatorischen Bibliothek funktionelle Metallopeptidderivate identifizieren, die sich als neuartige Katalysatoren für die Epoxidierung von Alkenen eignen. *Berkessel et al.* beschrieb Metallopeptide bzw. an den Endgruppen modifizierte Metallopeptide, die zur hydrolytischen Spaltung von Phosphoesterbindungen befähigt sind (Berkessel & Héroult, 1999; Berkessel & Riedl, 2000; Berkessel, 2003). Die Spaltung der Phosphat-Modellverbindungen führte dabei zur Bildung von farbigen Reaktionsprodukten, die an die Oberfläche des Polymerbeads („one-bead-one-compound“) präzipitieren. Katalytisch aktive Peptide konnten anhand der Färbung einzelner Beads isoliert und mittels *Edman*-Sequenzierung dekodiert werden (Berkessel & Héroult, 1999; Berkessel & Riedl, 2000; Berkessel, 2003). Neben den bereits erwähnten Beispielen konnten weitere aktive Katalysatoren mit Hilfe von kombinatorischen Bibliotheken identifiziert werden (Licini & Scrimin, 2003; Berkessel, 2003). Die Synthese und Analyse der katalytischen Peptide und Metallpeptide erfolgte an Polymerbeads oder in Gel-basierten Assays. Bis dato wurden jedoch nur wenige Substanzbibliotheken im Arrayformat für die Suche nach katalytischen und metallhaltigen Peptiden eingesetzt (Licini & Scrimin, 2003).

1.3.2.2 Nickel-bindende Peptide

Die Verteilung von Nickelionen im Organismus wird unter anderem durch das ATCUN-Motiv [*amino terminated Cu(II)- and Ni(II)-binding motif*] reguliert. Dieses Motiv konnte N-terminal in Albuminen verschiedener Organismen, Histonen, Neuromedins C und K, sowie in Protamin und Histatin in menschlichen Spermien nachgewiesen werden (Gizzi et al.; 2005; Harford & Sakar 1997). Es bindet spezifisch Cu(II)- und Ni(II)-Ionen und gibt die gebundenen Ionen leicht an adäquate Liganden an deren Wirkorten wieder ab (de Silva et al.; 2004). Diese Transportmechanismen und die daraus resultierenden Einwirkungen auf den physiologischen Metabolismus sind Gegenstand vieler Untersuchungen (Karavelas et al., 2005). Eine Unterversorgung des menschlichen Körpers mit Nickel

kann zu Wachstumsverzögerung und Dermatitis (Kaim & Schwederski, 1995) führen, während eine Überdosierung toxische Reaktionen hervorrufen kann (Winter, 1996). Um Proteindomänen zu identifizieren, die mit Nickelionen interagieren, kann ein einfacher qualitativer Nachweis über Ligandenaustausch erfolgen (Strähle & Schweda, 1995). Nickelionen bilden mit Dimethylglyoxim (DMG) stabile und charakteristisch rotgefärbte Komplexe $[\text{Ni}^{2+}-(\text{DMG})_2]$. Diesen Nachweis nutzte z.B. *Kramer et al.* (1994), um mit einem auf Zellulose synthetisierten Peptidarray Ni^{2+} -Bindungsmotive zu identifizieren. Innerhalb einer Hexapeptid-Bibliothek mit 400 Peptidspots, wobei jeder Spot ein Peptidgemisch der Sequenz $\text{XAs}_1\text{XAs}_2\text{XX}$ (X = Gemisch aus den 20 proteinogenen Aminosäuren) repräsentierte, detektierte er eine vermehrte Bindung der Ni^{2+} -Ionen an Peptide mit Lys, His, Cys oder Arg in der zweiten (As_1) und vierten Position (As_2). *Francis et al.* (1996) setzten die gleiche Nachweismethode ein, um Ni^{2+} -Ionen bindende Peptidderivate innerhalb einer kombinatorisch synthetisierten Split-Pool-Bibliothek zu bestimmen.

1.3.2.3 $^{99\text{m}}$ Technetium-bindende Peptide

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden erstmals radioaktive Nuklide und Verbindungen zur nicht-invasiven Darstellung biochemischer und physiologischer Prozesse genutzt. *De Hevesy* nutzte z.B. ^{32}P zur *in vivo*-Darstellung des Phosphormetabolismus in Ratten und erhielt für seine Arbeiten 1943 den Chemie-Nobelpreis (Bruus-Jensen, 2005). Dieses Tracerkonzept ist heute zur Grundlage des Einsatzes künstlich erzeugter Radionuklide in verschiedenen analytischen, diagnostischen und therapeutischen Verfahren geworden. Dabei werden Radiotracer allgemein definiert als molekulare Einheiten, die sehr geringe Mengen eines oder mehrerer Radionuklide enthalten und deren

Strahlungsaktivität diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden (Bruus-Jensen, 2005). Dabei werden heute vermehrt Verbindungen eingesetzt, die sich zielgerichtet an eine spezifische Struktur (z.B. an überexprimierte Rezeptoren von Tumorgewebe) anlagern. Diese Erkennung wird durch bioaktive Moleküle wie z.B. Peptidliganden oder monoklonale Antikörper erreicht, wobei die jeweiligen Radioisotope als stabile Komplexe über einen Linker an das spezifisch bindende Molekül fusioniert (bifunktionelle Verbindung) oder in die Struktur des

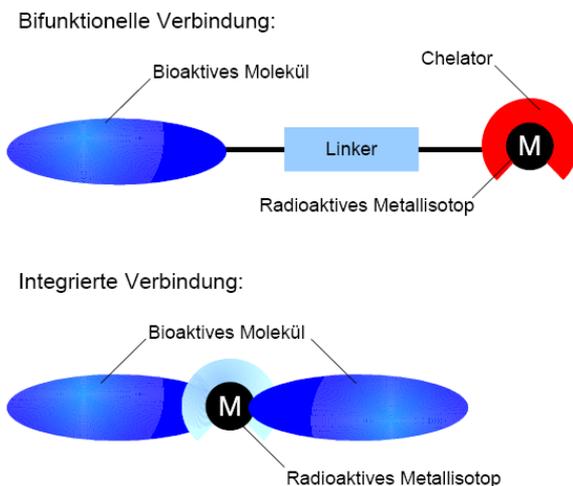


Abb. 21 Konzepte zur Synthese von Radiotracer (Liu & Edwards, 1999).

Erkennungsmoleküls selbst integriert werden (Abb. 21) (Liu & Edwards, 1999; Dilworth & Parrot, 1998).

Bei radiotherapeutischen Wirkstoffen werden fast ausschließlich β -Strahler eingesetzt, deren starke Strahlung lokal z.B. auf Tumore einwirkt. In der Diagnostik wird die Verteilung der Radiotracer im

Körper des Patienten, deren Anreicherung in bestimmten Gewebestrukturen und Organen (z.B. Schilddrüse) und deren Passage durch die Organe zur Überprüfung ihrer Aktivität (z.B. Nieren) genutzt. Dabei werden Verbindungen eingesetzt, die entweder γ -Strahler (z.B. ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{201}Tl , ^{67}Ga , ^{81m}Kr) oder Positronen emittierende Radioisotope (z.B. ^{11}C , ^{18}F) enthalten. Für die Bildgebung wird z.B. die γ -Szintigraphie bzw. das moderne Schnittbildverfahren SPECT (**S**ingle **P**hoton **E**mission **C**omputer **T**omography) und die PET (**P**ositron **E**mission **T**omography) eingesetzt (Dilworth & Parrot, 1998).

Eine besondere Rolle in der diagnostischen Nuklearmedizin spielt das metastabile ^{99m}Tc . Dieses Isotop zerfällt mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden und emittiert ^{99m}Tc γ -Strahlung mit einer geringen Emissionsenergie von 141 keV (Jurisson & Lydon, 1999).

Bereits 1958 bzw. 1960 wurde von *Tucker und Greene* am *Brookhaven National Laboratory (USA)* ein Generator (der sog. „*Brookhaven-Generator*“) entwickelt, dessen prinzipieller Aufbau heute in jedem kommerziell erhältlichen $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator wiederzufinden ist. Dieser besteht aus einer mit aktiviertem Aluminiumoxid gefüllten Säule als stationäre Phase, auf die eine saure ^{99}Mo -Lösung aufgebracht wird. Im sauren Milieu polymerisieren die Molybdat-Anionen zu einem stabilen Heteropolymer $\text{Al}[\text{Mo}_6\text{O}_{24}]^{\ominus}$, das an der stationären Phase adsorbiert. Mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 66\text{ h}$ zerfällt das ^{99}Mo zu ^{99m}Tc (85 %) und zu ^{99}Tc (15%) (Abb. 22) (Comagic, 2004). Das entstehende ^{99m}Tc adsorbiert ebenfalls an der Aluminiumoxidmatrix. Im Gegensatz zum ^{99}Mo bildet das ^{99m}Tc jedoch keine polymeren Strukturen aus und kann mit einer physiologischen, 0,9 %igen NaCl-Lösung als Pertechnetat eluiert werden (Comagic, 2004). Das gewonnene $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ kann direkt für die Bildgebung von Schild- und Bauchspeicheldrüse eingesetzt oder in spezifisch reagierende Radiotracer überführt werden. Diese werden für die Bildgebung von diversen Organen z.B. Herz [^{99m}Tc -MIBI (Cardiolite[®])] oder Gehirn [^{99m}Tc -ECD (Neurolite[®])] eingesetzt, während ^{99m}Tc HMPAO (Ceretech[®]) zur Überprüfung der Funktion z.B. der Nieren (^{99m}Tc -MAG₃) dient (Dilworth & Parrot, 1998). Die Halbwertszeit des ^{99m}Tc erlaubt dabei neben der Synthese des Radiotracers, eine Qualitätskontrolle des synthetisierten Produkts vor der Behandlung des Patienten. Aufgrund der geringen Emissionsenergie wird der Patient nur einer minimalen Strahlendosis ausgesetzt und durch

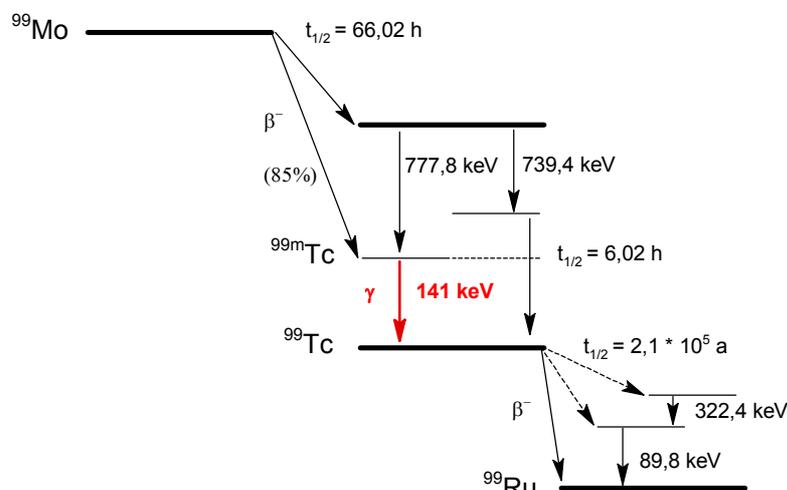


Abb. 22 Schematische Darstellung von Herstellung und Zerfall von ^{99m}Tc (Comagic, 2004).

die niedrige Halbwertszeit nur kurzzeitig belastet. Aufgrund dieser nahezu idealen Eigenschaften für bildgebende Diagnoseverfahren wird heute bei 90 % aller Scans weltweit ^{99m}Tc in verschiedenen Formulierungen eingesetzt (Dilworth & Parrot, 1998).

Obwohl dem Mediziner bereits eine große Auswahl an Radiotraceren zur Verfügung steht, besteht ein stetiger Bedarf nach hochspezifischen Markern mit hoher Funktionalität und Biokompatibilität. Die spezifische Bindung eines Zielmoleküls wird maßgeblich durch den verwendeten Linker bzw. das Biomolekül selbst und den Chelator beeinflusst. Daher zielten viele Bestrebungen darauf ab, nicht nur ein Peptid als Erkennungsmodul zu verwenden, sondern auch Aminosäuren oder Aminosäurederivate zur Anbindung des Radioisotops zu nutzen (Liu & Edwards, 1999). Zur parallelisierten Suche und Optimierung derartiger Peptide wurden folglich auch kombinatorisch hergestellte Peptidbibliotheken eingesetzt. *Kramer et al.* (1994) und *Malin et al.* (1995) z.B. durchsuchten Hexapeptidarrays nach Aminosäuremotiven, die $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ unter *in vivo*-Bedingungen stabil komplexieren. *Kramer et al.* identifizierten $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ -bindende Peptidliganden in einer Hexapeptidbibliothek mit 400 Spots, wobei jeder Spot ein Gemisch von Peptiden der Sequenz $\text{XAs}_1\text{XAs}_2\text{XX}$ (X = Gemisch aus den 20 proteinogenen Aminosäuren) enthält. Dabei wurde eine starke Bindung des $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ an Cystein (As_1 oder As_2) detektiert (*Kramer et al.*, 1994). *Malin et al.* schlossen bei weiterführenden Versuchen Cystein-haltige Hexapeptide aus und konnten durch schrittweise Identifizierung einzelner Aminosäuren ausgehend von einer Bibliothek mit 8000 Peptiden ($\text{As}_1\text{XAs}_2\text{XAs}_3\text{X}$) die Hexapeptide KGHSHV und KAMYHG als starke $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ -Binder bestimmen. Dabei stellten sie eine allgemeine Bindungspräferenz für die Aminosäuren Histidin, Lysin, Arginin und Methionin fest (*Malin et al.*, 1995). In der jüngeren Vergangenheit wird neben $^{99m}\text{Tc(V)}$ auch vermehrt auf den Technetium-Komplex $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ zurückgegriffen (Schibli & Schubiger, 2002). Das Metallzentrum des $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ befindet sich in der Oxidationsstufe +1 und besitzt eine d^6 -low-spin-Elektronenkonfiguration. Daher sind die entstehenden Komplexe kinetisch sehr stabil, wenn geeignete Liganden die oktaedrische Koordinationssphäre des Tc(I)-Carbonyl-Komplexes schließen. Im Vergleich dazu können mit vierzähligen Liganden gebildete quadratisch-pyramidale Tc(V)-Oxo-Komplexe leicht durch andere Moleküle angegriffen werden. Dies kann zum Abbau oder zur Umlagerung des Komplexes und somit zu unerwünschten Nebeneffekten bei *in vivo*-Anwendungen führen. Die Entwicklung eines Generators zur Synthese des Vorläufermoleküls $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ von *Alberto et al.* (1999) steigerte die

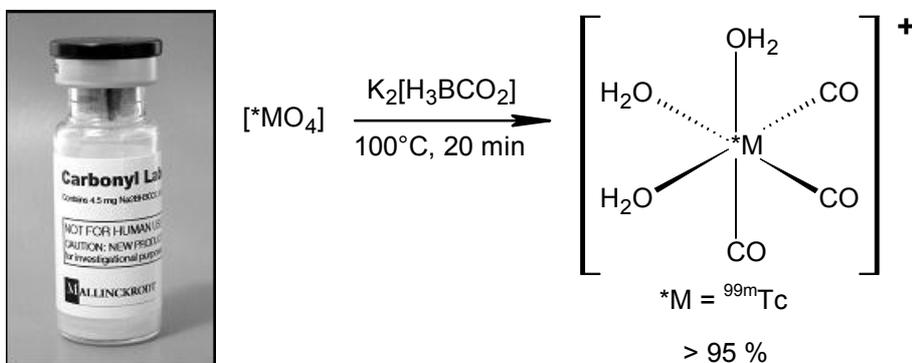


Abb. 23 Überführung des Pertechnetats im kommerziell erhältlichen IsoLink[®]-Kit (Mallinckrodt, Petten/Niederlande) in den $^{99m}[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplex (Schibli & Schubiger, 2002).

Attraktivität dieser Verbindung weiter. Dieser Generator ist kommerziell als *IsoLink*[®]-Markierungskit erhältlich (Mallinckrodt, Petten/Niederlande). Zur Herstellung des Carbonylkomplexes wird eine definierte Menge Pertechetat in physiologischer Kochsalzlösung in den Generator injiziert und dieser 15 min auf ca. 100°C erhitzt. Durch das im Generator enthaltene Dikaliumborancarbonat $K_2[H_3BCO_2]$, welches als Reduktionsmittel und parallel als Carbonylquelle dient, wird das vorliegende Pertechetat in den $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ -Komplex überführt (Abb. 23).

Inzwischen wurden erste Peptide und Peptidderivate als Bindungspartner des *fac*- $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ -Komplexes identifiziert (Waibel et al., 1999; Alberto et al., 2004; van Staveren et al., 2004; van Staveren, 2005) und auch eine Reihe von potentiellen Wirkstoffen entwickelt, die allerdings erst noch in klinischen Studien getestet werden müssen (Schibli & Schubiger, 2002). In der diagnostischen Nuklearmedizin (SPECT) konnten sich die Tc(I)Carbonyl-Komplexe daher bis dato noch nicht etablieren.

1.4 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war, erste Peptidarrays mit Hilfe des Laserdruckers zu synthetisieren und zu charakterisieren. Zudem sollten hochkomplexe Peptidbibliotheken mit zum Teil mehr als 100.000 Peptidvarianten pro Trägermatrix hergestellt und als funktionelles Werkzeug in verschiedenen biologisch relevanten Modellanwendungen getestet werden. Nach der Etablierung dieser Array-Systeme sollten - wenn möglich - weiterführende Experimente zur Identifizierung spezifischer Kinasesubstrate von weniger gut charakterisierten Proteinkinasen (z.B. HIPK2) genutzt werden. Zudem sollten die Arrays zur Bestimmung von katalytisch aktiven Metallopeptiden für die biotechnologische Forschung oder von stabilen Metall-komplexierenden Peptiden als Chelatoren für die Entwicklung von Wirkstoffen z.B. in der Nuklearmedizin verwendet werden.

In einem zweiten Projekt sollte in „proof-of-concept“-Experimenten die Realisierbarkeit der Peptidsynthese auf verschiedenen Platinenchips belegt werden, wobei Peptiddichten von bis zu 40.000 Peptidspots/cm² angestrebt wurden. In weiterführenden Versuchen sollte diese Synthesemethode auf CMOS-Chips übertragen und eine vollständige Peptidbibliothek in einer einfachen immunologischen Anwendung getestet werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Ergebnisse – Proteinkinase-Assay

2.1.1 Etablierung eines Modellsystems

Ziel war es herauszufinden, unter welchen experimentellen Bedingungen oberflächengebundene Substratpeptide von Kinasen phosphoryliert werden. Dazu wurden zwei nicht-membrangebundene Tyrosin-Kinasen (c-*Src*; Abl) und zwei Serin/Threonin-Kinasen (CK II; PKA) verwendet (Tab. 2). Die Peptide wurden auf aminoterminierte PEGMA-Filme gespottet, die mit dem SMCC-Linker modifiziert wurden (PEGMA- β Ala₃-SMCC). Dazu wurden vorsynthetisierte Modellpeptide am C-Terminus mit L-Cystein versehen (IYGEFKKKC, ADPSNIYASPFWC, QASSPQSSDVEDEC, LRRASLG) und in Phosphatpuffer (pH 7) gelöst. Anschließend wurden die Lösungen (1 mM; 0,1 mM) mit einem *BioChip Arrayer* (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) auf die funktionalisierten Objektträger gespottet (9 nl pro

Tab. 2 Für Vorversuche eingesetzte Proteinkinasen, deren spezifische Phosphorylierungsstellen sowie die vorsynthetisierten Modellpeptide

Proteinkinase (<i>Liferant</i>)	Abkürzung	Molekulargewicht [kDa]	Phosphorylierungsstelle (Modellpeptid)	Referenzen
c- <i>Src</i> -Kinase (<i>Callbiochem</i>)	c- <i>Src</i>	60	Y-G-E-F (IYGEFKKK)	<i>Songyang et al., 2005;</i> <i>Schutkowski et al., 2005,</i> <i>Houseman et al., 2002</i>
Abl-Kinase (<i>New England Biolabs</i>)	c-Abl	45	I/V/L- Y-X-X-P/F (ADPSNIYASPFW)	<i>Min & Mrksich, 2004;</i> <i>Songyang et al., 2005;</i> <i>Schutkowski et al., 2005,</i> <i>Houseman et al., 2002</i>
Casein Kinase II (<i>New England Biolabs</i>)	CK II	130	S/T-X-X-E (QASSPQSSDVEDE)	<i>Songyang et al., 2005;</i> <i>Schutkowski et al., 2004</i>
katalytische Untereinheit der cAMP-abhängige Proteinkinase (DKFZ, Heidelberg*)	PKA	41	R-X- S/T bzw. R-R/K-X- S/T (LRRASLG)	<i>Schutkowski et al., 2005 ;</i> <i>Schutkowski et al., 2004,</i> <i>Kemp & Pearson, 1990 ;</i> <i>Kenelly & Krebs, 1991;</i> <i>Houseman et al., 2002,</i> <i>Tegge et al., 1995</i>

X = variable Aminosäure

* Wie von Engh & Bossemeyer (2001) beschrieben wurde die PKA in Arbeitsgruppe *Mechanismen biomolekularer Wechselwirkungen, Deutsches Krebsforschungszentrum* (Heidelberg/Deutschland) von Dr. D. Bossemeyer gewonnen.

Spot, Abb. 24). Unter Verwendung eines *Flexiperm*[®]-Halters (*Greiner Bio-One GmbH*; Frickenhausen/Deutschland) entstehen acht Reaktionsräume (Felder A-H in Abb. 24). Die Kinasen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller angegebenen optimierten Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) in Gegenwart von [γ -³³P]ATP eingesetzt. Dabei wurde auf nicht radioaktives, sog. „kaltes“ ATP verzichtet. Nach dem Ablauf der Reaktionszeit wurde der Träger gewaschen und die radioaktiv markierten Phosphopeptide mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 25). Die PKA zeigte bei den auf PEGMA-Filmen immobilisierten Peptiden die höchste Aktivität. Neben dem eigenen spezifischen Substrat phosphoryliert die PKA in Übereinstimmung mit Literaturangaben auch das Substrat der Abl Kinase (Martin et al., 2003a). Zwei Feldern wurden mit der c-*Src* Kinase inkubiert, wobei trotz

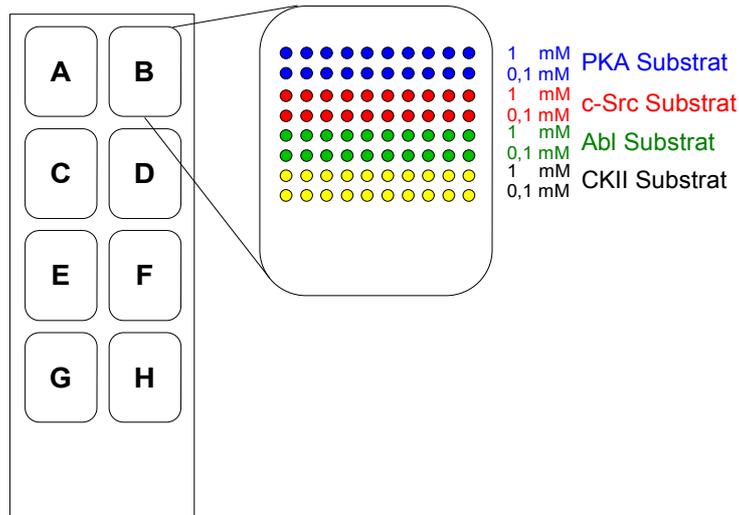


Abb. 24 Spotmuster der vier Kinasesubstrate LRRASLGC (blau, PKA Substrat), IYGEFKKKC (rot, c-Src Substrat), ADPSNIYASPWFWC (grün, Abl Substrat) und QASSPQSSDVEDE (gelb, CKII Substrat). Durch Auflegen eines Flexiperms[®] entstehen acht Reaktionsräume (Feld A-H).

identischer Waschprozeduren ein höherer Hintergrund als bei den anderen Kinasen detektiert wurde. CKII und die Abl-Kinase liefern nur schwache Signale im Vergleich zur PKA. Die geringen Signalintensitäten bzw. die geringe Aktivität von Abl, CKII und c-Src konnten nicht mit der spezifischen Aktivität der Kinasen (Lieferantenangaben) korreliert werden. Im Falle der c-Src-Kinase konnte jedoch die erwartete hohe Aktivität in gepufferter Lösung in Anwesenheit des freien, nicht-immobilisierten Kinasesubstrates belegt werden (Daten nicht dargestellt).

In Abbildung 26 ist die Abhängigkeit der Signalstärke von der Menge an kaltem ATP dargestellt. Für diese Versuche wurden das PKA- und das c-Src-Substrat verwendet. Es wurden 1 mM des jeweiligen Peptides (IYGEFKKKC, LRRASLGC) in Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst und alternierend auf PEGMA- β Ala₃-SMCC-Träger pipettiert (0,2 μ l/Spot). Nach der Kopplung wurde der Träger geteilt und jeder Abschnitt mit PKA in MOPS-Puffer inkubiert, wobei eine konstante Menge an $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (37 KBq/ml) eingesetzt und die Konzentration des kalten ATPs (10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0 μ M) schrittweise

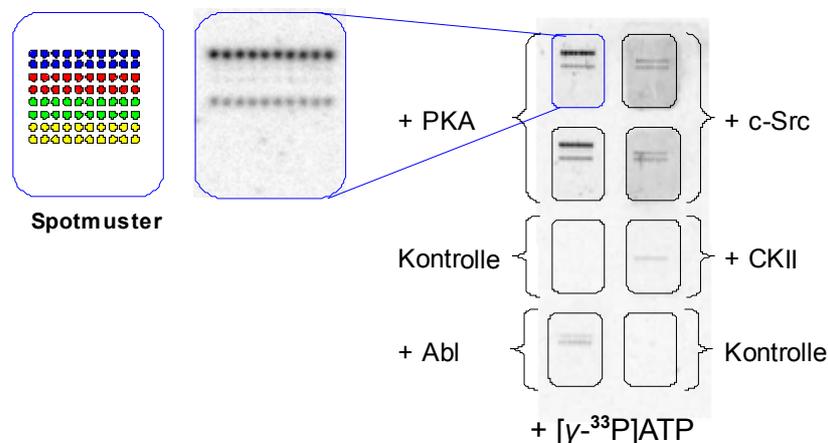


Abb. 25 Gespotteter Array nach Inkubation mit PKA, c-Src, CKII und Abl; das Spotmuster konnte den phosphorylierten Kinasesubstraten zugeordnet werden; Eine unspezifische Bindung des $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ in Puffer wurde durch Kontrollen ausgeschlossen.

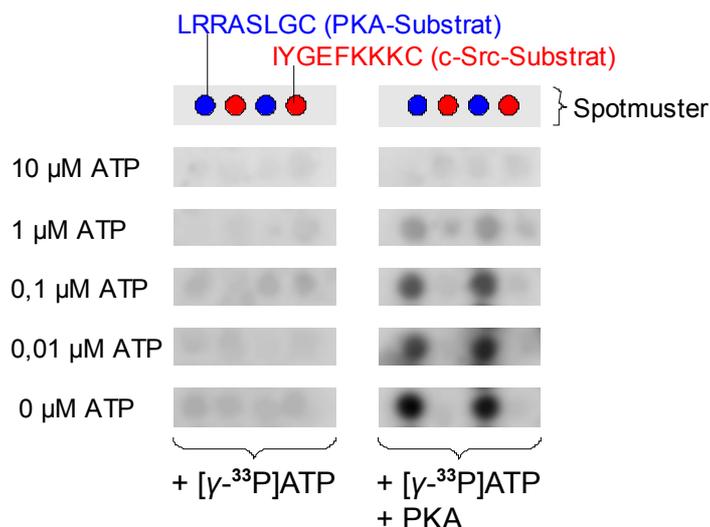


Abb. 26 Signalstärke in Abhängigkeit des Verhältnisses von kaltem ATP zu radioaktiven $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ bei der spezifischen Phosphorylierung des Peptides LRRASLGC (blau) durch die PKA

verringert wurde. Dabei konnte eine deutliche Zunahme der Signalstärke bei Abnahme der Konzentration des ATPs beobachtet werden, wobei die Stärke des Hintergrundes unverändert blieb. Im Bereich der gebundenen Peptide (PKA- und c-Src-Substrat) wurden geringe Signale detektiert, die auf die unspezifische Anlagerung des $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ an die gespotteten Peptide zurückzuführen sind. Unregelmäßigkeiten in der Spotgröße und -ausrichtung wurden durch das manuelle Spotten verursacht.

2.1.1.1 Alternative Detektionsmethoden

Um auf die Verwendung von radioaktiven Materialien zu verzichten, wurden monoklonale Anti-Phosphoserin- (*Sigma*, Steinheim) und Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (*Sigma*, Steinheim) sowie die korrespondierenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper als alternatives Nachweissystem für Phosphorylierungen untersucht (Panse et al., 2004). Allerdings konnte hiermit keine Phosphorylierung von oberflächengebundenen Kinasesubstraten detektiert werden. Darüber hinaus wurde *Pro-Q[®] Diamond-Stain* (*Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein/Phosphopeptide Microarray Stain; Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland*) für den Nachweis getestet (Martin et al., 2003a; Martin et al., 2003b). Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet spezifisch an peptidische Phosphatgruppen und kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 535$ nm angeregt werden. Das Detektionslimit für Phosphoproteine auf verschiedenen Trägeroberflächen liegt zwischen 312 - 625 fg Peptid in Abhängigkeit von der Anzahl an präsentierten Phosphatgruppen. Diese Nachweisteknik hat sich auf Polyacrylamid-, Amin-, Aldehyd-, Epoxy- und Poly-L-Lysin modifizierten Trägermaterialien bewährt. Auf Poly(vinylidendifluorid)-Trägern oder auf Nitrozellulose ist ein Nachweis mit diesem Farbstoff nicht möglich (Martin et al., 2003a; Martin et al., 2003b).

Für die Anwendung auf den SMCC-terminierten PEGMA- βAla_3 -Trägern wurden die Peptidsubstrate wieder auf den Träger gespottet (vergleiche Abb. 24). Durch den *Flexiperm[®]*-Aufsatz wurden sechs Reaktionsräume geschaffen, die mit unterschiedlichen Ansätzen inkubiert wurden. Die jeweiligen

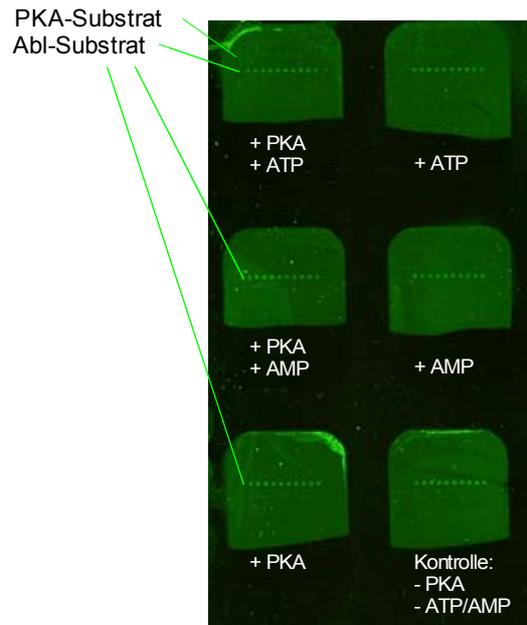


Abb. 27 Phosphorylierung von Peptiden durch die Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), Nachweis mit Hilfe des Pro-Q[®] Diamond-Farbstoffes. In allen Fällen wurde das Abl-Substrat angefärbt. Nur eine leichte Anfärbung des PKA-Substrates nach der Umsetzung mit PKA und ATP wurde detektiert.

Felder wurden mit PKA in Anwesenheit von ATP oder AMP (Adenosinmonophosphat), ohne PKA mit ATP oder AMP, nur mit der PKA oder nur mit MOPS-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Träger gewaschen und mit Pro-Q[®] Diamond-Stain überschichtet. Die Träger wurden mit der mitgelieferten Entfärbungslösung (Destain-Solution; Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) entfärbt, um ausschließlich spezifische Fluoreszenzsignale zu erhalten. Trotz unterschiedlicher Ansätze war das Signalmuster in allen Fällen annähernd identisch (Abb. 27). Der ProQ-Diamond-Farbstoff scheint offenbar unspezifisch an eine Aminosäureabfolge bzw. an eine Aminosäure der Abl-Phosphorylierungsdomäne zu binden. Eine unspezifische Anlagerung von ATP an dieses Peptid kann durch die Kontrolle ausgeschlossen werden. Bei der Inkubation mit PKA in Anwesenheit von ATP konnten zwar leichte Signale im Bereich der gespotteten PKA-Substrate detektiert werden, deren Intensität war jedoch im Verhältnis zu den unspezifischen Signalen sehr gering.

2.1.1.2 Einfluss von Linkern und Blockierungsreagenzien

Um den Einfluss von Linkern und Blockierungsreagenzien abzuschätzen, wurden verschiedene modifizierte Träger und Blockierungsschritte getestet. Abbildung 28 zeigt einen Vergleich zwischen aminoterminierten Trägern von Nunc (Microarray slides, aminosilane glass) und Schott (Nexterion[®] Slide A+) mit den gegratteten PEGMA-Filmen. Die PEGMA-Filme wurden durch die Anbindung von Fmoc- β -Alanin (PEGMA- β Ala) oder der Fmoc-11-Aminoundecansäure (PEGMA-Aun) funktionalisiert. Alle Trägervarianten wurden mit dem SMCC-Linker umgesetzt. Abschließend wurden die vorsynthetisierten Peptide LRRASLGC und IYGEFKKCC abwechselnd und in absteigenden Konzentrationen (1 mM; 0,1 mM; 0,01 mM; 0,001 mM) mittels des BioChip Arrayers (PerkinElmer LAS

GmbH, Rodgau) auf die Trägern gespottet (0,9 nI/Spot). Die Träger wurden in kleinere Stücke geschnitten und wie folgt behandelt: Ein Teil der Träger wurde vor dem Kinase-Assay mit BSA (2 % BSA in TBS; 0,1%Tween-Puffer; pH 7,4) oder nicht radioaktivem ATP (0,25 mM in TBS-Puffer) blockiert. Dann wurden diese einfachen Peptidarrays unter den optimierten Reaktionsbedingungen mit der PKA in MOPS-Puffer in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (74 kBq/ml) eine Stunde bei 30°C inkubiert. In diesem Versuch wurde der bisher eingesetzte schwächere β -Strahler $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ ($t_{1/2}$ = 25,34 d; 0,249 MeV) durch den stärkere Strahler $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($t_{1/2}$ = 14,26 d; 1,711MeV) ersetzt, um die Signalstärke zu erhöhen. Die abschließende Waschprozedur wurde bei einigen Trägern durch einen Waschschritt mit ATP (0,25 mM in 1%iger Phosphorsäure) ergänzt, um unspezifisch gebundenes $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ von der Oberfläche zu verdrängen.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, erhöht weder eine Blockierung mit BSA, noch eine Vorinkubation mit kaltem ATP das Verhältnis von Signal zu Rauschen deutlich. Die Signale schienen bei der Verwendung der PEGMA-Aun-Filme am stärksten zu sein (Abb. 28, rechte Seite), da selbst bei einer Konzentration der Kopplungslösung von 0,001 mM Peptid die einzelnen Spots zu erkennen waren. Dies konnte im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Trägern auf die Menge an Startgruppen

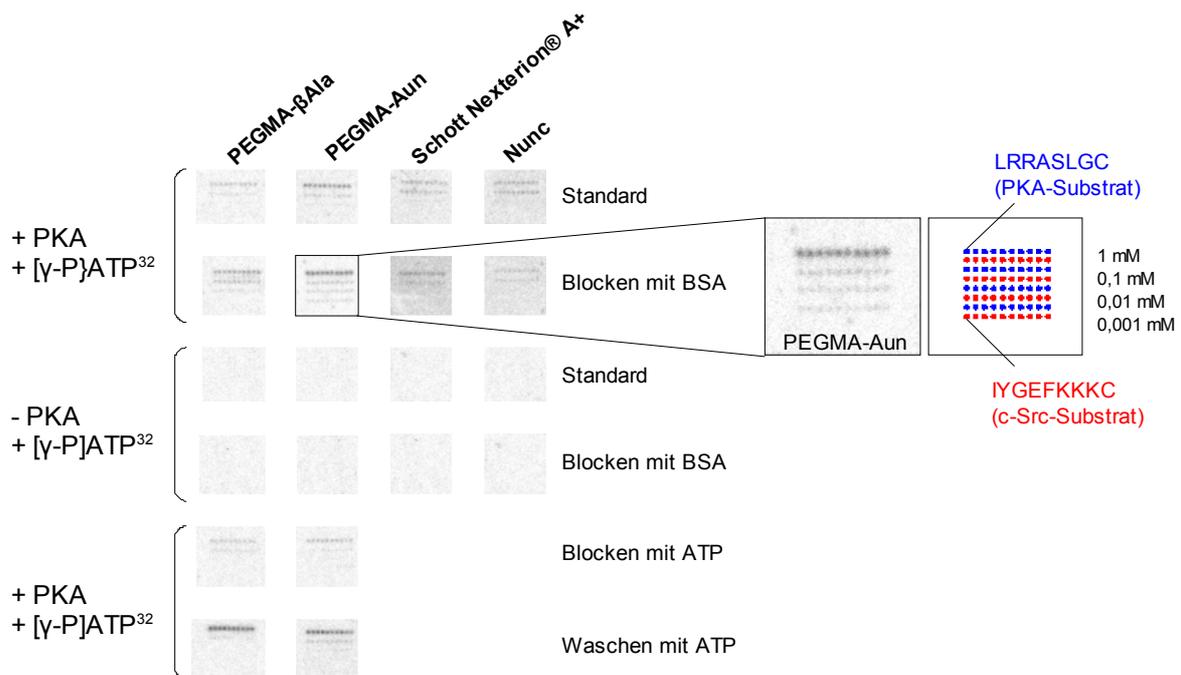


Abb. 28 Einfluss verschiedener Oberflächen, Blockierungsschritte (ATP und BSA) und Waschschritte auf die Phosphorylierung von Peptiden durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

zurückgeführt werden, die zur Anbindung der Peptide auf der Trägeroberfläche präsentiert wurden. Während für die PEGMA- β Ala- und PEGMA-Aun-Filme ein Derivatisierungsgrad von 12-14 nmol Aminogruppen pro cm^2 anhand der Fmoc-Abspaltung bestimmt wurde, standen auf den kommerziell erhältlichen Trägern laut Herstellerangabe durchschnittlich 0,8 nmol Aminogruppen pro cm^2 zur Verfügung.

Der im Vergleich zum β -Alanin längere Aun-Linker erhöht den Abstand zwischen dem proteinresistenten PEGMA-Film und dem Peptid. Möglicherweise wird dadurch die Zugänglichkeit der

Peptide für die Proteinkinasen erhöht, was in einer höheren Anzahl an Phosphorylierungen und folglich stärkeren Signalen resultiert. Beim Nachweis von Peptiden durch fluoreszenzmarkierte Antikörper in anderen Versuchen wurde ebenfalls eine vergleichbare Abhängigkeit der Signalstärken von der Art des verwendeten Linkers beobachtet. Durch einen Waschschrift mit „kaltem“ ATP wurde die Stärke des Hintergrundes nicht verringert. Danach konnte auf PEGMA-Aun-Film eine mit den BSA-blockierten PEGMA-Aun-Filmen vergleichbare Signalintensität detektiert werden. Bei der Verwendung der PEGMA-βAla-Filme wurden stärkere Signale nach dem ATP-Waschschrift beobachtet. Die hier dargestellten Unterschiede wurden auf eine Inhomogenität der Funktionalisierung der gegrifteten PEGMA-Filme zurückgeführt. Durch einen Blockierungsschritt mit „kaltem“ ATP nahm die Signalstärke im Vergleich zu den übrigen Signalen auf PEGMA-Filmen leicht ab.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in den Folgeversuchen primär die PKA und das Peptidsubstrat LRRASLG als Modellsystem verwendet. Als Nachweissystem bewährte sich die Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ ohne Zugabe von kaltem ATP, wobei auf ein vorheriges Blocken der aminoterminierten PEGMA-Filme verzichtet wurde.

2.1.2 Kinase-Assay mit kombinatorisch synthetisierten Peptiden

Nachdem der Peptidlaserdruker installiert und kalibriert war, wurde ein erster weniger komplexer Peptidarray im Objektträger-Format hergestellt. Neben dem PKA-Substrat wurden drei weitere Peptidepitope synthetisiert, die für Antikörperbindungsstudien genutzt werden sollten. Als Trägermaterial wurden fünf Objektträger verwendet, auf denen PEGMA-Filme aufgebracht und mit verschiedenen Linkern ($\beta\text{-Ala}_3$, Abu, Aun) funktionalisiert wurden. Die Peptide wurden in Feldern von ca. 4 x 4 mm bis 0,7 x 1,4 mm kombinatorisch synthetisiert. Nach dem Nachweis der drei Peptidepitope mit korrespondierenden Antikörpern wurde versucht, das Kinasesubstrat (Abb. 29, blau)

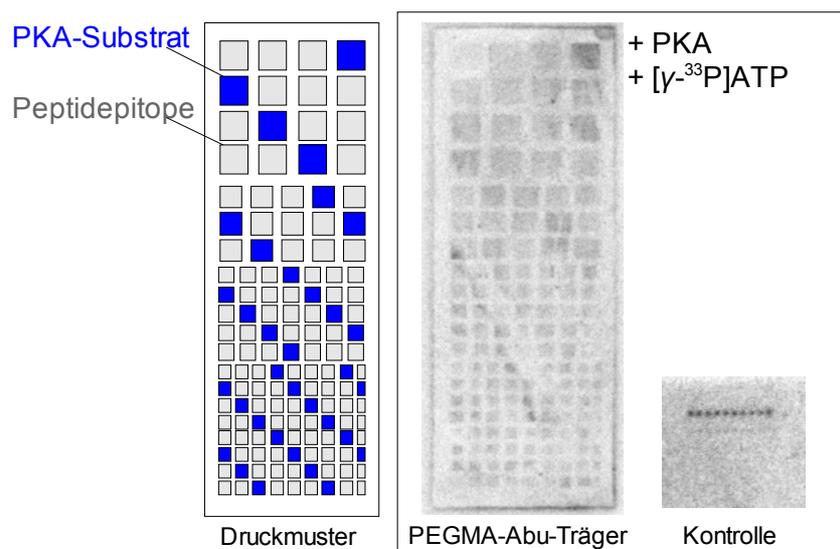


Abb. 29 (links) Druckmuster eines Arrays mit drei Peptidepitopen (grau) und dem PKA-Substrat LRRASLG (blau); (rechts) Nachweis der Phosphorylierungsstelle mittels radioaktivem $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$, als Kontrolle wurde ein gespotteter Array auf SMCC-modifiziertem PEGMA- βAla_3 -Träger mitgeführt, der im Gegensatz zum kombinatorisch synthetisierten Array das erwartete Signalmuster zeigt.

durch die PKA unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (148 KBq/ ml) nachzuweisen. Allerdings konnten keine spezifischen Signale auf dem kombinatorisch synthetisierten Array detektiert werden, während auf einem Kontrollarray mit gespotteten, vorsynthetisierten Peptiden (Abb. 29, rechts unten) das erwartete Phosphorylierungsmuster beobachtet wurde.

2.1.2.1 Optimierung des Waschprotokolls

Bei der Synthese dieses ersten Arrays entstand auf den Syntheseorten ein grauer Schleier, der von Druckzyklus zu Druckzyklus zunahm. Durch eine XPS-Analyse konnte ein starkes Signal im Bereich des Si2p-Spektrums nachgewiesen werden (Abb. 30). Die in den Aminosäurepartikeln enthaltenen Aerosilpartikel (Aerosil® R812, Degussa) wurden durch den üblichen Waschprozess (DMF, Aceton) im Gegensatz zu den übrigen Partikelbestandteilen nicht vollständig von dem Träger entfernt. Diese Nanopartikel (Durchmesser ca. 10 nm) bestehen aus Siliziumdioxid, dessen Oberfläche durch die kovalente Bindung von Hexamethyldisilazan hydrophob wird. Angelagert an die Aminosäurepartikel reduzieren sie die Aufnahme von Feuchtigkeit und ionische Wechselwirkungen, wodurch die Agglomeration der Mikropartikel verhindert wird. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die in den Phosphorylierungsexperimenten beobachteten unspezifischen Signale auf Reste von Siliziumdioxid auf dem Array zurückzuführen sind, wurden Versuche zur Optimierung des Waschprotokolls unternommen.

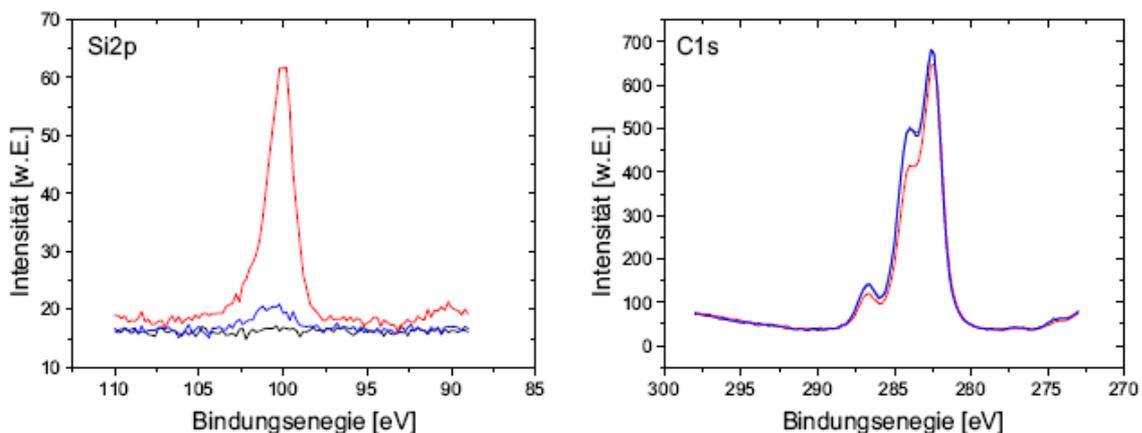


Abb. 30 XP-Detailspektren des Si2p- und des C1s-Signals in Abhängigkeit von der Waschprozedur mit Aceton (rot) bzw. mit Chloroform (blau) im Vergleich zum unbedruckten Träger (schwarz).

Abbildung 30 zeigt XP-Detailspektren des Si2p- und des C1s-Signals. Vor dem Bedrucken der aminoterminierten PEGMA- β Ala₃ (Abb. 30, schwarz) konnte kein Si2p-Signal auf dem Träger detektiert werden. Nach dem Drucken und Koppeln von L-Alanin wurde ein starkes Si2p-Signal detektiert, wenn der Träger lediglich mit Aceton (rot) gewaschen wurde (gleiches gilt für Hexan, MeOH, EtOH und DCM, nicht dargestellt). Es stellte sich heraus, dass durch gründliches Waschen mit Chloroform (2x 5 min Schütteln, ggf. 1 min im Ultraschallbad) ein Großteil der Silicapartikel entfernt wurde (Abb. 30, blau). Eine vollständige Reinigung mit den für die Peptidsynthese kompatiblen

Lösungsmitteln war bislang jedoch nicht möglich. Diese Waschprozedur beeinflusste das C1s-Spektrum. Während die Intensität der $\underline{C}=\text{O}$ - und $\underline{C}-\text{C}$ -Signale innerhalb der XPS-Fehlergrenzen gleich blieb, verringerte sich das $\underline{C}-\text{O}$ Signal. Diese Abnahme wurde auf die Reduzierung der mit Hydroxymethylsilanzan modifizierten Nanopartikel auf der Oberfläche zurückgeführt.

2.1.2.2 Optimierung der Kopplungsausbeuten

Eine weitere Erklärung für die Probleme bei der Phosphorylierung von *in situ*-synthetisierten Peptiden könnte in der Synthesqualität oder der Zugänglichkeit der Peptide auf der Array-Oberfläche liegen. In den folgenden Versuchen wurden verschiedene Linker und Spacer getestet, um die Synthesebedingungen zu optimieren. Zudem sollten die Synthesqualität bestimmt und die an der Oberfläche präsentierten Peptide quantifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurden die Objektträger mit PEGMA-Filmen versehen. An diese wurden in einem ersten Schritt jeweils 4-Aminobutansäure (Abu), 11-Aminoundecansäure (Aun) oder drei β -Alanin-Reste gekoppelt. An einige der Träger wurde zusätzlich der *Rink*-Linker angebunden. Auf den mit dem *Rink*-Linker modifizierten Trägern wurden die Peptide IYGEFKKK und LRRASLG großflächig ($A = 14,6 \text{ cm}^2$) mit dem Laserdrucker synthetisiert. Mit Hilfe der Fmoc-Abspaltung konnte die Kopplungseffizienz der Aminosäuren bestimmt werden, wobei man sich aufgrund des planaren Glassubstrats nahe der Nachweisgrenzen des *SmartSpec Plus* Spektrophotometers (Bio-Rad

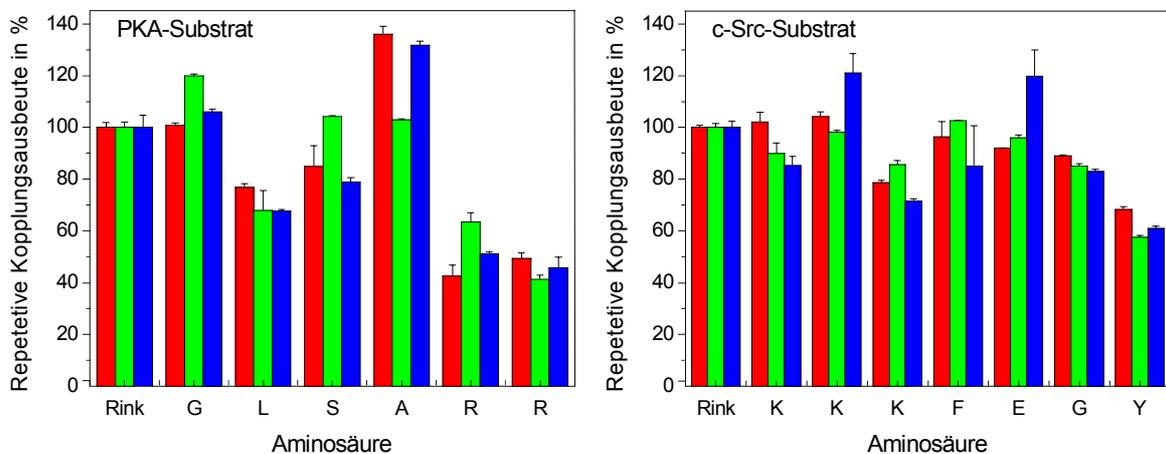


Abb. 31 Vergleich der repetitiven Kopplungsausbeuten bei der Synthese des PKA-Substrates (links) und des c-Src-Substrates (rechts) auf PEGMA- βAla_3 - (rot), PEGMA-Abu- (grün) und PEGMA-Aun-Filmen (blau), die mit dem *Rink*-Linker funktionalisiert wurden.

Laboratories, München/Deutschland) befand.

In Abbildung 31 sind die repetitiven Kopplungsausbeuten der vollflächigen Synthese der Kinasesubstrate IYGEFKKK und LRRASLG dargestellt. Für die letzte Aminosäure der beiden Peptide konnte kein Extinktionswert bestimmt werden, da dieser unter der Nachweisgrenze des UV-Spektrophotometers lag. Der in Abbildung 31 dargestellte Fehler resultiert aus den Unterschieden der Messwerte von zwei Messreihen bei der UV-spektroskopischen Fmoc-Bestimmung.

Tab. 3 Durchschnittliche Kopplungsausbeuten bei der Synthese des PKA- und c-Src-Substrates auf PEGMA-Filmen, die durch verschiedene Linker funktionalisiert wurden

Peptid	Durchschnittliche Kopplungsausbeute [%]		
	PEGMA- β Ala ₃	PEGMA-Abu	PEGMA-Aun
RRASLG	76	79	74
YGEFKKK	89	88	84

Die durchschnittlichen Kopplungsausbeuten in Abhängigkeit vom Peptid und dem verwendeten Linker sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei der Synthese des PKA-Substrates RRASLG wurden Kopplungsausbeuten zwischen 74 % (PEGMA-Aun) und 79 % (PEGMA-Abu) erzielt. Für das c-Src-Substrat wurden etwas höhere Ausbeuten zwischen 84 % (PEGMA-Aun) und 90 % (PEGMA- β Ala₃) ermittelt. Beim Vergleich der repetitiven Kopplungsausbeuten (Abb. 31) fällt auf, dass die ermittelten Werte für die Kopplungsausbeuten starken Schwankungen unterlagen. Es wurden sogar Kopplungsausbeuten von mehr als 100 % bestimmt, was die Ungenauigkeit der Fmoc-Bestimmung dokumentiert. Bei der Kopplung des Fmoc-Arginin(Pbf)-OPfp-Esters wurde eine Kopplungsausbeute von weniger als 50 % ermittelt. Wahrscheinlich wurde diese geringe Kopplungsausbeute durch die Bildung eines Laktams verursacht. Dabei wirkt die Seitenkette des Arginins als starke Base und führt zur Ringbildung (Abb. 32). Dieses bekannte Stabilitätsproblem wurde auch bei der Kopplung von C-terminal aktiviertem Arginin aus Lösung beobachtet (Chan & White, 2000; Cezari & Juliano, 1996) und ist demnach keine Besonderheit der Partikel-basierten Synthese. Aus den dargestellten Werten wird deutlich, dass die Kopplungsausbeute abhängig von der Aminosäureabfolge und der

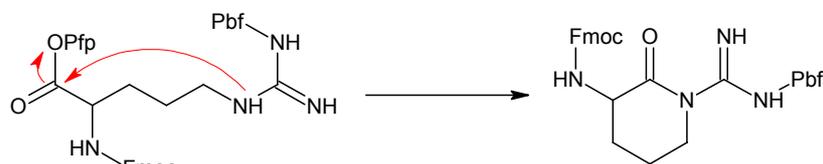


Abb. 32 Bildung eines Laktams aus dem Fmoc-Arginin(Pbf)-OPfp-Ester

unterschiedlichen Kopplungseffizienz der einzelnen Aminosäuren ist (Chan & White, 2000). Bei vergleichbaren Versuchen zur Synthese der Peptide DYKDDDDK und YPYDVDPYA mit dem Peptidlaserdruker wurde z.B. eine durchschnittliche Kopplungseffizienz von 90 % ermittelt (Stadler et al., 2008a).

Nach der Kopplung des *Rink*-Linkers wurde ein durchschnittlicher Derivatisierungsgrad von 9,5 nmol/cm² bestimmt. Bei einer Kopplungsausbeute von 74 % würde demzufolge nach der Synthese des vollständigen PKA-Substrates weniger als 1,2 nmol Peptid pro cm² für die Phosphorylierung zur Verfügung stehen.

Die Synthesequalität der Peptide LRRASLG und IYGEFKKK wurde durch massenspektrometrische Analyse (MALDI) bestimmt. Dazu wurden die Peptide mittels TFA (51vol.% TFA, 44 vol.% DCM, 2 vol.% dest. Wasser, 3 vol.% Triisobutylsilan) als Amid vom *Rink*-Linker abgespalten. Das Peptid LRRASLG konnte durch einen Massepeak bei 813,43 (theoretisch: 813,49) und das Peptid IYGEFKKK durch einen Massepeaks von 1053,69 (theoretisch: 1053,59) identifiziert werden (Abb. 33). Der Peak bei einer Masse von 825,42 wurde durch das Syntheseartefakt Fmoc-RRASLG

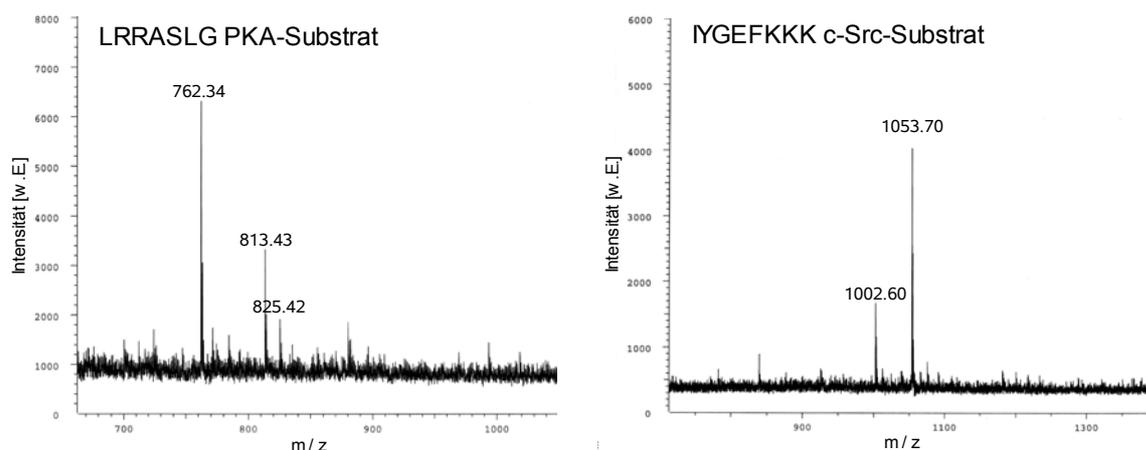


Abb. 33 Massenspektren der Peptide LRRASLG (Massepeak bei 813,43; links) und des Peptids YGEFKKK (Massepeak bei 1053,70; rechts).

verursacht. Die übrigen dargestellten Peaks konnten nicht eindeutig einer Abbruchsequenz zugeordnet werden.

Beim Druckprozess wird eine Monolage der Aminosäurepartikel auf der Oberfläche abgelagert (ca. $0,75 \text{ mg/cm}^2$). Um zu bestimmen, ob in dieser Monolage eine ausreichende Menge an aktivierten Aminosäuren zur effizienten Peptidsynthese vorliegt, wurde in den Folgeversuchen die Partikelmenge erhöht. Dazu wurden PEGMA-Aun-Träger und mit dem *Rink*-Linker modifizierte PEGMA-Aun-Träger zweimal bedruckt und die aufgetragene Partikelmenge bestimmt ($\sim 1,5 \text{ mg/cm}^2$). Anschließend wurde die Kopplung der Fmoc-*L*-Aminosäure-OPfp-Ester an die Oberfläche durch das Schmelzen der Partikelmatrix in der Hitze initiiert. Die Träger wurden im Anschluss gewaschen und die Kopplungseffizienz über die Fmoc-Abspaltung bestimmt. Ein signifikanter Anstieg der

Tab. 4 Durchschnittliche Kopplungsausbeuten bei der Synthese des PKA- und c-Src-Substrates auf PEGMA-Aun- und PEGMA-Aun-*Rink*-Filmen in Abhängigkeit der Menge an aufgetragenen Aminosäurepartikeln durch einfaches ($\sim 0,75 \text{ mg/cm}^2$) und doppeltes ($\sim 1,5 \text{ mg/cm}^2$) Bedrucken.

Peptid	Durchschnittliche Kopplungsausbeute [%]			
	PEGMA-Aun- <i>Rink</i> 1x bedruckt	PEGMA-Aun- <i>Rink</i> 2x bedruckt	PEGMA-Aun 1x bedruckt	PEGMA-Aun 2x bedruckt
RRASLG	60	60	57	59
YGEFKKK	75	76	68	69

Kopplungseffizienz durch die erhöhte Partikelmenge konnte nicht festgestellt werden (Tab. 4). Die Kopplungsausbeute für die Synthese des Peptides RRASLG stieg um vernachlässigbare 0,3 % auf PEGMA-Aun-*Rink*-Trägern und um 1,5 % auf PEGMA-Aun-Trägern. Für die Synthese des Peptides YGEFKKK wurde ein Anstieg von 0,9 % unabhängig von der Oberflächenmodifikation bestimmt. Bei der Synthese des PKA-Substrates konnte die Kopplungsausbeute für die letzte Aminosäure nicht ermittelt werden, da wiederum die Nachweisgrenze des UV-Spektrophotometers unterschritten wurde. Die durchschnittliche Kopplungsausbeute für beide Kinasesubstrate war geringer als beim vorherigen

Versuch. Dennoch wird wiederum deutlich, dass die Synthese des Arginin-haltigen PKA-Substrates in geringerer Ausbeute erfolgte, als die Synthese des c-Src-Substrates. Bspw. konnten auf den PEGMA-Aun-Träger im Durchschnitt 14,5 % weniger PKA-Substrat (RRASLG) als c-Src-Substrat synthetisiert werden, wobei für die letzte Aminosäure des PKA-Substrates keine Werte zur Kopplungseffizienz bestimmt wurden, aufgrund der Unterschreitung des Detektionslimits des UV-Spektrophotometers.

Um die Kopplungsausbeuten zu erhöhen, wurde bei den folgenden Versuchen der Kopplungszyklus zweimal durchgeführt. Die Träger wurden im jeweiligen Muster bedruckt und die Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester bei 90°C gekoppelt. Anschließend wurde die Partikelmatrix von der Oberfläche entfernt, der Träger getrocknet und der Druck- und Kopplungsprozess nochmals wiederholt. Auf diese Methodik wird auch in der Standard Fmoc-Peptidsynthese aus Lösung zurückgegriffen, wenn sterisch anspruchsvolle Aminosäuren gekoppelt bzw. „schwierige Motive“ (z.B. RR) synthetisiert werden sollen (Chan & White, 2000). Durch das doppelte Koppeln der Aminosäurepartikel für jeweils 60 min bei 90°C konnte z.B. die Kopplungsausbeute des Arginins annähernd verdoppelt werden.

2.1.2.3 Optimierung des Kinase-Assays

Parallel zum flächigen Druck wurden auf weiteren Trägern (PEGMA-βAla₃, PEGMA-Abu, PEGMA-Aun) ohne *Rink*-Linker die Peptide IYGEFKKK und LRRASLG im Schachbrettmuster (Spotgröße: 4 x 4 mm² bis 0,7 x 1,4 mm²) synthetisiert. Die Träger wurden in vier Stücke geteilt und in MOPS-Puffer inkubiert, um die Filme aufzuquellen und dadurch die Zugänglichkeit der Kinasesubstrate zu erhöhen. Ein Teilstück wurde mit [γ-³³P]ATP und der PKA, ein weiteres Stück mit [γ-³³P]ATP und der c-Src Kinase und ein drittes Stück mit [γ-³³P]ATP (jeweils 74 kBq/ml) und beiden Kinasen inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Teilstück nur mit [γ-³³P]ATP (74 kBq/ml) in MOPS-Puffer überschichtet, um eine

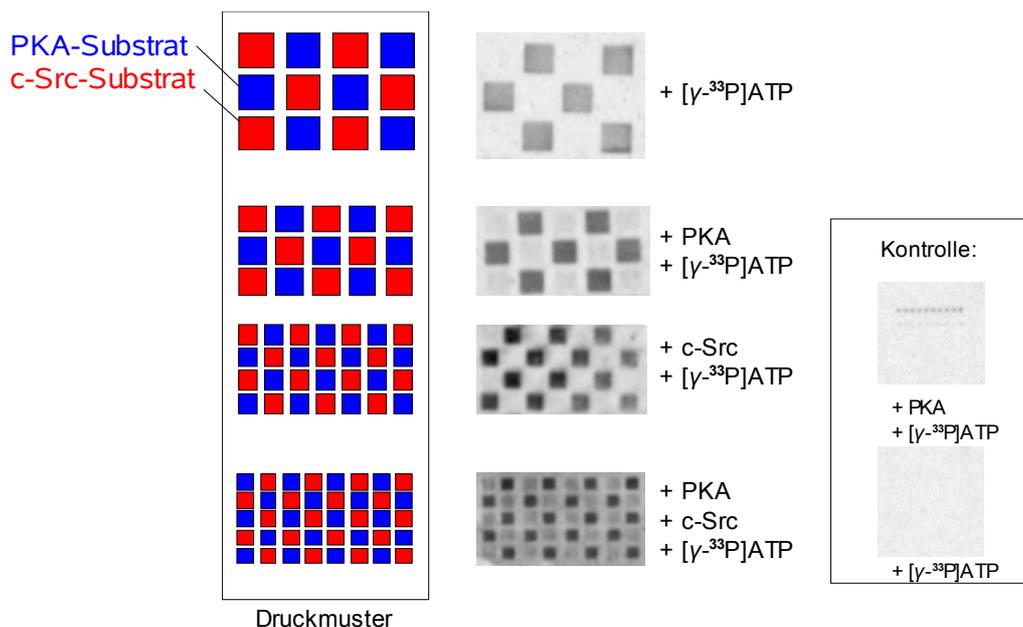


Abb. 34 Phosphorylierungsmuster eines im Schachbrettmuster generierten Arrays auf PEGMA-βAla₃-Trägern, (schwarz gerahmt) Kontrollversuch mit gespotteten Kinasesubstraten.

unspezifische Anbindung des $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ an die Peptide zu dokumentieren (Abb. 34). Nach 1stündiger Inkubation und nachfolgender Autoradiographie zeigten sich auf den „gedruckten“ Arrays klare Signale bei den PKA-Substraten, die allerdings auch ohne zugegebene Kinasen auftraten. Eine spezifische Phosphorylierung durch die die PKA konnte aufgrund des hohen Hintergrundsignals nicht nachgewiesen werden. Die peptidischen c-Src-Substrate wurden durch $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ allein nicht markiert, die Zugabe von c-Src lieferte aber auch keine signifikante Signalverstärkung. Exemplarisch sind die mit PEGMA- βAla_3 -Trägern erzielten Resultate in Abbildung 34 dargestellt. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurden gespottete Arrays (Abb. 34, rechts unten) mitgeführt, auf denen die spezifische Phosphorylierung und keine unspezifische Anbindung des $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ erkennbar sind. Bei der Peptidsynthese mit dem Laserdrucker muss es offenbar zu Veränderungen in der Trägeroberfläche gekommen sein, die eine selektive Anlagerung des radioaktiven ATP an das PKA-Substrat bewirken.

Dieses Problem der unspezifischen $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ Adhäsion an die Trägermatrix konnte durch eine aufwendige Waschprozedur behoben werden. Der Array wurde nach der Phosphorylierung durch die Kinase mit 1 %iger Phosphorsäure, mit einer auf 60° erhitzten wässrigen Lösung aus 0,75 M Natriumchlorid/ 0,075 M Natriumcitrat/1% SDS (pH 7), mit einer 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung und mit einem alkalischen TBS-Buffer (100 mM TBS, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, pH 10,4) gespült. Das intensive Waschen der Träger entfernte endgültig das unspezifisch adsorbierte ATP. Welcher dieser Waschschrte entscheidend für die Entfernung war, konnte in einem Test nicht eindeutig festgestellt

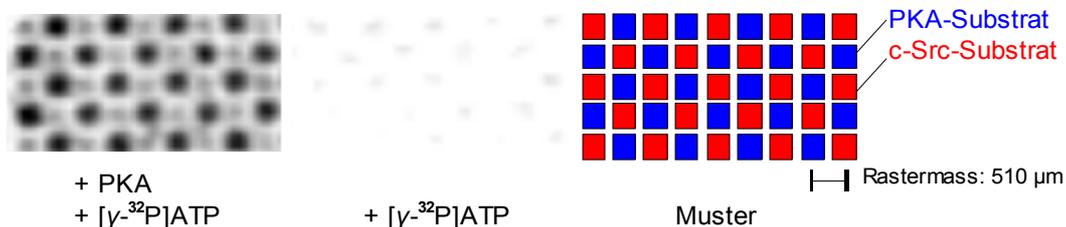


Abb. 35 Peptidarray auf dem das c-Src-Substrat und das PKA-Substrat im Schachbrettmuster (rechts) synthetisiert wurde; der Nachweis des PKA-Substrates verlief positiv (links); die Kontrolle (Mitte) zeigt nur eine geringe unspezifische Bindung des $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

werden. Die Summe der Waschschrte erzielte jedoch das gewünschte Ergebnis. Bei der erneuten Umsetzung eines Peptidarrays, der im Schachbrettmuster mit einem Rastermass von $510\ \mu\text{m}$ synthetisiert wurde, bewährte sich die Waschprozedur (Abb. 35). Es konnte eine spezifische Phosphorylierung der PKA Phosphorylierungsdomäne nachgewiesen werden, während die Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ nur einen leichten Hintergrund hervorrief.

2.1.2.4 Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der PKA

Um einen komplexeren Peptidarray unter definierten Reaktionsbedingungen auf die spezifische Phosphorylierung zu untersuchen, wurde die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase charakterisiert. Durch einen *Bradford*-Test konnte die Proteinmenge des Enzyms (6,8 mg/ml) in der zur Verfügung gestellten Enzymlösung (Arbeitsgruppe: *Mechanismen biomolekularer*

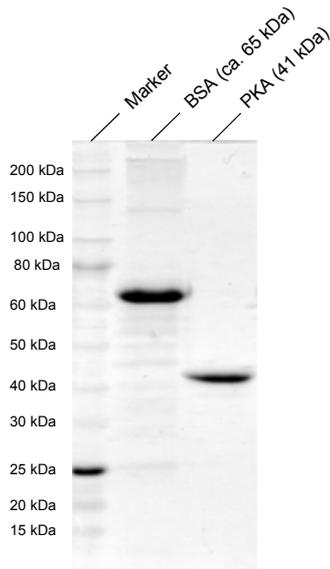


Abb. 36 Die Reinheit der PKA-Probelösung wurde durch eine Auftrennung in einem 15%igem Kornberg-Gel belegt.

Wechselwirkungen, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg/Deutschland) quantifiziert werden. Die Reinheit der katalytischen Untereinheit der PKA (41 kDa) wurde durch eine Auftrennung in einem 15%igem Kornberg-Gel belegt (Abb. 36).

Des Weiteren wurde die spezifische Aktivität bestimmt. Dies geschah mit Hilfe eines Cook-Testes. Die spezifische Aktivität lag bei 5,8 U/mg. Eine Unit (U) ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die die Phosphorylierung von 1 μ M Substrat pro Minute bewirkt.

2.1.3 Identifizierung spezifischer Kinasesubstrate innerhalb eines kombinatorisch synthetisierten Dekapeptid-Arrays

Um die spezifische Phosphorylierung von Peptidsubstraten durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase zu untersuchen, wurde ein entsprechender Peptidarray entwickelt. Mittels des Peptiddruckers wurden 22.791 Peptide (Rastermaß 510 μ m) auf einer funktionalisierten Glasplatte (ca. 4 x 16 cm) synthetisiert. Als Trägermaterial wurde der etablierte PEGMA-Film gewählt, der sowohl mit dem Aun-Linker als auch mit einem zusätzlichen L-Lysin funktionalisiert wurde (PEGMA-Aun-Lys-Film). Die synthetisierten Peptidvarianten bestehen aus Dekapeptiden, die in mehreren Positionen stochastisch variiert wurden. Auf diesem Array wurden neben den spezifischen

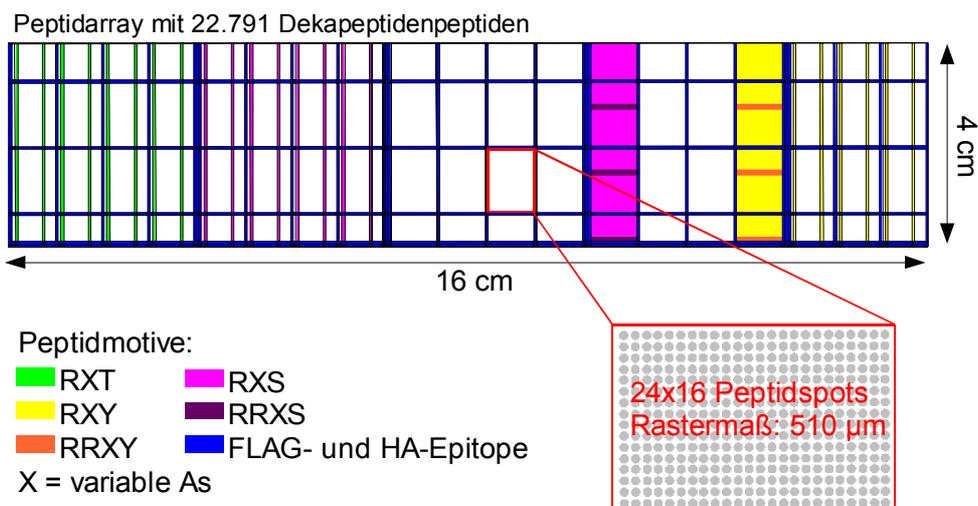


Abb. 37 Schematische Darstellung der Aufteilung des Peptidarrays mit 22.791 stochastisch variierten Dekapeptide, die auf einer Fläche von 4 x 16 cm² synthetisiert wurden; Bereiche, in denen potentielle Kinasesubstrate präsentiert werden, sind farbig markiert.

Erkennungsmotiven der PKA RRXS und RXS (X = variable Aminosäure), unter anderem Peptide mit dem Motiv RXT, RXY und RRYX kombinatorisch synthetisiert (Abb. 37). Bei der Synthese wurde der Kopplungszyklus zweimal durchgeführt, um die Syntheseausbeute zu erhöhen. Der Erfolg der Kopplung wurde halbquantitativ durch eine zwischenzeitliche Anfärbung der freien Aminogruppen mit Bromphenolblau (0,01 % in Methanol) bestimmt (nicht dargestellt). Nach der vollständigen Synthese der Dekapeptide war dies nicht mehr möglich, da das Detektionslimit für diesen Nachweis (~1 nmol Aminogruppen pro cm²) unterschritten wurde.

Vor der Umsetzung des Peptidarrays, wurde dieser 30 min in MOPS-Puffer (pH 7,4) vorgequollen, um die Polymerstruktur aufzulockern. Anschließend wurde der Array mit einer Lösung aus 1 U PKA, 740 KBq [³²P]ATP in 10 ml MOPS-Puffer bei 31 °C inkubiert. Nach 1 h Inkubationszeit wurde der Array mit der oben beschriebenen und optimierten Waschprozedur gewaschen. Diese Inkubation und Waschprozedur wurden zweimal durchgeführt. Mittels Autoradiographie konnte das in Abbildung 38 dargestellte Phosphorylierungsmuster detektiert werden.

Es wurden selektiv diejenigen Peptide detektiert, die die spezifische Phosphorylierungsstelle RRXS (Abb. 38; rot/fett gedruckt) der PKA enthalten in Übereinstimmung mit Literaturangaben (Kenelly & Krebs, 1991; Kemp & Pearson; 1990). Die Phosphorylierung war dabei unabhängig von weiteren Aminosäuren in der Peptidsequenz (Abb. 38; rot). Eine unspezifische Phosphorylierung des Tyrosins wurde nicht beobachtet. Gleiches gilt für die Phosphorylierung von Threonin und Serin in der durch die PKA weniger häufig modifizierten Aminosäureabfolge RXT bzw. RXS (Kenelly & Krebs, 1991). Ferner wurde eine leichte Anfärbung des Arrays an FLAG- und HA-Epitopen beobachtet. Im Vergleich zu den

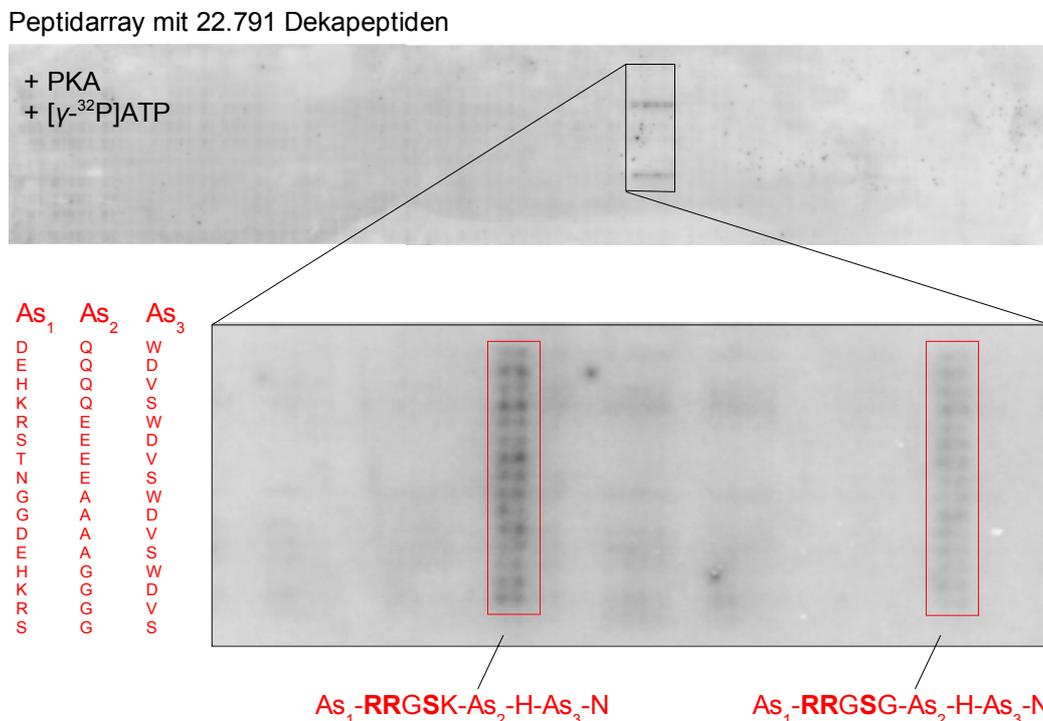


Abb. 38 Spezifische Peptidsubstrate der PKA, die innerhalb einer Bibliothek von 22.791 Dekapeptiden identifiziert wurden. Eine eindeutige Phosphorylierung des Serins wurde nur bei Peptiden detektiert, die die spezifische Phosphorylierungsstelle **RRXS** tragen. Dabei ist diese Modifikation unabhängig von den variablen Aminosäuren (As₁-As₃, linke Seite) innerhalb der Sequenzen As₁RRGSKAs₂HAs₃N und As₁RRGSGAs₂HAs₃N (Doppelspots, roter Rahmen).

spezifischen Kinasesubstraten sind die Signalintensitäten jedoch vernachlässigbar. Insgesamt fiel der inhomogene und starke Hintergrund, hervorgerufen durch unspezifisch angelagertes $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, auf. Dieser Hintergrund konnte trotz der verbesserten Waschprozedur nicht weiter verringert werden. Zusammenfassend kann dieses Experiment jedoch als erfolgreich angesehen werden. Die Suche nach spezifischen Peptidsubstraten der PKA-Kinase konnte mit Hilfe des Peptidlaserdruckers auf funktionalisierten PEGMA-Filmen realisiert werden.

2.1.3.1 Vorversuch zum Einsatz von PEGMA/MMA-Polymerfilmen

Da PEGMA/MMA-Mischpolymere (Stadler et al., 2008b) bei der Detektion von gebundenen Epitopen durch z.B. HRP-markierte Antikörper stärkere Signale als die reinen PEGMA-Filme lieferten, wurde in ersten Phosphorylierungsexperimenten dieser Filme für die Anwendung in Kinase-Assays getestet. Hierzu wurden vorsynthetisierte und C-terminal um ein Cystein verlängerten PKA- und c-Src-Kinasesubstrate und zwei Epitope (HA und Flag) als Referenzen auf SMCC-modifizierte PEGMA- βAla_3 -Filme, PEGMA/PMMMA- βAla_3 -Filme (50 % PEGMA, 50 % MMA) und als Referenz auf Zellulose- βAla_3 gespottet. Die Träger wurden mit einer Lösung aus 1 U PKA, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in MOPS-Puffer bei 31 °C inkubiert. Nach 1 h Inkubationszeit wurde der Array mit der optimierten Waschprozedur gewaschen und die Phosphorylierungsereignisse mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 39). Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften sind die Spots auf Zellulose bei gleichem Spotvolumen (0,2 μl) etwa doppelt so groß im Vergleich zu den Spots auf den modifizierten Glasträgern. Zudem wurde die Zellulose vor der Umsetzung mit BSA blockiert. Wie in Abbildung 39 dargestellt, konnte eindeutig die Phosphorylierung des PKA-Substrates LRRASLGC nachgewiesen werden. Dabei war die Signalstärke stark abhängig von dem verwendeten Träger. Die Signale auf den PEGMA/MMA-Filmen waren wesentlich stärker, als die Signale auf den reinen PEGMA-Filmen. Nach der Ankopplung des dritten β -Alanins wurde für die PEGMA-Filme ein Derivatisierungsgrad von 5 nmol/cm^2 , für die PEGMA/MMA-Filme ein Derivatisierungsgrad von 1,94 nmol/cm^2 und für die Zellulose ein Derivatisierungsgrad von 6,4 nmol/cm^2 bestimmt. Da die Ankopplungsausbeute des SMCC-Linkers und der einzelnen Peptidvarianten nicht bestimmt werden kann, konnte nicht direkt von

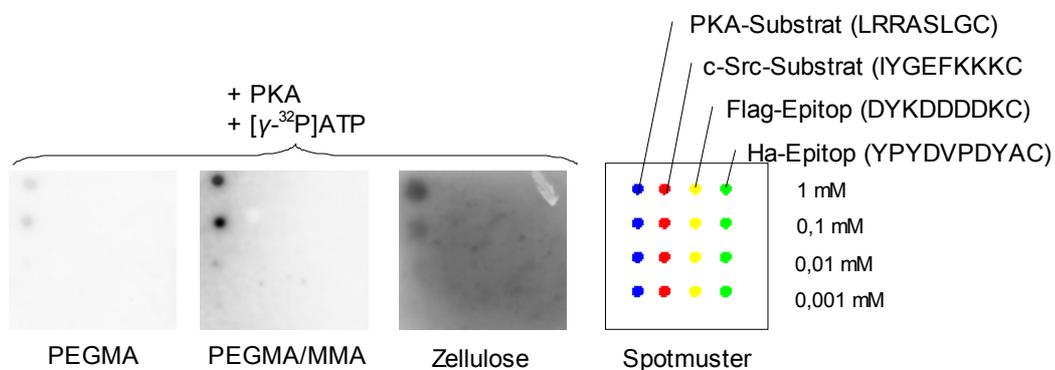


Abb. 39 Vergleich von PEGMA-Filmen, PEGMA/MMA-Filmen und Zellulose (mit BSA blockiert) als Trägermatrix für Kinaseassays. Das spezifische Substrate der katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A wurde in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ spezifisch phosphoryliert, wobei die Signalstärke stark abhängig vom verwendeten Trägermaterial war.

der Signalstärke auf die Peptidmenge geschlossen werden. Bei der Anfärbung der Epitope durch HRP-markierte spezifische Antikörper wurde ein vergleichbares Färbemuster detektiert (Daten nicht dargestellt). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass die PEGMA/MMA-Filme eine bessere Zugänglichkeit zu den präsentierten Peptiden auf der Oberfläche ermöglichen und somit als Trägermodifikation besser für die Anwendung in Kinase Assays geeignet sind.

2.2 Proteinkinase Array - Diskussion

Die Effizienz einer enzymatischen Umsetzung von Peptidsubstraten in Lösung hängt u.a. ab von der Kinetik der Enzyme, ihrer Konzentration und den Substraten (Abb. 40). Dagegen ist die Modifikation von Substraten, die an eine Oberfläche gebunden sind, zusätzlich abhängig von den Eigenschaften

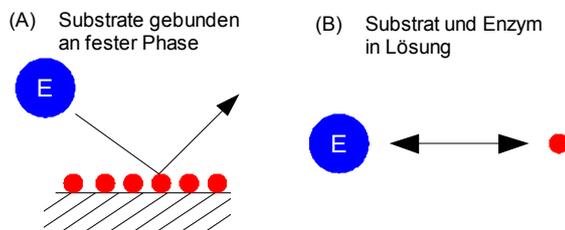


Abb. 40 Interaktion zwischen Enzymen (blau) und spezifischen Substraten (rot), die an eine feste Phase gebunden (A) oder frei in Lösung (B) vorliegen (Laurent et al., 2008).

des Trägermaterials und den sterischen Anforderungen des Enzyms (Basso et al., 2006; Laurent et al., 2008; Halling et al., 2005). Die verwendeten PEGMA-Filme verhindern die unspezifische Anlagerung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (14-340 kDa) und Ladung, wodurch sie prädestiniert für Immunoassays sind (Beyer, 2005; Beyer et al., 2006). Diese Repellenz ist sowohl von der Dichte der einzelnen

Polymerstränge und deren Länge, als auch von der Größe der Proteine abhängig (Jeon et al., 1991; Jeon & Andrade, 1991). Im Falle der Proteinkinase Assays kann diese Eigenschaft zu einer reduzierten Zugänglichkeit der Kinasesubstrate für die Enzyme und dadurch zu einer geringeren Katalyseeffizienz führen. In verschiedenen Publikationen wird darauf hingewiesen, dass die katalytische Aktivität für Enzyme mit einem Molekulargewicht größer 50 kDa deutlich abnimmt, wenn die Substrate an mit Poly(ethylenglycol)-Filmen modifizierte Polymerbeads gebunden sind (Laurent et al., 2008). Für zweidimensionale Träger gilt diese Limitierung nur eingeschränkt, dennoch kann die Wahl des Linkers, des Polymers und die Substratdichte starken Einfluss auf die Zugänglichkeit und damit auf die Umsetzungsrate nehmen (Laurent et al., 2008; Halling et al., 2005). Die Proteinresistenz der PEGMA-Filme würde zumindest die geringe katalytische Aktivität der großen c-Src- (60 kDa) und CKII-Kinasen (130 kDa) erklären.

Die Verwendung des Aun-Linkers (bzw. β -Ala₃) erhöht den Abstand zwischen PEGMA-Film und Peptid und erlaubt der PKA die Substrate zu phosphorylieren. Dieser Abstand könnte jedoch zu gering sein, um diese für größere Proteinkinasen zugänglich zu machen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Trägern erhöhte Ladekapazität die Zugänglichkeit für größere Proteinkinasen weiter reduziert. Die Peptide könnten zu dicht angeordnet sein, um einzelne Substrate an die katalytische Domäne des jeweiligen Proteinkomplexes zu binden. Zudem liegt bei der *in situ*-Synthese durch den Peptidlaserdrucker pro Spot eine hohe Anzahl an Syntheseartefakten vor, die ggf. die Zugänglichkeit der vollständig synthetisierten Kinasesubstrate weiter reduzieren oder unspezifisch mit den verschiedenen Proteindomänen interagieren. Dies würde erklären, warum die c-Src-Kinase ihr korrespondierendes Peptidsubstrat zumindest schwach phosphoryliert, wenn dieses als vorsynthetisiertes Peptid in hoher Reinheit auf einem Träger gespottet wurde (Abb. 25) aber andererseits keine spezifische Phosphorylierung von *in situ*-synthetisierten Substratpeptiden katalysiert (Abb. 34). Weiterhin können unspezifisch abgelagerte Si-Nanopartikel, die sich bei der

Partikel-basierten Peptidsynthese auf dem Träger anreichern, die jeweilige Kinaseaktivität durch Wechselwirkungen verringern. Aus den angeführten Gründen konnten die in Modellversuchen mit gespotteten vorsynthetisierten Peptiden bestimmten Assaybedingungen nicht direkt auf die mit dem Laserdrucker synthetisierten Peptidarrays angewendet werden.

Während bei der PKA nur die katalytisch aktive Untereinheit eingesetzt wurde, bei der die Substratbindestelle stark exponiert ist (Johnson et al., 1996; Johnson et al., 2001; Engh & Bossemeyer, 2001), wurden die anderen drei Kinasen als vollständige Proteinkomplexe eingesetzt. Die Komplexität dieser Kinasen (Allende & Allende, 1995; Sicheri & Kuriyan, 1997) könnte die Erkennung und Modifikation der Peptidsubstrate weiter erschweren. Allerdings liegen keine Strukturanalysen der Proteinkomplexe bei der Bindung bzw. Modifikation von an festen Phasen gebundenen Substraten vor, so dass dieser Erklärungsansatz spekulativ bleibt.

Die erzielte Synthesequalität ermöglichte dennoch in einer Peptidbibliothek mit mehr als 22.000 Peptidspots spezifische Substrate der PKA zu detektieren, in denen die Aminosäureabfolge RRXS vorlag. Dieses Ergebnis stimmt mit Literaturangaben überein (Kemp & Pearson, 1990; Kenelly & Krebs, 1991). Die Signalstärke war allerdings gering und schwächere Phosphorylierungsstellen der PKA (z.B. RXS oder RXT) konnten nicht detektiert werden. Die in Kapitel 2.1.3.1 vorgestellten PEGMA/MMA-Polymerfilme können eventuell die Zugänglichkeit der Peptide erhöhen und dadurch auch zu höheren Phosphorylierungsraten führen, so dass bei zukünftigen Arrays auch eine Detektion „schwacher“ Phosphorylierungsstellen möglich wird. Eine weitere Reduzierung des PEGMA-Anteils in den Mischpolymerfilmen könnte die Umsetzungsraten durch eine weitere Verbesserung der Peptidzugänglichkeit erhöhen. In weiterführenden Experimenten sollen daher diese Mischpolymer-Oberflächen und eingesetzten Linker getestet und optimiert werden, um neben der Anwendung größerer Kinasen (CKII, Abl und c-Src) auch Assays mit weniger gut charakterisierten Kinasen zu ermöglichen.

Die erfolgreiche Synthese mit Hilfe der Aminosäurepartikel konnten anhand der massenspektrometrischen Untersuchung von zwei Beispielpeptiden belegt werden. Aufgrund der potentiellen Laktambildung bzw. geringeren Kopplungseffizienz des Fmoc-L-Arginin(Pbf)-OPfp-Esters wurden bei der Synthese des RR-Motivs vergleichsweise geringe Kopplungsausbeuten ermittelt. Eine Erhöhung der verdruckten Aminosäurepartikelmenge verbesserte die Syntheseausbeuten kaum (0,3 - 1,5 %). Daher wurden bei der Synthese des Arrays doppelte Kopplungszyklen durchgeführt. Die Untersuchung der Kopplungseffizienz und die durchgeführte Anfärbung der freien Aminogruppen mit Bromphenolblau erlaubt die Abschätzung der vollständig synthetisierten Peptide auf dem Array. Demnach liegt weniger als 1,2 nmol Substrat pro cm² vor.

Der direkte Nachweis der Phosphopeptide durch die Markierung mit radioaktiven ³²P oder ³³P durch die Verwendung von [γ -³²P]ATP oder [γ -³³P]ATP erwies sich als sehr effektiv. Für den indirekten Nachweis mit Anti-Phosphoserin-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern ist die Anzahl der Phosphorylierungsereignissen vermutlich nicht ausreichend oder die Affinität der gewählten Antikörper bzw. die Zugänglichkeit der Phosphopeptide zu gering. Die Detektion von Phosphopeptiden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *Pro-Q[®] Diamond* wurde nicht weiter verfolgt, da die unspezifische Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes an bestimmte Aminosäureabfolgen die selektive Detektion von spezifischen Phosphopeptiden erheblich erschwert.

2.3 Katalytische Peptide und Peptidderivate - Ergebnisse

2.3.1 Katalytische Peptide

In diesem Abschnitt sollten Peptidarrays genutzt werden, um Peptidliganden zu identifizieren, die durch die Koordination spezifischer Metallionen die Hydrolyse von Phosphoesterbindungen katalysieren.

In ersten Experimenten wurde versucht, die von *Berkessel et al.* mit Hilfe der Split-Pool-Synthese auf Polymerbeads untersuchte hydrolytische Spaltung von 3-Hydroxyindolderivaten unter Metallopeptidkatalyse zu reproduzieren (Berkessel & Héroult, 1999; Berkessel, 2003). In dem beschriebenen Assay wurde gemäß den Limitierungen der Split-Mix-Synthese auf farbige und unlösliche Reaktionsprodukte zurückgegriffen, die an die Oberfläche binden (one-bead-one-compound; on-bead-screening). Bei den ersten Versuchen wurden die von *Berkessel et al.* als katalytisch aktiv identifizierte Sequenz SGGSGGSGGHF ("Peptid 5217") und die inaktive Kontrollsequenz WGGWGGWGGWF ("Peptid 5216") großflächig auf PEGMA-beschichteten und aminoterminierten Glaträgern aus Lösung synthetisiert (PEGMA- β Ala₃). Anschließend wurden Trägerabschnitte (ca. 0,5 x 2 cm²) und zwei Referenzen (PEG-OH, PEG-OAc) verschiedenen Metallsalzlösungen und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) ausgesetzt. Sind die auf dem Träger entstehenden Metall-Peptid-Komplexe hydrolytisch aktiv, wird die Phosphatgruppe vom BCIP abgespalten. Die daraus gebildeten Indoxyl-Derivate werden an der Luft oxidiert und bilden den unlöslichen blauen Indigo-Farbstoff (Abb. 41).

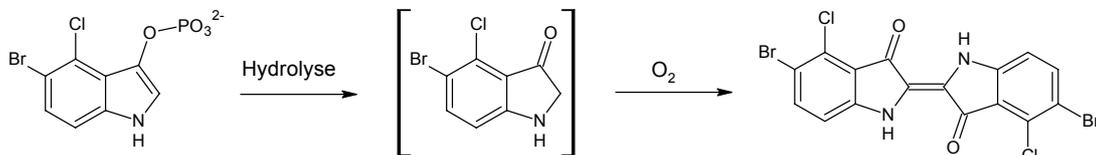


Abb. 41 Hydrolytische Spaltung des 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Bildung des IndigoFarbstoffes aus den Indoxyl-Derivaten durch Luftoxidation.

	Referenz	FeCl ₃	ZrCl ₄	CuCl ₂	EuCl ₃	ZnCl ₂
Peptid 5216						
Peptid 5217						
PEG-Träger (OH)						
PEG-Träger (OAc)						

Abb. 42 Das Epitop (Peptid 5217 mit ZrCl₄) und Kontrollen (Peptid 5216, PEG-OH, PEG-OAc) wurden auf Objektträgern großflächig synthetisiert. Anschließend wurde kleinere Abschnitte der Träger in EPPS-gepufferten Metallsalzlösungen inkubiert und die katalytische Aktivität anhand der Bildung des blauen IndigoFarbstoffes (BCIP-Assay) detektiert.

Dieser adsorbiert an die Trägeroberfläche. Folglich kann aufgrund einer Blaufärbung des Trägers auf die katalytische Aktivität des Peptid-Metall-Komplexes geschlossen werden.

Abbildung 42 zeigt das Ergebnis eines Assays, wobei die Peptiddichte auf den Trägern im Durchschnitt 8 nm/cm^2 betrug und $1 \text{ } \mu\text{mol}$ BCIP als auch 1 nmol Metallsalz gelöst in 2 ml EPPS-Puffer verwendet wurden. Die Peptide 5217 in Verbindung mit ZrCl_4 schienen die katalytisch aktivsten Metall-Peptid-Komplexe zu bilden, gemessen an der Stärke der Blaufärbung. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von *Berkessel* überein. FeCl_3 -, ZnCl_2 - und EuCl_3 -Lösungen riefen eine derartig starke Färbung nicht hervor. Eine leicht blaue Verfärbung konnte jedoch bei der Verwendung einer CuCl_2 -Lösung beobachtet werden. Obwohl in diesem ersten Versuch tatsächlich den Erwartungen entsprechende Anfärbungen erhalten wurden, konnte trotz mehrfacher Wiederholung und sorgfältiger Variation der Reaktionsbedingungen dieses Ergebnis nicht zuverlässig reproduziert werden.

2.3.2 Katalytische Peptidderivate

In weiteren Versuchen sollte die von *Berkessel et al.* (Berkessel & Riedl, 2000; Berkessel, 2003) beschriebene Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediesters und des (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat durch Metallsalze und Peptidliganden reproduziert werden. Die durch *Berkessel* identifizierten katalytisch aktiven Peptidderivate wurden auf aminotermiierten PEGMA-Trägern (PEGMA- βAla_3) in drei Schritten synthetisiert (Abb. 43). Im ersten

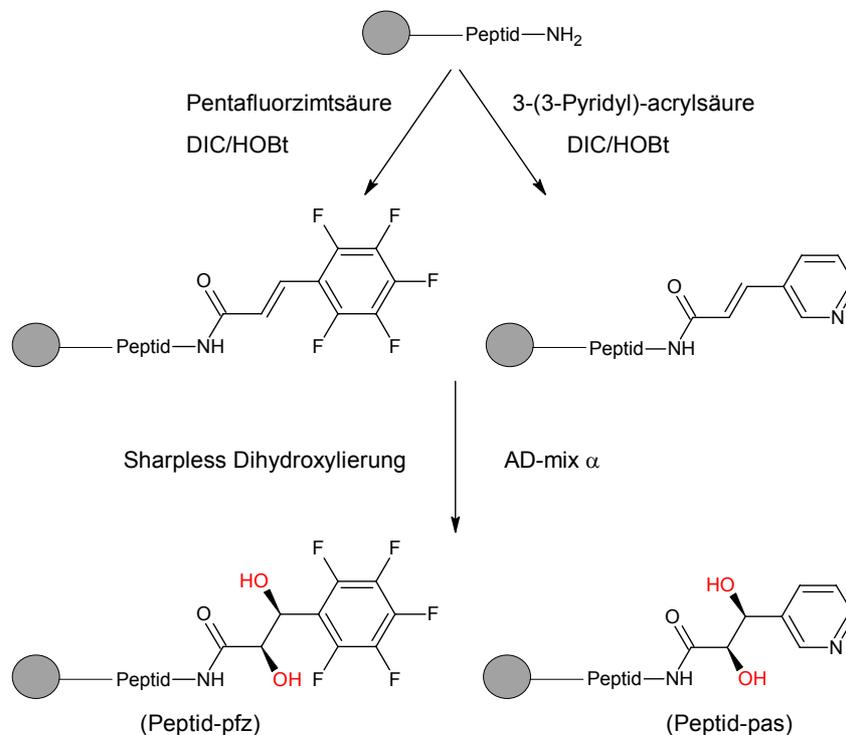


Abb. 43 Synthese der Peptidderivate: In einem ersten Schritt werden die ungesättigten Carbonsäuren an den N-Terminus der oberflächengebundenen Peptide gekoppelt. In einem zweiten Schritt werden zwei Hydroxygruppen (rot) mittels Sharpless Dihydroxylierung eingefügt. Die entstehenden Peptidderivate werden im Text durch die Abkürzungen –pfz und –pas gekennzeichnet.

Schritt wurden katalytisch aktive und inaktive Peptidsequenzen (HKR, ETQ, HKH, QTE) aus Lösung durch Fmoc-Peptidsynthese auf dem Polymerfilm (PEGMA- β Ala₃) aufgebaut. In einem zweiten Schritt wurden die ungesättigten Carbonsäuren Trans-3-(3-pyridyl)-Acrylsäure und 2,3,4,5,6-Pentafluorzimtsäure an den N-Terminus des Peptides gekoppelt. Dazu wurden 0,1 M der Carbonsäure in DMF gelöst und die Lösung zur Aktivierung der Säure mit 0,2 M DIC und 0,2 M HOBt versetzt. In einem letzten Schritt wurden die in den Säuren enthaltenen Doppelbindungen durch die *Sharpless* Dihydroxylierung enantioselektiv in 1,2-Diole überführt. Dieser Prozess wurde mit einem Osmium-Katalysator [K₂OsO₂(OH)₄], einem stöchiometrischen Oxidationsmittel [K₃Fe(CN)₆] und einem Puffer (K₂CO₃) durchgeführt. Der Puffer gewährleistet einen stabilen pH-Wert im leicht basischen Bereich, der die Reaktion unterstützt. Die Enantioselektivität wurde durch die Zugabe von chiralen Liganden erreicht. Die aufgezählten Chemikalien wurden als Mischung dem sog. AD-mix α (Sigma, Steinheim) eingesetzt. Die aus der *Sharpless* Dihydroxylierung entstandenen Hydroxygruppen sollten als Akzeptorgruppe für die Phosphorylgruppen fungieren, die bei der Hydrolyse der oben genannten Reaktionsprodukte entstehen (Berkessel & Riedl, 2000; Berkessel, 2003). Die erfolgreiche Synthese dieser Peptidderivate wurde durch XPS-Messungen belegt (Spektren nicht dargestellt).

Die Hydrolyse des (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat wurde getestet, indem die immobilisierten katalytisch aktiven Peptide HKR-pfz und inaktiven Peptide ETQ-pfz in MOPSO gepufferten Metallsalzlösungen (je 1 nM FeCl₃, ZrCl₄, CuCl₂, EuCl₃ oder ZnCl₂) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Träger gründlich gewaschen und die Hydrolyse durch Zugabe des Edukts (1 μ M) in Lösung gestartet. Die katalytisch aktiven Peptide sollten die Phosphodiesterbindung des Eduktes spalten, wodurch der Hydroxylaminrest an eine Hydroxylgruppe

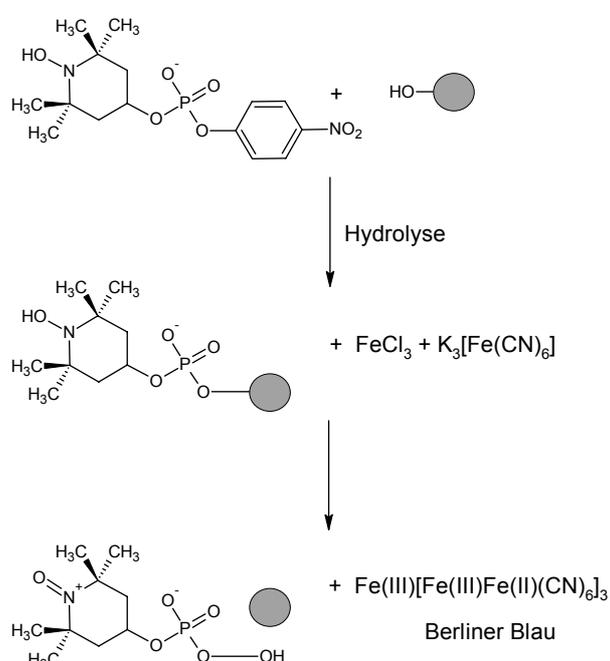


Abb. 44 Hydrolyse des (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat, Anbindung der Hydroxylamin-Phosphatgruppe und Bildung des Berliner Blau Komplexes in Gegenwart von Fe(II) und Hexacyanoferrat(III) (Berkessel & Riedl, 2000).

des Peptids übertragen wird. Abschließend wurden die Träger in einer Lösung aus Eisencyanat(III) (7,5 %) und FeCl₃ (0,5 %) inkubiert. Dabei wird das FeCl₃ durch die Hydroxylamingruppe reduziert. In Verbindung mit dem Eisencyanat bildeten sich aus dem entstehenden Fe(II) der unlösliche Berliner Blau Komplex, der augenblicklich an der Trägeroberfläche präzipitiert (Berliner-Blau-Assay; Abb. 44). Das Peptid HKR-pfz sollte in Kombination mit ZnCl₂ gemäß Literatur die größte katalytische Aktivität zeigen. Dies konnte bei der Versuchsdurchführung nicht beobachtet werden. Stattdessen zeigten die Peptide HKR-pfz als Komplexe mit Zr(VI)-Ionen die

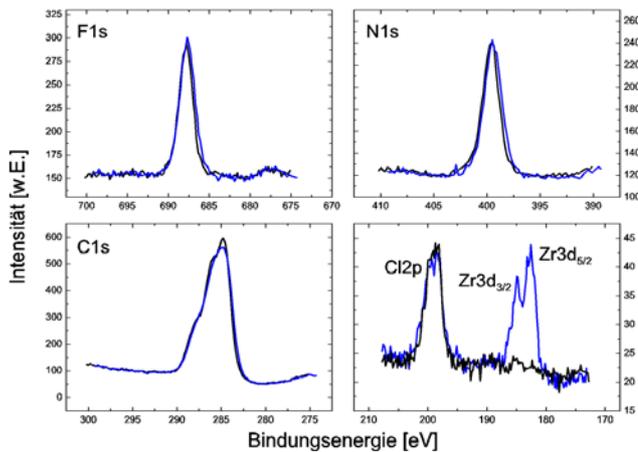


Abb. 45 XP-Spektren der oberflächengebundenen Sequenz ETQ-pfz vor (schwarz) und nach (blau) dem Einlegen in eine Lösung von 10 nmol $ZrCl_4$ in 2 ml dest. Wasser.

Spektroskopie untersucht. Das Peptid mit der Sequenz ETQ-pfz wurde dazu 18 Stunden in Metallsalzlösungen von $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $EuCl_3$ und $ZrCl_4$ (10 nmol in 2 ml dest. Wasser) eingelegt und die resultierenden Filme mit einer Referenzprobe verglichen. Exemplarisch am Beispiel des $ZrCl_4$ gezeigt, konnten innerhalb der XPS-Fehlergrenzen keine Veränderungen der sequenzspezifischen Signalintensitäten (F1s, N1s, C1s) nachgewiesen werden, was auf eine gewisse Stabilität der Liganden unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen schließen lässt (Abb. 45). Im Bereich von 190-180 eV lässt sich ein neues Signal beobachten, welches den Elektronen des Zr3d-Orbitals entspricht und somit den Einbau von Zr^{4+} in die Sequenz bestätigt. Im Gegensatz dazu konnte kein permanenter Einbau von $ZnCl_2$, $FeCl_3$ und $EuCl_3$ XP-spektroskopisch nachgewiesen werden.

Zur Reproduktion der dritten von *Berkessel et al.* beschriebenen Applikation, wurde das katalytisch aktive Peptid HKH-pas und das inaktive Peptid QTE-pas untersucht. Wiederum wurden beide Peptide großflächig auf aminoterminierten PEGMA-Trägern (PEGMA- β Ala₃) synthetisiert und zusammen mit PEG-OH und PEG-OAc Trägern als Referenzen in EPPS gepufferten Metallsalzlösungen (je 1nM $FeCl_3$, $ZrCl_4$, $CuCl_2$, $EuCl_3$ oder $ZnCl_2$) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Träger in eine Bis(4-nitrophenyl)-phosphorsäurediester-Lösung (1 μ M) getaucht und die Hydrolyse des Edukts

stärkste Hydrolyse, gemessen an der Verfärbung der Träger. Dieses Ergebnis wurde in diversen Wiederholungen bestätigt. Zudem wurde eine leichte Blaufärbung sichtbar, wenn das Peptid HKR-pfz in $Cu(II)$ -Lösungen inkubiert wurde. Um eine mögliche Abbaureaktion und ggf. die Komplexbildung durch den Einbau von Metallionen nachzuweisen, wurde der Einfluss der Metallionen auf die Peptidliganden mittels XP-

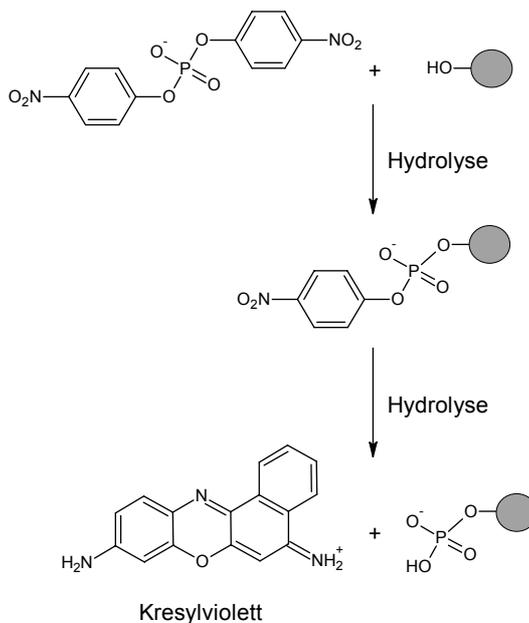


Abb. 46 Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)-phosphorsäurediesters, Bildung einer negativ geladenen Phosphat-Gruppe, die über Ionenpaarung zur Bildung des roten Kresylviolett-Farbstoffes führt.

initiiert. Dabei resultierte die Transesterifikation der Bis(4-nitrophenyl)phosphorsäurediester in negativ geladenen Phosphatgruppen, die an die Peptide koppelten. Diese Reaktion konnte durch die Ionenpaarung der Phosphatgruppe mit dem positiv geladenen Farbstoff Kresylviolett und damit anhand der Violettfärbung der Träger verfolgt werden (Kresylviolett-Assay; Abb. 46). Gemäß den

	Referenz	FeCl ₃	ZrCl ₄	CuCl ₂	EuCl ₃	ZnCl ₂
Peptid I (aktiv)						
Peptid II						
PEG-Träger (OH)						
PEG-Träger (OAc)						

Abb. 47 Bildung des Kresylviolett-Farbstoffes durch die Hydrolyse des Bis(4-nitrophenyl)-phosphorsäurediesters durch das Peptides II (QTE-pas) synthetisiert auf Objektträgerabschnitten in Gegenwart verschiedener Metallionen; das als katalytisch aktiv beschriebene Peptid I (HKH-pas) bewirkt keine Verfärbung

Literaturangaben sollte das Peptid HKH-pas die stärkste Färbung hervorrufen, wenn es vorab mit EuCl₂-Lösungen in Kontakt gebracht wurde. Allerdings wurden ganz im Gegensatz zu dieser Beobachtung die stärksten Verfärbungen in Gegenwart des als inaktiv bezeichneten Peptids QTE-pas unabhängig vom verwendeten Metall beobachtet (Abb. 47).

2.4 Katalytische Peptide und Peptidderivate - Diskussion

Während *Berkessel et al.* für die durch den BCIP-Assay identifizierten freien Peptide auch in Lösung eine katalytische Aktivität nachwies, konnte diese im Falle des Berliner-Blau-Assays und des Kresylviolett-Assays nicht detektiert werden. Allerdings wurde die katalytische Aktivität in diesen Fällen durch die hydrolytische Spaltung des Bis(*para*-nitrophenyl)phosphates und UV-spektrophotometrische Bestimmung des entstehenden *para*-Nitrophenols verifiziert, wobei sowohl die Peptidderivate und die Kodierungssequenz an den Polymerbeads verblieben. *Berkessel* schließt daraus, dass bei diesen Applikationen die Polymerstruktur der Beads (Tentagel S-NH₂) Einfluss auf die Katalyse nehmen (*Berkessel & Riedl, 2000*). Dafür würde auch sprechen, dass ein Histidin allein gebunden an die Polymerbeads in Gegenwart von Eu³⁺-Ionen die Spaltung des Phosphodiesters katalysiert (*Berkessel & Riedl, 2000*). Vermutlich ist der verwendete zweidimensionale PEGMA-Film nicht als Struktureinheit zur Unterstützung der Katalyse fähig, obwohl ihre funktionellen Gruppen vergleichbar mit den verwendeten Beads [Polystyrol mit Poly(ethylenglycol)-Spacer] sind. Zudem bewirkt die Katalyse nur eine geringfügige Beschleunigung der hydrolytischen Spaltung. Im Falle des BCIP Assays wurde die vierfache, beim Berliner-Blau-Assay die doppelte und beim Kresylviolett-Assay die vierfache Produktmenge nach jeweils 20 h durch *Berkessel et al.* ermittelt (*Berkessel & Héroult, 1999; Berkessel & Riedl, 2000; Berkessel, 2003*). Dabei katalysieren die Metallionen in Lösung ebenfalls in geringerer Rate die hydrolytische Spaltung der Edukte. Bei der Synthese auf PEGMA-Filmen wird im Vergleich zur Peptidsynthese an Polymerbeads eine geringere Kopplungsausbeute erzielt und damit eine geringe Menge an Peptiden synthetisiert, da weniger Aminogruppen als Startgruppen zur Verfügung stehen. Die geringe katalytische Aktivität in Kombination mit der geringen Menge an aktiven Gruppen, könnte dazu führen, dass die Umsetzung und Bildung der farbgebenden Reaktionsprodukte ausbleibt. Falls die Metallionen nicht vollständig von der Oberfläche entfernt wurden, kann dies den Nachweis verfälschen.

In einer Dissertation aus dem Arbeitskreis von *Berkessel* zu diesen Reaktionen wird darauf hingewiesen, dass die im Rahmen einer Split-Mix-Bibliothek verwendeten Kodierungssequenzen durch die zugegebenen Metallsalze zum Teil abgebaut wurden. Dadurch war eine Identifizierung von aktiven Beads bzw. deren Ligandensequenzen mittels *Edman*-Sequenzierung nicht mehr möglich (*Riedl, 1998*). Durch die dargestellten XP-Spektren konnte beispielhaft diese Degradierung als Ursache für das Scheitern der katalytischen Assays ausgeschlossen werden. Ebenfalls wurde die vollständige Synthese der eingesetzten Peptidderivate durch XP-Spektroskopie überprüft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von *Berkessel* beschriebenen Anwendungen nicht auf unser System übertragen werden können. Inwieweit die geringere Syntheseausbeute oder die Unterschiede im Trägermaterial (Polymerbeads bzw. PEGMA-beschichtete Träger) an diesem Ergebnis beteiligt sind, bleibt jedoch ungeklärt.

2.5 Metallopeptide - Ergebnisse

2.5.1 Ni(II)-bindende Peptide

Zunächst sollte ein System entwickelt werden, um die spezifischen Metall-Peptid-Bindungen durch farbbgebende Komplexierungsreaktionen zu detektieren. Als Beispiel für die Komplexierung von Metallionen durch Peptide wurde das ATCUN-Motiv gewählt, das fünf Bindungsstellen für Nickel(II)ionen aufweist (Abb. 48) (Harford & Sarkar, 1997). Dieses aminoterminal Cu(II)- und Ni(II)-Bindungsmotiv ist Bestandteil des gut charakterisierten Albumins, welches im Blut für den Transport diverser Metalle verantwortlich ist. Das ATCUN Motiv kann definiert werden als *N*-terminales Tripeptid,

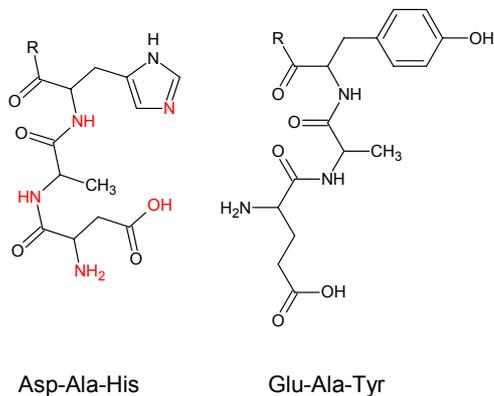


Abb. 48 Strukturformeln des Ni(II)-komplexierenden Peptids DAH (die fünf Koordinierungsstellen des Nickelions sind rot dargestellt) und des nicht komplexierenden Peptids EAY.

das (1) einen freien Aminoterminus besitzt, (2) ein Histidin in der dritten Position vom *N*-Terminus enthält und (3) zwei freie Stickstoffgruppen zwischen der ersten und der dritten Aminosäure enthält. Als aktive Sequenz wurde das humane ATCUN-Motiv mit der Sequenz DAH gewählt. Die spezifische Bindung der Metallionen beruht auf der Bildung eines Chelatkomplexes mit allen drei Aminosäuren des Tripeptids (Abb. 48). Sowohl die aktive Sequenz DAH als auch eine inaktive Sequenz EAY wurden großflächig aus Lösung auf den funktionalisierten PEGMA-gegrafteten Glasträgern (PEGMA- β Ala₃) synthetisiert. Anschließend wurden die Träger in einer

methanolischen 0,005 M Nickelacetatlösung zwei Stunden inkubiert, überschüssiges Nickel von den Trägern gewaschen und an den Peptiden verbliebene Nickelionen über eine Komplexierungsreaktion mit Dimethylglyoxim (gesättigte Lösung in Methanol, „DMG-Lösung“) nachgewiesen (Abb. 49). Dieser Ni²⁺-Dimethylglyoximkomplex [Ni(DMG)₂] ist von einer charakteristischen roten Farbe und lagerte sich an die PEGMA-Filme an, wenn die Inkubationslösung verdunstet ist. Um die spezifische Komplexierung von Nickel durch das ATCUN-Peptid zu belegen, wurden XP-Spektren aufgenommen, welche neben der Bindung der Ni(II)-Ionen die Stabilität der Peptide unter den gegebenen Versuchsbedingungen (Abb. 50) bestätigten. Nach Inkubation mit der Nickelacetat/Methanol-Lösung zeigte sich neben den unveränderten, sequenzspezifischen Signalintensitäten (N1s, O1s, C1s, Referenzprobe



Abb. 49 Anfärbung durch den Ni(DMG)₂ von PEG-OH Trägern (links) im Vergleich zu Trägern mit den gekoppelten Peptiden DAH (Mitte) und EAY (rechts) nach Inkubation mit Ni(II)-Lösung.

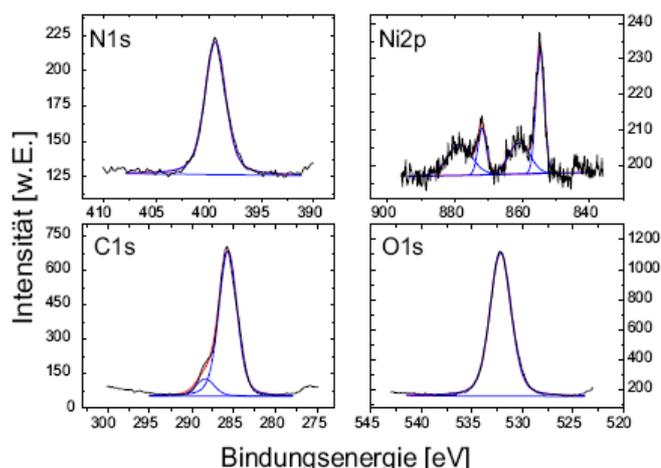


Abb. 50 XPS-Detailspektren der oberflächengebundenen Sequenz His-Ala-Asp nach 2stündiger Inkubation in eine Lösung von 0,005 mol Nickelacetat in Methanol.

nicht dargestellt) ein Signal im Bereich von 900-840 eV, welches dem Ni2p-Orbital zugeordnet werden konnte (Li et al., 1984). Dieses Signal wurde beim Peptid mit der Kontrollsequenz EAY nach gleicher Behandlung nicht detektiert.

In einem weiteren Versuch wurden die vorsynthetisierten Peptide DAH und EAY auf einen modifizierten Träger (PEGMA- β Ala₃-SMCC) mit dem *BioChip Arrayer* (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) gespottet (0,9 nl vorsynthetisierte Peptide, 1

mM in Phosphatpuffer pH 7). Nach erfolgter Kopplung wurde der einfache Array ebenfalls in methanolischer 0,005 M Nickelacetatlösung inkubiert und gewaschen. Abschließend wurde der Träger mit der methanolischen DMG-Lösung überschichtet und nach dem Verdampfen der Lösung wurde unter dem Mikroskop nach Bindungsereignissen gesucht. Leider konnte durch diesen Versuch weder die Selektivität der Ni²⁺-Komplexierung des Peptides DAH gegenüber der Kontrollsequenz EAY bestätigt, noch ein Detektionslimit für den Nachweis bestimmt werden. Die Diffusion des Nachweisreagenz auf der Oberfläche führte zum „Verschwimmen“ der roten Ni(DMG)₂-Komplexe, so dass die Koordinierung der Ni²⁺-Ionen keinem Synthesort und somit keinem spezifischen Peptid zugeordnet werden konnte. Um diese Diffusion zu minimieren, wurden höherwertiger Alkohole (z.B. Propanol, Glycerol) als DMG-Lösungsmittel eingesetzt, welche das Problem jedoch nicht lösen konnten. Auch der Versuch die Ni(II)-Ionen durch das Auflegen einer - mit Nachweisreagenz getränkter - Zellulosemembran zu detektieren scheiterte.

2.5.1.1 Oberflächenstrukturierung mittels Perfluorierter Filme

In der Folge wurde versucht eine Strukturierung der Oberfläche in hydrophile und hydrophobe Bereiche zu erzielen. In den hydrophilen Reaktionsräumen sollten die Peptide synthetisiert werden, während die Oberfläche zwischen den Synthesorten durch Aufbringen eines perfluorierten Filmes modifiziert werden. Die eingebrachten Fluoridgruppen rufen eine starke Hydrophobie hervor, durch die die Diffusion der Ni(DMG)₂-Komplexe in methanolischen Lösungen verhindert werden sollte. Diese Oberflächenstrukturierung erfolgte nach der Synthese der aminotermierten PEGMA-Filme (PEGMA- β Ala oder PEGMA- β Ala₃), wobei die N-terminalen Aminogruppen als Initiatorgruppen genutzt wurden. In ersten Versuchen wurde Perfluoro-1-oktansulfonsäurefluorid an die Oberfläche gekoppelt. Diese Substitutionsreaktion beginnt mit dem Angriff der Sulfonylgruppe durch das nucleophile Stickstoffatom der Aminogruppe, wobei Fluoridionen frei werden. Darauf folgt die Deprotonierung der Aminogruppe

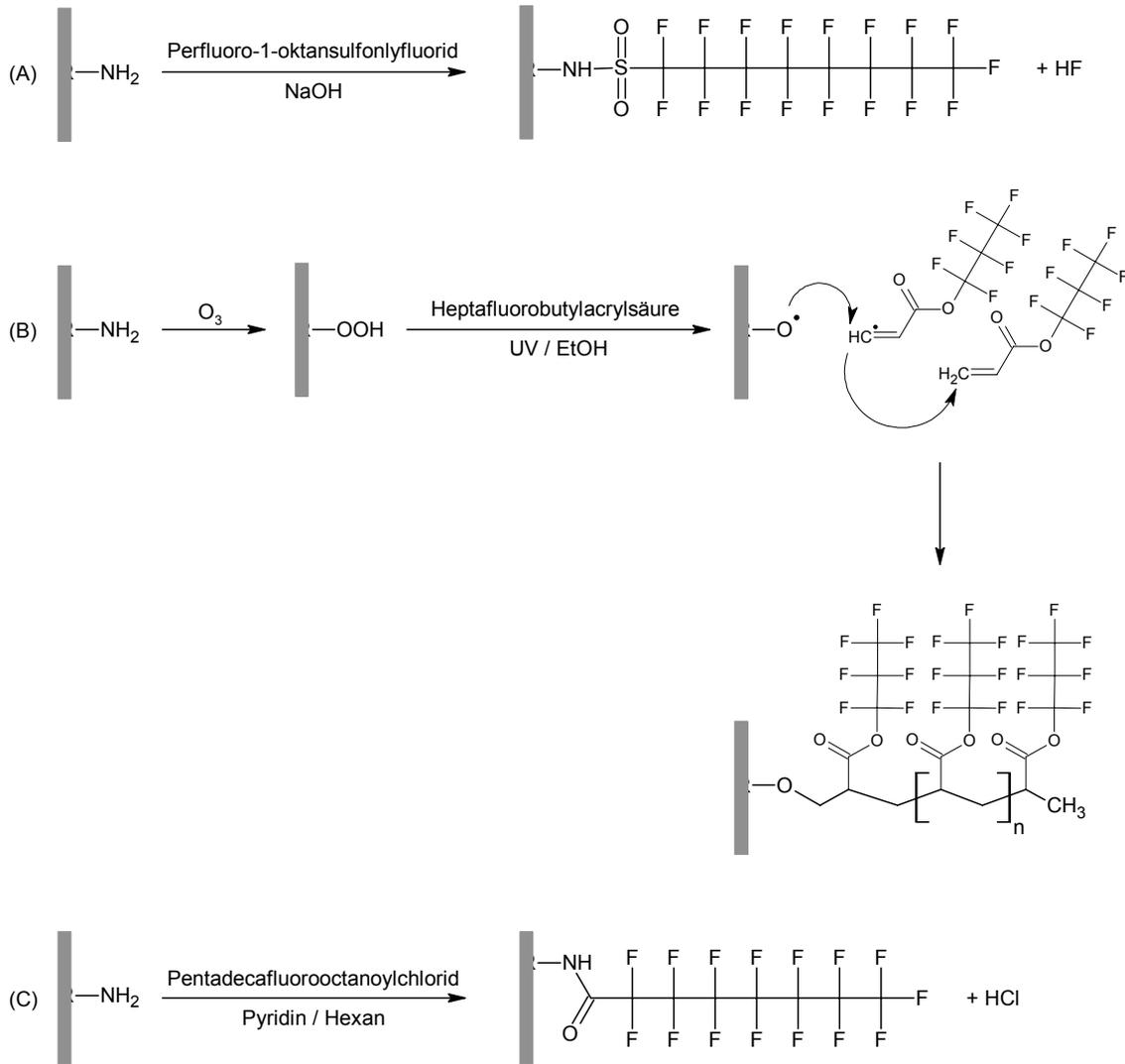


Abb. 51 (von oben nach unten) Synthese von hydrophoben Filme aus Perfluorooktansulfonsäurefluorid (A), aus Heptafluorobutylacrylsäure durch UV-induzierte Polymerisation (B) und aus Pentadecafluorooktanoylchlorid (C).

und ein Sulfonylamid entsteht. Die Synthese wurde in einer 0.25 %igen NaOH-Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt, um die entstehende Säure abzufangen und somit eine potentielle Degradierung des Polymerfilmes bzw. des Substrats zu verhindern (Abb. 51, A).

Die zweite Variante der Oberflächenmodifikation basiert auf dem etablierten Verfahren zur UV-induzierten Herstellung von PEGMA-Filmen auf Glasträgern (Beyer, 2005; Beyer et al., 2006). Die aminoterminierten oder silanisierten Träger wurden Ozon ausgesetzt (30 min), um Hydroperoxidgruppen einzufügen, die als photosensitive Radikale als Startgruppen für die folgende UV-induzierte Graftpolymerisation fungieren. Dazu wurde der Film in einer ethanolschen Lösung mit 5 vol.% 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluorobutylacrylsäure inkubiert und 60 min bestrahlt. Aus der Umsetzung der einzelnen Monomerbausteine entstanden durch Kettenverlängerung perfluorierte Polymerfilme (Abb. 51, B).

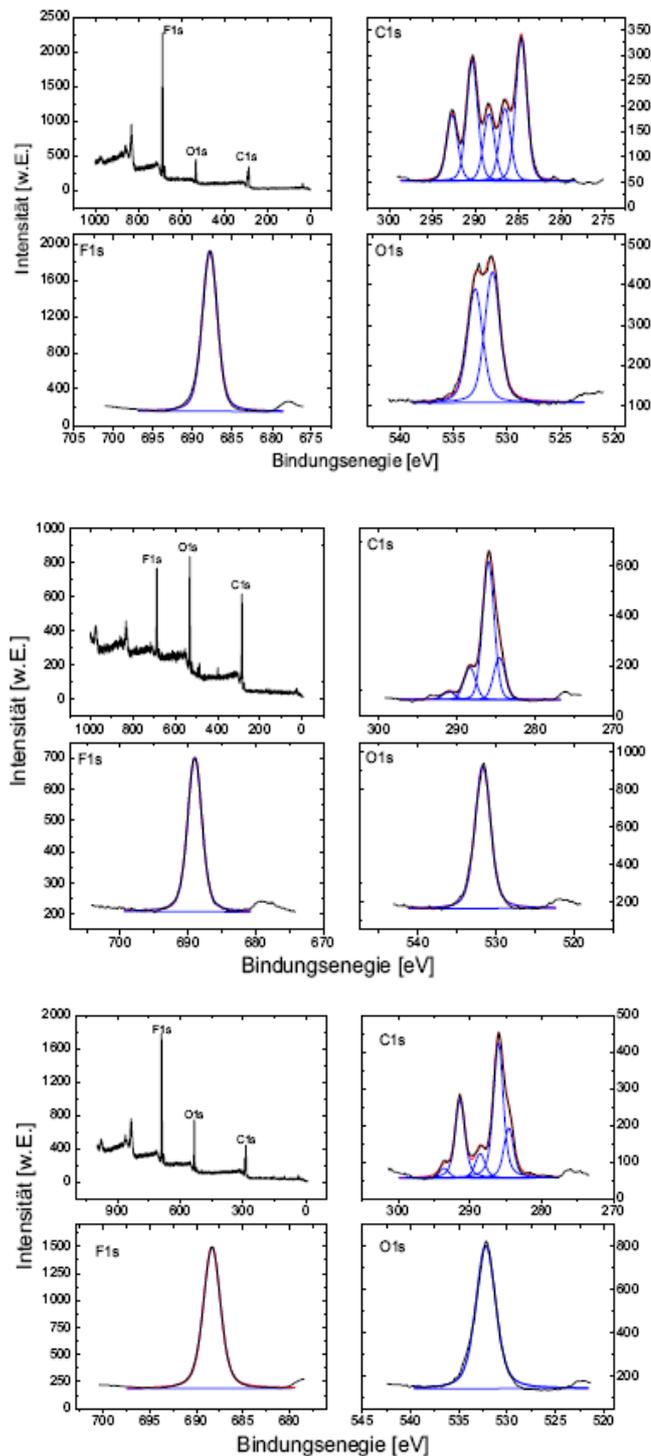


Abb. 52 (oben) XP-Spektren des polymerisierten 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluorobutyl-acrylsäure auf einem silanisierten Glasträger; XP-Spektren der Filme durch die Umsetzung von Perfluorooctansulfonsäurefluorid (Mitte) und Pentadecafluorooctanoylchlorid (unten)

Die dritte Methode zur Synthese von hydrophoben Strukturen nutzt die nucleophile Acylierung von Aminogruppen durch Säurechloride. Dabei werden aminoterminierte Polymerträger in Hexan mit Pentadecafluorooctanoylchlorid versetzt. Um die Reaktion zu starten wurde die organische Base Pyridin zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt (Abb. 51 C) (Brantley, 2005; Balachandra et al., 2003).

Während die PEGMA-Oberflächen hydrophil sind ($\theta_{adv.} = 52.0^\circ \pm 3.2^\circ$), wiesen alle Varianten der modifizierten Oberflächen einen hydrophoben Charakter auf. Dabei waren die Pentadecafluorooctanoyl-Filme ($\theta_{adv.} = 126.3^\circ \pm 3.5^\circ$) hydrophober als die perfluorierten Graftpolymerfilme ($\theta_{adv.} = 121.1^\circ \pm 3.7^\circ$) und die PEGMA-Filme nach Ankopplung des Sulfonylfluorids ($\theta_{adv.} = 95.1^\circ \pm 1.9^\circ$). Die erfolgreichen Umsetzungen wurden durch XP-Spektren verifiziert (vergleiche Abb. 52). Die elementspezifischen Signale (O1s, C1s, F1s) spiegeln die Effizienz der jeweiligen Umsetzung wider. Im Falle der perfluorierten Graftpolymerfilme auf silanisierten Trägern durch 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluorobutylacrylsäure (Abb. 52 oben) kann die Abschwächung des Si2p-Signals (50-0 eV) als Maß für die

Schichtdicke der fluorierten Filme angesehen werden. Für die anderen beiden Modifizierungen wird diese Effizienz durch die Abschwächung des N1s-Signals (410-160 eV) verdeutlicht (Referenzspektren nicht dargestellt). Die Stärke des F1s-Signales im Bereich von 700-680 eV ist ein

gutes Maß für die Hydrophobie der verschiedenen Filme, da die fluoridischen Endgruppen das hydrophobe Verhalten der Oberflächenmodifikation bedingen.

In den folgenden Versuchen wurden hydrophile Reaktionsräume dadurch erzeugt, dass die erste Schicht Monomerpartikel auf einem aminoterminierten Träger (z.B. Objektträger) abgeschieden und angeschmolzen wurde. Die Partikelschmelze sollte die reaktiven Syntheseorte schützen und diente demzufolge als Maske, während alle umliegenden Aminogruppen modifiziert wurden (Abb. 53).

Es stellte sich in ersten Versuchen heraus, dass die Hydrophobie der Sulfonylchlorid-Filme nicht ausreicht, um wässrige Lösungen oder Methanol in den hydrophilen Strukturen zu halten. Daher wurde diese Modifikation verworfen. Die ersten erfolgreichen Ergebnisse zur Strukturierung der Oberfläche in hydrophile und hydrophobe Bereiche wurden mittels der perfluorierten Graftpolymer-Filme erzielt und sind in Abbildung 53 dargestellt. Leider waren diese viel versprechende Resultate nicht zuverlässig reproduzierbar. Die erzielten Schichtdicken variierten stark (0 – 220 nm). Teilweise wurde die Partikelschmelze durch das Ozon und die UV-Strahlung angegriffen und die methanolische

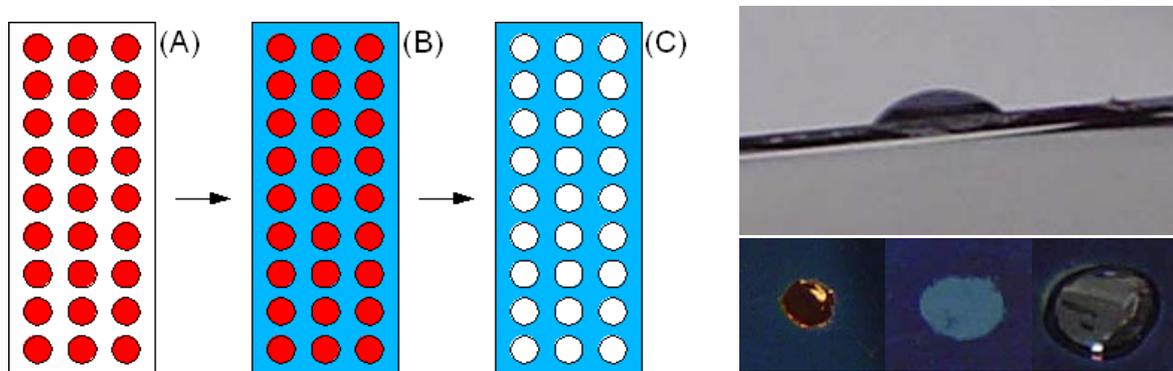


Abb. 53 (linke Seite) Schematische Darstellung der Strukturierung einer Oberfläche; (A) geschmolzene Aminosäurepartikel bilden schützenden Sphären, (B) die umliegende Oberfläche wird modifiziert, (C) nach dem Abwaschen der Schmelze entstehen hydrophile Höfe an den Peptidsyntheseorten, während die umliegende Fläche hydrophob ist; (rechte Seite, unten) perfluorierter Graftpolymerfilm vor (links) und nach (rechts) dem Abwaschen der Partikelschmelze, ein Wassertropfen verbleibt im hydrophilen Hof (rechts unten und oben).

Polymerisationslösung löste Bestandteile (Pyrazolon Orange) aus der Partikelmatrix. Eine Anpassung der Reaktionsbedingungen (verkürzte Ozon- und UV-Exposition) und der Test von verschiedenen Lösungsmitteln (z.B. MeOH, EtOH) führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Daher wurden in den nachfolgenden Versuchen die Pentadecafluorooktanoyl-Filme genauer untersucht. Diese weisen eine höhere Hydrophobie als Filme nach Anbindung des Sulfonylchlorids oder die perfluorierten Polymerfilme auf. Zudem wurden reproduzierbar Pentadecafluorooktanoyl-Filme mit durchschnittlichen Schichtdicken von 30 nm hergestellt. Die Verwendung von Hexan als Lösungsmittel bei der Synthese verhindert das Auflösen der Partikelschmelze und schont dadurch die in die Partikelmatrix eingebetteten Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Ester. Die Stabilität der hydrophoben Filme gegenüber den, bei der *Merrifield* Peptidsynthese verwendeten Reagenzien, wurde getestet. Die Filme wurden sowohl mit einer Lösung aus 20 vol.% Piperidin in DMF, mit einer 4 %igen Essigsäurelösung in DMF als auch mit einer Mischung aus 91 vol.% Trifluoressigsäure, 5 vol.% Dichlormethan, 2 vol.% Wasser und 3 vol.% Triisobutylsilan behandelt. Anschließend wurde die Struktur der Filme anhand von XP-Spektren untersucht und die Ergebnisse mit einem nicht

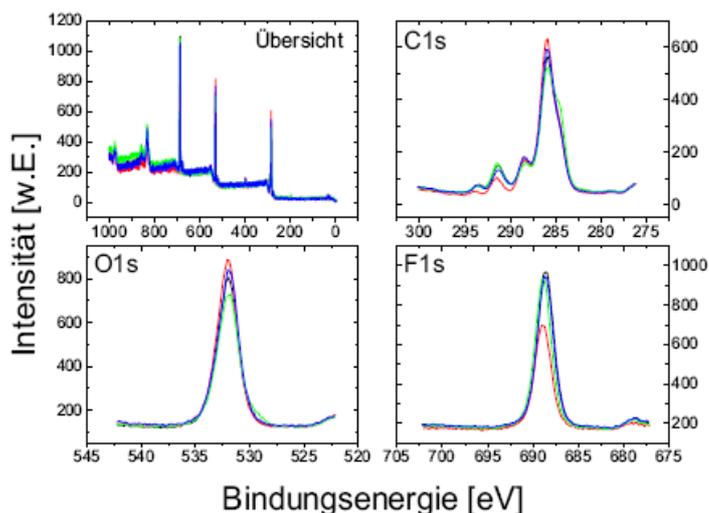


Abb. 54 Vergleich der XP-Spektren von Pentadecafluorooctanoyl-Filmen (schwarz) nach der Behandlung mit 20 vol.% Piperidin in DMF (rot), mit 5 vol.% Essigsäureanhydrid in DMF (grün) und mit einem Gemisch aus 91 vol.% TFA, 4 vol.% DCM, 3 vol.% Triisobutylsilan und 2 vol.% Wasser (blau)

behandelten Film verglichen. Ein geringer Unterschied in den C1s-, O1s- und F1s-Signalen, aber kein kompletter Abbau der Filme wurde festgestellt (Abb. 54). Der Kontaktwinkel der Filme nimmt durch die Behandlung um durchschnittlich $21,6^\circ$ ab (Tab. 5). Dennoch bleibt der hydrophobe Charakter der Filme grundsätzlich erhalten. Bei abschließenden Versuchen wurden die oben genannten Peptide DAH und EAY unter Verwendung der Aminosäurepartikel synthetisiert.

Nach der Kopplung der ersten Aminosäure wurde die umliegende Oberfläche mittels des Pentadecafluorooctanoylchlorid modifiziert. Im Anschluss wurden die Matrixbestandteile der Partikel abgewaschen, nicht abreagierte Aminogruppen der Oberfläche acetyliert und die Fmoc-Gruppe am N-Terminus der Aminosäure durch die Base Piperidin abgespalten. Bereits nach dieser Behandlung und

Tab. 5 Kontaktwinkel $\theta_{adv.}$ der Pentadecafluorooctanoyl-Filme nach der Behandlung mit verschiedenen Reagenzien, die im Rahmen der Fmoc-Peptidsynthese eingesetzt werden.

Oberflächenmodifikation	Kontaktwinkel $\theta_{adv.}$ [°]
Pentadecafluorooctanoyl-Filme (unbehandelt)	$126,3 \pm 1,67$
20 vol.% Piperidin in DMF	$105,4 \pm 2,4$
5 vol.% ESA in DMF	$107,4 \pm 1,67$
91 vol.% TFA; 4 vol.% DCM; 3 vol.% Triisobutylsilan; 2 vol.% deion. Wasser	$101,4 \pm 7,4$

vor der Kopplung der zwei weiteren Aminosäuren, konnte eine Veränderung der Oberfläche festgestellt werden. Der hydrophobe Charakter der modifizierten Oberfläche verringerte sich nach der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe ($\theta_{adv.} < 90^\circ$). Bei diesem Schritt entsteht das Piperidin-Dibenzofulven-Addukt, inwieweit diese Verbindung mit der Oberfläche interagiert, konnte nicht festgestellt werden. Die Base Piperidin allein führte ebenfalls zu einem verringerten Kontaktwinkel (Tab. 5) allerdings nicht in dem bei der Peptidsynthese beobachteten Maß. Eine abschließende Anwendung der hydrophoben/hydrophilen Strukturen lieferte demzufolge auch kein zufriedenstellendes Ergebnis, da wiederum die eindeutige Zuordnung der $Ni(DMG)_2$ zur Identifizierung von Ni^{2+} -bindenden Peptiden durch das „Verschwimmen“ der gesättigten DMG-Lösung nicht möglich war.

2.5.2 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$ -bindende Peptide

2.5.2.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Um in einer Peptidbibliothek stabile [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ -Komplexbildner zu identifizieren, wurden anhand von zwei Beispielpeptiden optimierte Reaktionsbedingungen (insbesondere der Waschkonditionen) für den Nachweis definiert. Dafür wurden der [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$ -bindende His-tag HHHHHH (Schibli & Schubiger, 2002) und das Peptid TGGYGG eingesetzt. Das Peptid TGGYGG, dessen Aminosäurereste keine funktionellen Gruppen zur Komplexierung tragen, soll bei den folgenden Versuchen als Negativkontrolle fungieren. Beide Peptidsequenzen wurden vorsynthetisiert, wobei weder die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe noch die Seitenschutzgruppen entfernt wurden. Die geschützten Peptide wurden großflächig auf aminoterminalen PEGMA-Filmen mit Hilfe von HOBt und HBTU kovalent gekoppelt. In diesem Fall wurde auf die Anbindung der Peptide mit Hilfe des SMCC-Linkers verzichtet, da das hierfür benötigte C-terminale Cystein ein potentiell starker Ligand für die Koordinierung von Metalliganden ist (Kramer et al., 1994; Malin et al., 1995; Kaim & Schwederski, 1995). Als Trägermaterial wurden Silizium-Wafer genutzt, die zur Vermessung der Filme (PEGMA- βAla_3) mittels Ellipsometrie und XPS geeignet sind und die gleichen Charakteristika wie Glasoberflächen zeigen. Die Komplexierung und die Waschbedingungen wurden mit [$\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ getestet. Dieser nicht radioaktive Komplex wurde durch das Erhitzen von [$\text{Re}(\text{CO})_5$] Br in Wasser hergestellt. Durch Ligandenaustausch entstand der [$\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ -Komplex in hoher Ausbeute (Lazarova et al., 2004). Die Eigenschaften dieses Komplexes ähneln denen des [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ -Komplexes, daher wird der Re-Carbonyl-Komplex vielfach als Mimikrie eingesetzt, wenn auf die Verwendung des radioaktiven Materials verzichtet werden soll bzw. – wie in bei den folgenden

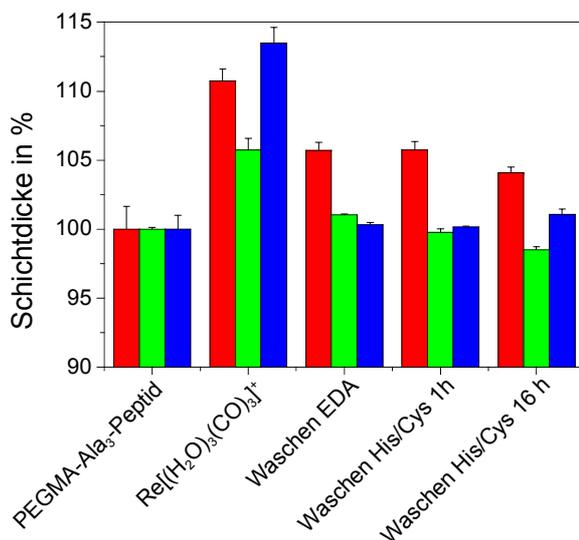


Abb. 55 Ab- und Zunahme der Schichtdicken der PEGMA- βAla_3 -HHHHHH (rot), PEGMA- βAla_3 -TGGYGG- (grün) und PEGMA- βAla_3 -OAc-Trägern (blau) nach der Inkubation mit [$\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$; Waschschrte mit konkurrierenden Komplexbildner wie EDA, Cystein und Histidin entfernen unspezifisch gebundene Komplexe von dem Träger.

Untersuchungen - die Analytik außerhalb eines Sicherheitslabors stattfindet.

Nach der Abspaltung der Fmoc- und der Seitenschutzgruppen von den gekoppelten Modellpeptiden, wurden die Träger in einer Lösung von 1 μM [$\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ in PBS inkubiert (1 h, 100°C). Um überschüssigen Komplex zu entfernen, wurden die Träger mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 5 vol.% Ethylendiamin (EDA) in DMF gewaschen. Das stark basische EDA wirkte dabei, aufgrund der zwei als

Elektronenpaardonatoren wirksamen Stickstoffatome, als Chelator und tritt in Konkurrenz zur Komplex-Peptid-Bindung. Im folgenden Waschschriff wurden die Peptid-Komplexe mit freiem Cystein und Histidin (je 10 mM) in PBS-Pufferlösung (pH 7.4) - einem sog. Challenging-Reagenz - gewaschen. *L*-Cystein und *L*-Histidin tragen in der Seitenkette koordinationsfähige Gruppen, so dass dieser Waschschriff in gewissem Maße *in vivo* Bedingungen nachahmt. Im menschlichen Körper konkurrieren verschiedene Aminosäuren, Peptide und Proteine um die verfügbaren Metallionen. Als Radiotracer kommen daher nur diejenigen Komplexe in Frage, die unter diesen Bedingungen deutlich stärker an das Peptid binden und nicht degradieren. Nach jedem Schriff wurde die Veränderung der Schichtdicke der Proben mittels Ellipsometrie bestimmt.

Abbildung 55 zeigt die prozentuale Zunahme der Schichtdicke nach der Inkubation mit $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ und die Abnahme bedingt durch verschiedene Waschprozeduren. Der Fehler in der Darstellung ergibt sich aus der Mittelung von vier Messwerten. Durch diese Ellipsometrischen Messungen wurde deutlich, dass nach den verschiedenen Waschschriffen, nur am His-tag der $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplex in größerer Menge (Schichtdickenzunahme) gebunden blieb. Eine unspezifische Anlagerung an de Oberflächenstruktur (PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-Ac}$) und an das nicht bindende Peptid (PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-TGGYGG}$) wurde nur in geringem Maße beobachtet.

Um diese Daten der halb-qualitative Messung der Schichtdicke zu verifizieren, wurden die Träger in der Folge mittels XP-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 56 (rechte Seite) sind die Signale des $\text{Re}4f_{7/2}$ -Detailspektrums dargestellt. Der Vergleich zeigt die auf dem Träger verbleibende Menge an $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplex, die nach 1 stündigem Waschen mit gelöstem *L*-Cystein und *L*-Histidin in PBS-Puffer (pH 7,4) auf der Oberfläche detektiert wurde. Nach dem beschriebenen Waschenschriff konnte kein Rhenium auf den Referenzträgern (PEG- $\beta\text{Ala}_3\text{-Ac}$) nachgewiesen werden (Abb. 56, blau). Kleinere Spuren verblieben auf den PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-TGGYGG}$ -Proben (Abb. 56, grün) und die größte Menge wurde auf den PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-HHHHHH}$ -Proben (Abb. 56, rot) nachgewiesen. Das Verhältnis der Rhenium-Menge entsprach dabei 45,98:6,67:1 (PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-HHHHHH}$:PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-TGGYGG}$:PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-Ac}$) für die einstündige Waschprozedur (Abb. 56, linke Seite). Der längere

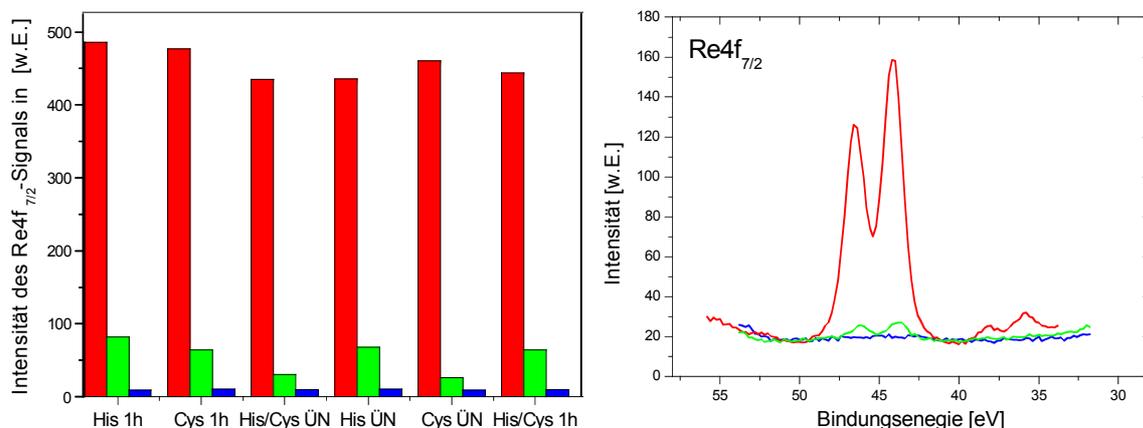


Abb. 56 (links) Abnahme des $\text{Re}4f_{7/2}$ -XP-Signal durch das Waschen der Träger mit sog. Challenging-Reagenzien; (rechts) Vergleich des $\text{Re}4f_{7/2}$ -Signals nach der Inkubation mit dem Re-Carbonyl-Komplex und 1stündigem Waschen mit 10 mM His und 10 mM Cys in PBS-Puffer, während PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-HHHHHH}$ (rot) den Komplex stabil komplexiert, wird der Re-Komplex fast komplett von den PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-TGGYGG}$ - (grün) und PEGMA- $\beta\text{Ala}_3\text{-OAc}$ -Trägern (blau) gewaschen.

Waschprozess (16 h) lieferte ein Verhältnis von 46,16:3,25:1. Das bedeutet, dass ca. die vierzehnfache Menge an Rhenium durch den His-tag komplexiert wird bzw. die siebenfache Menge nach einer Stunde, als durch die nicht-komplexierende Peptidsequenz TGGYGG. Die Daten bestätigten damit die durch die Ellipsometrie erhaltenen Ergebnisse. Zudem wurde durch die Betrachtung der C1s- und N1s- Detailspektren (nicht dargestellt) eine Degradierung der Peptide durch die verwendete Waschprozedur ausgeschlossen. Leider konnte die längere Waschprozedur nicht angewendet werden, da die Halbwertszeit $t_{1/2} = 6$ h des ^{99m}Tc Technetiums eine derartige zeitintensive Waschprozedur nicht erlaubt. Die Signalintensität würde proportional abnehmen. Ein siebenfacher Überschuss an radioaktivem Material nach dem einstündigen Waschen sollte jedoch eine ausreichende Menge darstellen, um definierte Unterschiede zwischen komplexierenden und nicht koordinierenden Peptiden mittels Autoradiographie zu detektieren.

2.5.2.2 Synthese eines Peptidarrays mit 133.224 Peptidspots

Nach der Bestimmung der Waschkonditionen wurde ein Peptidarray hergestellt, um die Komplexierung von $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ an Hexapeptide zu untersuchen. Dieser Array bestand aus 133.224 unterschiedlichen Peptidspots. Jeder Spot repräsentierte ein Gemisch aus 361 Peptiden der Sequenz $\text{XAs}_1\text{As}_2\text{As}_3\text{As}_4\text{X}$, wobei X ein Gemisch aus allen proteinogenen Aminosäuren außer L-Cystein darstellt.

Zur Synthese wurden Glasplatten des Formates 21 x 22 cm² genutzt. Diese wurden silanisiert mit PEGMA-Filmen versehen und durch Anbindung von drei β -Alanin funktionalisiert. Im ersten Schritt wurde ein Gemisch aus 19 Fmoc-L-Aminosäure-OPfp-Estern aus Lösung (Gesamtmolarität: 0,1 M in

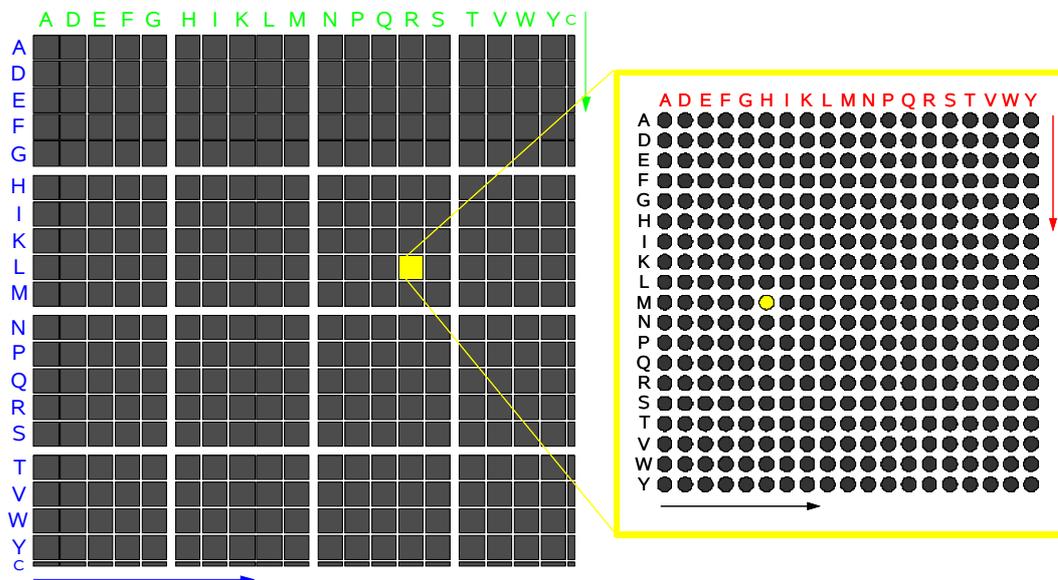


Abb. 57 Schematische Darstellung des Druckmusters; nach der vollflächigen Kopplung eines Aminosäuregemisches (X), wurden vier Aminosäuren nacheinander an definierte Orte mittels des Laserdruckers gekoppelt. Im ersten Syntheseschritt werden 19 As pro Feld (grau) in Spalten gedruckt (rote Beschriftung, rechte Seite), im zweiten Schritt in Zeilen pro Feld (Schwarz), dann wurden alle 20 A in Spalten (grün) und in Zeilen (blau) über den gesamten Array punktgenau verdruckt; daraus ergibt sich für den gelb-markierten Peptidspot z.B. die As-Sequenz: Träger- $\text{XAs}_1\text{As}_2\text{As}_3\text{As}_4\text{X-NH}_2 = \text{Träger-XHMLX-NH}_2$

DMF) an die Oberfläche gekoppelt. Alle proteinogenen Aminosäuren wurden hierzu verwendet außer *L*-Cystein, da das Cystein - wie bereits erwähnt - ein potentiell starker Ligand für die Chelatbildung ist und eine unspezifische Komplexierung hervorrufen könnte. Um eine statistische Verteilung der Aminosäuren zu erreichen, wurden die Aminosäuren Fmoc-*L*-Arginin(Pbf)-OPfp und Fmoc-*L*-Isoleucin-OPfp in doppelte Menge (im Vergleich zu allen übrigen Fmoc-*L*-Aminosäure-OPfp Estern) zugegeben. Die Menge an Fmoc-*L*-Glycin-OPfp wurde halbiert. Die OPfp-Ester dieser Aminosäuren zeigten bei Kopplungsversuchen eine höhere Kopplungsausbeute (Fmoc-*L*-Glycin-OPfp) bzw. eine verringerte Kopplungsausbeute (Fmoc-*L*-Arginin(Pbf)-OPfp und Fmoc-*L*-Isoleucin-OPfp) (Daten nicht dargestellt).

Nach der Kopplung des Aminosäuregemisches an den Träger wurden diese in vier Syntheszyklen mit Hilfe des Peptidlaserdruckers und den Aminosäurepartikeln um vier weitere Monomerbausteine verlängert. Dadurch entstand eine Bibliothek mit 133.224 unterschiedlichen Peptidspots auf dem Träger. In Abbildung 57 ist das verwendete Druckmuster schematisch dargestellt. Bei der Synthese wurde die in Kapitel 2.1.2. beschriebene und optimierte Waschprozedur eingesetzt und es wurden ebenfalls zwei Kopplungszyklen zur Steigerung der Kopplungsausbeute durchgeführt. Die Kopplung der einzelnen Partikellagen wurde durch die reversible Anfärbung der *N*-terminalen Aminogruppen mit Bromphenolblau (0,01 % Bromphenolblau in Methanol) nach Abspaltung der Fmoc-Gruppen kontrolliert (Anfärbung nicht dargestellt). Im letzten Schritt wurde wiederum ein Gemisch aus 19 Fmoc-*L*-Aminosäure-OPfp-Estern aus Lösung angekoppelt. Die Seitenschutzgruppen der Peptide wurden mit TFA abgespalten (51 vol.% TFA, 44 vol.% DCM, 3 vol.% Triisobutylsilan und 2 vol.% deion. Wasser). Um eine Protonierung der Peptide durch die Abspaltungslösung auszuschließen, wurden die Peptidarrays im Anschluss mit basischem DIPEA in DMF (5 vol.% DIPEA in DMF) gewaschen.

2.5.2.3 Detektion von $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -bindenden Peptidmotiven

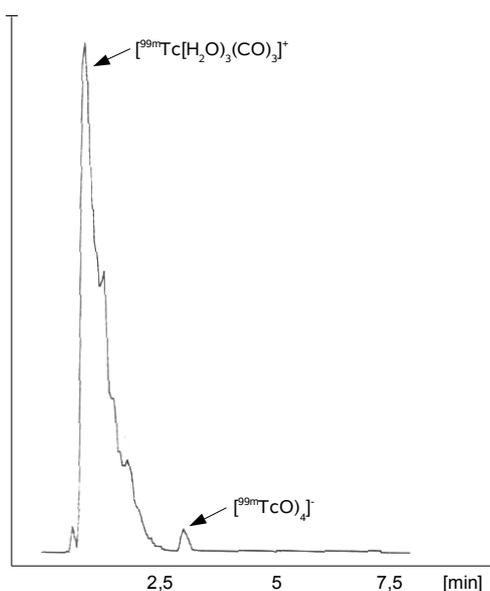


Abb. 58 Radio-HPLC-Spur des $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplexes der aus $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ im IsoLink[®]-Generator (Mallinckrodt, Petten/Niederlande) synthetisiert wurde.

Für den Nachweis wurden die Peptidarrays 30 min in PBS-Puffer (pH 7,4) inkubiert, um die Polymerstruktur des PEGMA-Films aufzulockern und ein neutrales Reaktionsmilieu zu erzeugen. Parallel wurde ca. 1 ml $^{99m}\text{TcO}_4^-$ aus einem $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator in physiologischer Kochsalzlösung eluiert. Diese Pertechnetatlösung wurde in einen IsoLink[®] Markierungskit (Mallinckrodt, Petten/Niederlande) injiziert und das Pertechnetat in 20 min bei 90°C in den $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplex überführt. Die erfolgreiche Reduktion mit einer quantitativen Ausbeute von ca. 90 % wurde anhand eines Radio-HPLC-Laufs belegt (Abb.58).

Nach diesem analytischen Schritt wurde der PBS-Puffer (200 ml) mit ca. 1,2 GBq der $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Lösung versetzt. Der pH-Wert der Lösung stieg dabei von pH 7,4 auf pH 7,7 an. Der Array wurde dieser Lösung 30 min ausgesetzt und nach den oben bestimmten Waschbedingungen (EDA in DMF, Challenging-Reagenz) von überschüssigem Komplex gereinigt. Nach der Trocknung des Arrays an der Luft wurde eine Autoradiographie (Expositionszeit: 6 h) aufgenommen, die ein spezifisches Signalmuster lieferte (Abb. 59). Dieser Versuch wurde zweimal

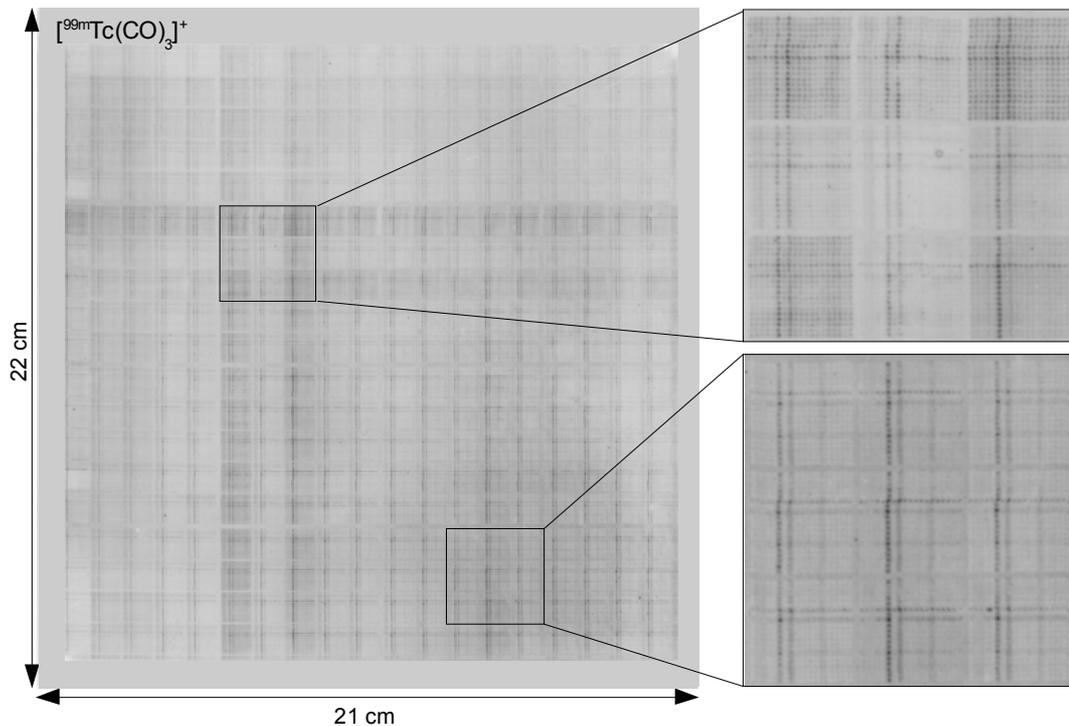


Abb. 59 Autoradiographie eines Peptidarray mit 133.224 Peptidspots nach der Inkubation mit dem $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Komplex. Die spezifische Bindung von $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ an bestimmte Peptide konnte durch die intensivere Schwarzfärbung detektiert werden.

unabhängig voneinander durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Autoradiographien wurde durch das leicht unregelmäßige Druckmuster und den inhomogenen Hintergrund der synthetisierten Peptidarrays erschwert. Da das Arrayformat (21 x 22 cm²) keinem Standard entsprach und eine Annotierung der einzelnen Peptidspots nicht vorlag, konnten die Arrays nicht mit kommerziell erhältlichen Analyseprogrammen ausgewertet werden. Daher wurde ein angepasstes Analyseverfahren verwendet (Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg/Deutschland), welches Unregelmäßigkeiten im Druckmuster und des Hintergrundes ausgleichen konnte und die Auswertung der erhaltenen Autoradiographien erst ermöglichte. Dabei wurden positive Signale anhand des Schwärzungsgrades der einzelnen Spots detektiert. Die Bestimmung eines einzelnen Peptids als absolut stärkster Binder war damit nicht möglich, da eine Gruppe von Signalen den höchsten Schwärzungsgrad erreichte. Für die Auswertung wurden nur die Signale in Betracht gezogen, die bei beiden Versuchsdurchführungen ein vergleichbar starkes Signal lieferten, wodurch unspezifische Signale verursacht durch die jeweilige Durchführung ausgeschlossen wurden.

Auf dem ersten Array wurden 9.566 positive Signale detektiert. Demnach binden 7,2 % aller auf dem Array präsentierter Peptide spezifisch den $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Komplex. Auf dem zweiten Array konnten

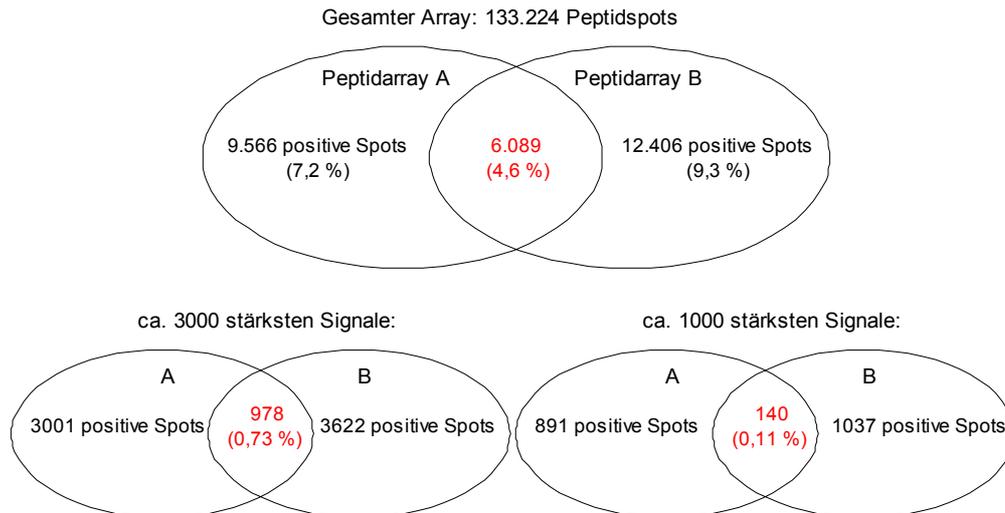


Abb. 61 Schnittmengen (rot) der zwei Versuche zur Bestimmung von $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -komplexierenden Peptiden; (oben) die Anzahl der $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -komplexierenden Peptide und ihr prozentualer Anteil (in Klammern) an der Peptidgesamtanzahl auf dem Array sind dargestellt; (unten) die Schnittmengen der ~3000 und ~1000 stärksten Signale und die Anzahl an Sequenz-Übereinstimmungen (rot) sind dargestellt.

12.406 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -koordinierende Aminosäuresequenzen (9,3 %) bestimmt werden, wobei 6089 dieser Peptidsequenzen ebenfalls auf dem ersten Array ein positives Signal lieferten (Abb. 60). Um nun Rückschlüsse auf die zur Komplexierung des $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Komplexes benötigten Aminosäurereste zu ziehen, wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Aminosäure innerhalb der identifizierten Sequenzen bestimmt. Für beide Arrays konnte ein vermehrtes Auftreten des *L*-Histidins (jeweils > 19 %) und des *L*-Lysins (jeweils mehr als 10 %) bestimmt werden. Alle anderen Aminosäuren (bis auf *L*-Cystein) waren mit durchschnittlich 5 % in den Sequenzen vertreten. *L*-Cystein wurde bei der Synthese des Arrays nur in einigen Randbereichen eingesetzt. Die entsprechenden *L*-Cystein-haltigen Peptidspots lieferten keine auffälligen Signale (Abb. 59).

In einem zweiten Schritt wurde die Menge der betrachteten Peptidsequenzen eingeschränkt, um selektiv nur innerhalb der stabilsten $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Peptid-Komplexe koordinierende Motive und Aminosäurereste zu identifizieren. Dazu wurden die stärksten Signale auf beiden Arrays betrachtet, wobei davon ausgegangen wurde, dass starke Signale nur von stabil $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -komplexierenden Peptidspots hervorgerufen wurden. Innerhalb der 3000 stärksten Signale auf beiden Array konnten 978 Sequenz-Übereinstimmungen ermittelt werden. Innerhalb der 1000 stärksten Signale wurden 140 Übereinstimmungen detektiert (Abb. 60). Diese Schnittmengen repräsentieren nur noch 0,73 % bzw. 0,11 % aller auf dem Array synthetisierten Peptidspots (Abb. 60). Um nun diejenigen Aminosäurereste und Motive zu identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit am effektivsten zur $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplexierung beitragen, wurde in einem ersten Schritt die Häufigkeit der einzelnen Aminosäurereste innerhalb dieser Sequenzen ermittelt in Abhängigkeit von ihrer Position im Hexapeptid. Trägt einer dieser Reste effektiv zur Komplexbindung bei, sollte er vermehrt unter den identifizierten Sequenzen anzufinden sein. In Abbildung 61 ist die prozentuale Verteilung der Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Position im Hexapeptid dargestellt. In jeder definierten Position der Hexapeptide (*N*-XAs₁As₂As₃As₄X-C) wurden signifikante Unterschiede in der

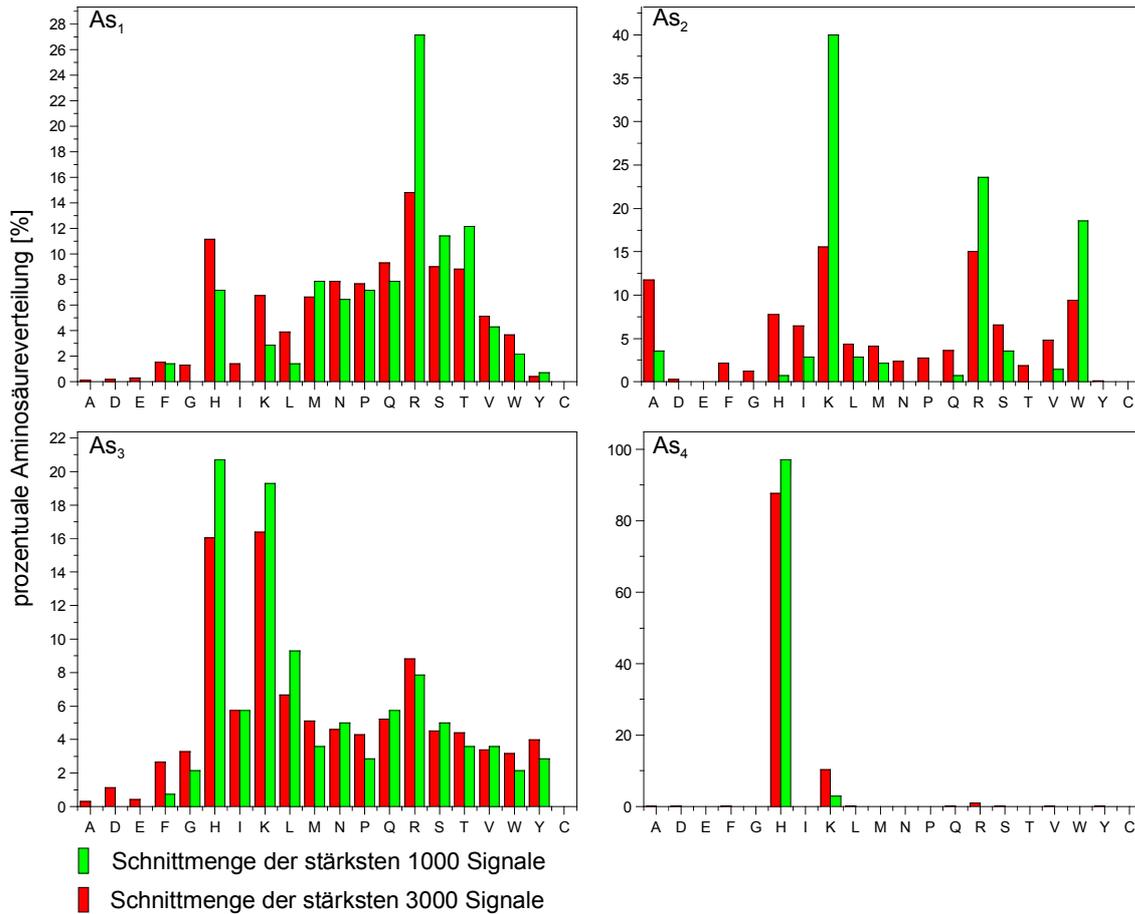


Abb. 61 Prozentuale Aminosäureverteilung in den Hexapeptiden $XAs_1As_2As_3As_4X$, die als stärkste Signale (3000 und 1000) aus der Schnittmenge von zwei Versuchen zur Bildung des $[^{99m}Tc(CO)_3]^+$ -Komplexes identifiziert wurden.

Aminosäurehäufigkeit beobachtet. An der fünften Position – vom N-Terminus aus betrachtet – wurde fast ausschließlich L-Histidin detektiert. In der vierten Position wurde vermehrt L-Histidin und L-Lysin, in der dritten Position L-Lysin, L-Arginin und L-Tryptophan und in der zweiten Position fast ausschließlich L-Arginin. Demnach sollten diese Aminosäurereste primär zur $[^{99m}Tc(CO)_3]^+$ -Komplexierung beitragen. Im Besonderen scheint die Anwesenheit des L-Histidins in der fünften Position essentiell für die Komplexierung zu sein. Bei ~88 % der 978 stärksten Signale und bei ~97 % der 140 stärksten Signale wurde ein Histidinrest in der fünften Position angetroffen.

Tab. 6 Die häufigsten Aminosäuren in der zweiten bis fünften Position des Hexapeptids $XAs_1As_2As_3As_4X$ und die aus ihrer Kombination entstehenden Peptidmotive

Identifizierte As				Resultierende Peptidmotive					
As_1	As_2	As_3	As_4	As_1As_2	As_1As_3	As_1As_4	As_2As_3	As_2As_4	As_3As_4
R	K	H	H	RKXX	RXHx	RXXH	XKHx	XKXH	XXHH
	R	K		RRXX	RXKx		XKKx	XRXH	XXKH
	W			RWXX			XRHx	XWXH	
							XRKx		
							XWHx		
							XWKx		

X = variable Aminosäure

Um nun nicht nur die zur Bindung beitragenden Aminosäurereste sondern auch spezifische Aminosäuresequenzen zu identifizieren, wurden in der Folge nach $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -bindenden Motiven gesucht. Diese Motive wurden dazu aus den am häufigsten angetroffenen Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Position in der Aminosäuresequenz gebildet (Abb. 62). Zur besseren Übersicht sind die am häufigsten angetroffenen Aminosäuren und die aus ihrer Kombination resultierenden Motive in Tabelle 6 aufgelistet. Wiederum wurde innerhalb der stärksten 978 und 140 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -komplexierenden Peptidsequenzen nach diesen Motiven gesucht.

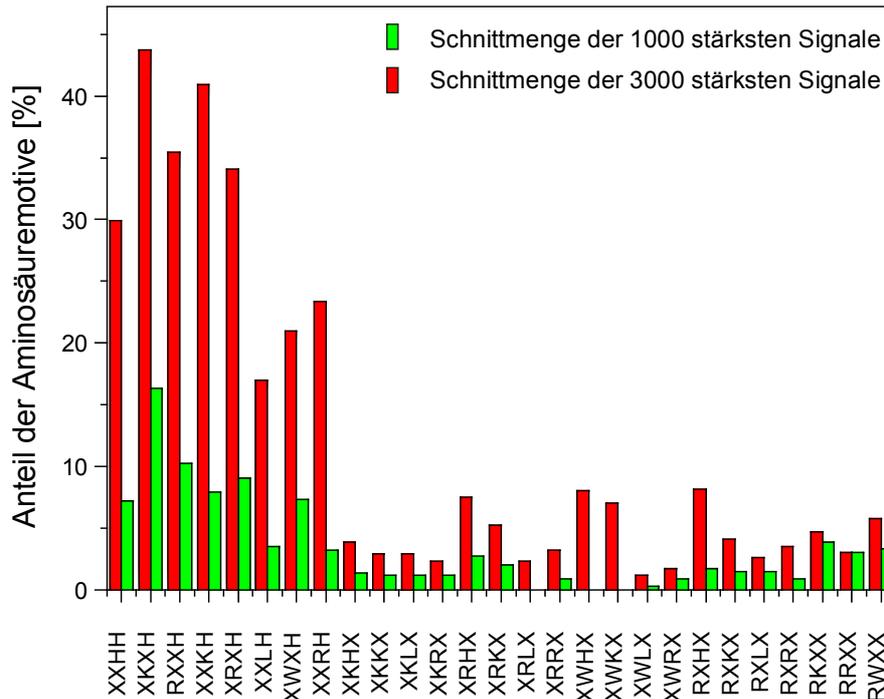


Abb. 62 Prozentualer Anteil von Aminosäuremotiven von der Gesamtzahl des Motives auf dem Array, bei denen zwei Aminosäuren definiert sind und die in der Schnittmenge der 1000 und 3000 stärksten Carbonyl-komplexierenden Peptide identifiziert wurden.

In Abbildung 62 sind die prozentualen Anteile der Zweiermotive in Abhängigkeit von ihrem Auftreten auf dem gesamten Peptidarray dargestellt. Dabei würde ein Anteil von 100 % bedeuten, dass alle Peptidspots auf dem Array mit diesem spezifischen Motiv unter den stärksten 978 und 140 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -komplexierenden Sequenzen vertreten sind. Bei dieser Betrachtung wurden die Motive $\text{XXKH} > \text{XRXXH} > \text{XXRXH} > \text{XXXKH} > \text{XXXHH}$ am häufigsten angetroffen (Abb. 62). Neben den in Tabelle 6 aufgeführten Motiven wurden mehrere hundert weitere Motive untersucht. Es konnten jedoch keine weiteren effektiven $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -bindende Motive identifiziert werden. Einige Beispielmotive sind in Abbildung 62 als Referenzen dargestellt.

In Tabelle 7 sind zudem die prozentualen Anteile der am häufigsten identifizierten Motive für die 978 und 140 stärksten Signalen dargestellt. 40,0 % der 140 stärksten Signale tragen z.B. das Zweiermotiv XXKH . Dieses Motiv tritt auch innerhalb der Menge der 978 stärksten Signale am häufigsten (15,4 %) auf. Neben den Zweiermotiven sind auch die häufigsten identifizierten Dreiermotive in Tabelle 7 aufgelistet. Bei der Betrachtung dieser Dreiermotive ist die Verteilung weniger eindeutig, dennoch

Tab. 7 Doppel- und Dreieraminosäuremotive innerhalb der Sequenz $XAs_1As_2As_3As_4X$ und ihr prozentualer Anteil an den Schnittmengen der 1000 und 3000 stärksten Signale.

Motive				Prozentualer Motivanteil [%]	
As_1	As_2	As_3	As_4	Schnittmenge der 3000 stärksten Signale (978 Signale)	Schnittmenge der 1000 stärksten Signale (140 Signale)
X	K	X	H	15,4	40,0
R	X	X	H	13,1	26,4
X	R	X	H	12,0	22,1
X	X	K	H	14,3	19,3
X	X	H	H	11,0	18,6
R	K	X	H	1,7	10,0
T	K	X	H	1,7	7,9
S	K	X	H	1,6	7,1
R	W	X	H	1,7	7,9
X	R	H	H	1,3	5,7
X	R	K	H	1,3	5,0

X = variable Aminosäure

wurde unter den 140 stärksten Signalen z.B. zu 10 % das Motiv XRKXHX identifiziert. Bei den 978 stärksten Signalen wurde am häufigsten XNKXHX (1,84 %), XRKXHX (1,74 %), XTKXHX (1,74 %) und XRWXHX (1,74%) als Dreiermotiv angetroffen.

2.5.2.4 Detektion von $^{99m}TcO^{3+}$ -bindenden Peptidmotiven

Als Referenz wurde auf einem Hexapeptidarray der gleichen Syntheserie nach $^{99m}TcO^{3+}$ -bindenden Peptidspots gesucht. Ähnliche Versuche wurden bereits von *Malin et al.* (1995) und *Kramer et al.* (1994) durchgeführt, so dass ein Vergleich der erzielten Ergebnisse zu einer Aussage über die Qualität der Versuchsdurchführung und der eingesetzten Peptidarrays ermöglichen sollte.

Für diesen Versuch wurde frisch eluiertes Pertechneat in Gegenwart von $SnCl_2$ und Kaliumgluconsäure in den stabilen $^{99m}TcO^{3+}$ -Komplex überführt. Ein HPLC-Lauf konnte in diesem Fall nicht durchgeführt werden, da der $^{99m}TcO^{3+}$ -Komplex als auch das Pertechneat die gleiche Retentionszeit besitzen. Daher wurde ein Peptidarray mit dem reinen Generator-Eluat (1,2 GBq) und ein weiterer Peptidarray mit ca. 1,2 GBq des $^{99m}TcO^{3+}$ -Komplexes inkubiert. Nach 30 min wurden die Träger mit PBS-Puffer (pH 7,4) und Methanol - in Anlehnung an die Publikationen von *Kramer et al.* (1994) und *Malin et al.* (1995) - gewaschen. Aufgrund der Instabilität des reinen Pertechneats konnten erwartungsgemäß keine Signale auf dem Array mittels Autoradiographie (Expositionszeit: 6 h) detektiert werden. Der mit $^{99m}TcO^{3+}$ -Komplex inkubierte Array lieferte dagegen ein spezifisches Signalmuster. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Umsetzung des Pertechneats in den mittels Gluconsäure stabilisierten $^{99m}TcO^{3+}$ -Komplex erfolgreich verlaufen ist. Eine Aussage über die Ausbeute der Umsetzung, konnte allerdings nicht getroffen werden.

Das resultierende durch Autoradiographie (6 h Expositionszeit) erhaltene Bild der $^{99m}TcO^{3+}$ -Peptidkomplexe, wurde mit dem bereits erwähnten Analyseverfahren ausgewertet. Es konnten 7414 positive Signale identifiziert werden. Demnach sollten sich 8,7 % aller auf dem Array synthetisierten Peptidspots zur Komplexbildung des $^{99m}TcO^{3+}$ eignen. Innerhalb dieser Sequenzen wurde ebenfalls ein hoher Anteil an L-Histidins (~ 18 %) und an L-Lysins (~ 12 %) ermittelt.

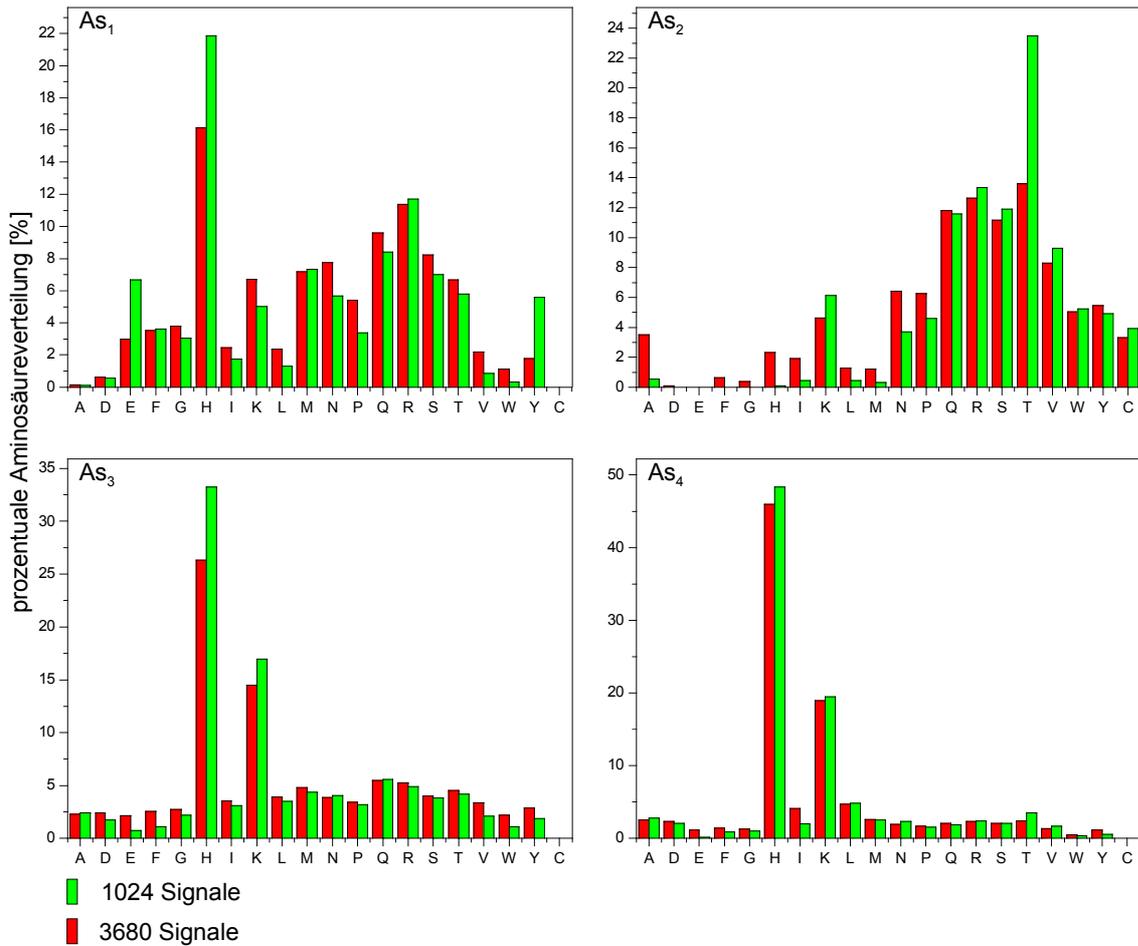


Abb. 63 Prozentuale Aminosäureverteilung in den Hexapeptiden $XAs_1As_2As_3As_4X$, die als 1024 und als 3680 stärkste $^{99m}TcO^{3+}$ -bindende Peptidspots identifiziert wurden.

Um wiederum nur die stabilsten $^{99m}TcO^{3+}$ -Peptid-Komplexe zu identifizieren, wurden in dem folgenden Abschnitt nur die 1024 und 3680 stärksten Signale analysiert. In Abbildung 63 ist die prozentuale Verteilung der Aminosäure in Abhängigkeit von ihrer Position im Hexapeptid dargestellt. In diesem Fall ist die Streuung der Ergebnisse im Zuge der größeren Menge an betrachteten Peptiden und aufgrund der einmaligen Versuchsdurchführung etwas höher. Dennoch konnte in jeder Position eine signifikant häufigere Anwesenheit von einzelnen Aminosäuren detektiert werden. In Position fünf und vier wurden vermehrt *L*-Histidin und *L*-Lysin, an dritter Stelle *L*-Threonin und an zweiter Position *L*-Histidin und *L*-Arginin detektiert.

Um nicht nur die an der Komplexierung beteiligten Aminosäuren, sondern auch definierte

Tab. 8 Die häufigsten Aminosäuren in der zweiten bis fünften Position des Hexapeptids $XAs_1As_2As_3As_4X$ und die aus ihrer Kombination entstehenden Peptidmotive.

Identifizierte As				Resultierende Peptidmotive					
As_1	As_2	As_3	As_4	As_1As_2	As_1As_3	As_1As_4	As_2As_3	As_2As_4	As_3As_4
R	T	H	H	RTXX	RXHX	RXXH	XTHX	XTXH	XXHH
H		K	K	HTXX	RXKX	RXXK	XTKX	XTXK	XXHK
					HXHX	HXXH			XXXX
					HXKX	HXXK			XXXH

X = variable Aminosäure

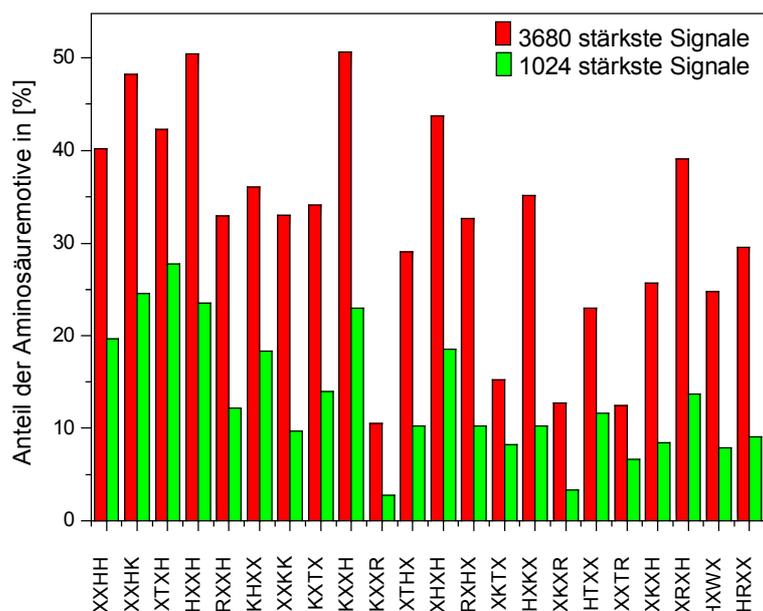


Abb. 64 Prozentualer Anteil von Aminosäuremotiven an der Gesamtzahl des Motives auf dem Array, bei denen zwei Aminosäuren definiert sind und die innerhalb der 3680 und 1024 stärksten $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ -Binder identifiziert wurden.

Peptidsequenzen zu bestimmen, wurden wiederum Zweiermotive aus den häufig angetroffenen Aminosäuren gebildet (Tab. 8) und nach diesen unter den stärksten Signalen gesucht (Abb. 64). Um einen Vergleich mit den Carbonylkomplexen (Abb. 62) herzustellen wurden einige Tryptophan und Arginin-haltige Motive ebenfalls betrachtet. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 62 dargestellt. Innerhalb der 1024 stärksten Signale wurden vermehrt die Motive XTXHXX > XXXHKX > XHXXHX > XKXXHX > XXXHHX identifiziert. Innerhalb der 3680 stärksten Signale wurde am häufigsten die Motive KXXHX > XHXXHX > XXXHKX > XXHXHX > XXTXHX detektiert.

Da dieser Versuch nur einmalig durchgeführt wurde, können die erzielten Ergebnisse nur als Tendenz angesehen werden. Daher wurden die Ergebnisse keiner näheren Betrachtung (z.B. Suche nach Dreiermotiven) unterzogen.

2.6 Metallbindende Peptide - Diskussion

2.6.1 Ni(II)-bindende Peptide

Kramer et al. verwendete die Bildung des Ni(DMG)₂-Komplexes als Nachweis bei der Untersuchung einer Peptidbibliothek gebunden an Zellulose (Kramer et al., 1994). Die dichte Struktur der Zellulose verhindert das diffundieren der Komplexe und unterstützt über intermolekulare Wechselwirkungen die ortsgebundene Adhäsion. Zu diesen Wechselwirkungen sind die eingesetzten PEGMA-Filme nicht in der Lage. Die Bindung des Ni(II)-Ions an das humane ATCUN-Motiv DAH konnte bei einer flächigen Synthese nachgewiesen werden und wurde durch XPS-Spektren belegt. Eine ortsgenaue Detektion von Ni²⁺-Peptidkomplexen war jedoch nicht möglich, da der Ni(DMG)₂-Komplex nicht an den PEGMA-Filmen adherierte. Eine Anpassung der Oberfläche durch die Strukturierung in hydrophobe und hydrophile Bereiche mittels Pentadecafluorooctanoyl-Filmen, perfluorierten Graftpolymerfilme oder Sulfonylfluorid-Filmen war nicht erfolgreich. Entweder riefen die Filme eine zu geringe Hydrophobizität hervor (Sulfonylfluorid-Filme), waren nicht reproduzierbar herstellbar (perfluorierte Graftpolymerfilme) oder nicht mit den Peptidsynthesebedingungen kompatibel (Pentadecofluorooctanoyl-Filme), wenn die festen und geschmolzenen Aminosäurepartikel als Strukturierungsmatrix eingesetzt wurden. Vermutlich führten das Piperidin Abspaltungsprodukt oder ggf. freie Aminosäuren zu einer Modifizierung der Pentadecofluorooctanoyl-Filme, wodurch der hydrophobe Charakter verloren ging. Die Ursache für diese Abschwächung konnte durch XP-Spektroskopie jedoch nicht eindeutig verifiziert werden.

2.6.2 [^{99m}Tc(CO)₃]⁺-bindende Peptide

Mit Hilfe des Peptidlaserdruckers und den festen Aminosäurepartikeln konnte ein Array mit 133.224 Peptidspots (400 Spots/cm²) synthetisiert werden, wobei jeder Spot aus einem Gemisch aus 361 Hexapeptiden bestand (NH₂-XAs₁As₂As₃As₄X-Träger). Insgesamt wurden damit mehr als 48 Millionen Peptidvarianten auf dem Array präsentiert. Auf diesen Peptidarrays wurden Motive gesucht, die potentiell ^{99m}Techneiumoxo- oder ^{99m}Techneiumcarbonylkomplexe stabil binden.

Allgemein konnte eine Präferenz sowohl des [^{99m}Tc(CO)₃]⁺ als auch des ^{99m}TcO³⁺-Komplexes für *L*-Histidin, *L*-Lysin und *L*-Arginin reiche Sequenzen festgestellt werden. Zudem konnte für [^{99m}Tc(CO)₃]⁺ vermehrt Komplexierungen durch Peptide detektiert werden, die Tryptophanreste enthielten. Dagegen traten *L*-Threoninreste nur in ^{99m}TcO³⁺-komplexierenden Peptiden auf. Während bei der Betrachtung der einzelnen Aminosäuren nur geringe Unterschiede bezüglich der Koordination der verschiedenen Technetiumspezies gefunden wurden, ergaben sich klare Präferenzen, wenn die Aminosäuren auf ihre Position im Hexapeptid bezogen (Abb. 61; Abb. 63) bzw. Motive aus zwei Aminosäuren analysiert wurden (Abb. 62; Abb. 64). Als stärkste [^{99m}Tc(CO)₃]⁺-Chelatoren aus zwei Aminosäuren wurden die Sequenzen *XXKXHX* > *XRXXHX* > *XRXHX* > *XXXKHX* > *XXXHHX* und als ^{99m}TcO³⁺-Chelatoren *XTXHXX* > *XXXHKX* > *XHXXHX* > *XKXXHX* > *XXXHHX* ermittelt.

Die Häufigkeit mit der Histidin an der Komplexierung beteiligt war, kann auf die guten Komplexbildungseigenschaften des *L*-Histidins zurückgeführt werden (Kaim & Schwederski, 1995)

und stimmt mit Literaturangaben für beide Technetiumspezies überein (Schibli & Schubiger, 2002; Alberto et al., 1999; Kramer et al., 1994; Malin et al., 1995).

Das vermehrte Auftreten des *L*-Lysins wurde für TcO^{3+} -Bindungsmotiven von *Malin et al.* (1995) beschrieben. Er durchsuchte eine Peptidbibliothek nach TcO^{3+} -bindenden Sequenzen und identifizierte neben Histidin und Lysin auch Arginin als Ligand (Malin et al., 1995). Diese Beobachtung konnte nur für Histidin und Lysin anhand der identifizierten Sequenzen bestätigt werden. Wenn allerdings *L*-Arginin ein guter Binder für TcO^{3+} ist, muss nach dem HSAB-Konzept (Hart and soft acids and bases“; Johnson et al., 2001) sogar von einer noch bessere Wechselwirkung des weichen Arginin mit dem „weicheren“ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ -Carbonylkomplex ausgegangen werden. Dies würde das vermehrte Auftreten des Arginins unter den $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Chelatoren erklären. Dessen Abwesenheit unter den stärksten TcO^{3+} -bindenden Motiven. könnte auf eine geringe Kopplungsausbeute bei der Synthese hinweisen.

Gemäß der Theorie zur Koordinationsfähigkeit von Aminosäuren sollten die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin nur bedingt zur Koordination über ihre Stickstoffgruppen befähigt sein, wenn diese im protonierten Zustand vorliegen (Kaim & Schwederski, 1995). Im deprotonierten Zustand würden sie jedoch starke Liganden darstellen. Allerdings wurde die Komplexbildungsreaktion bei einem annähernd neutralen pH-Wert (pH 7,7) durchgeführt. Die pK_s -Werte der Seitenketten betragen 10,53 (Lysin) und 12,1 (Arginin) und sollten demnach mehrheitlich protoniert sein, falls sie nicht unmittelbar zur Komplexbildung beitragen. Folglich kann eine Deprotonierung der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin bei einem pH-Wert von 7,7 als Ursache für ihre guten Komplexbildungseigenschaften ausgeschlossen werden.

Entgegen der theoretischen Vorhersagen und den Beobachtungen von *Malin et al.* (1995) war *L*-Methionin an der Koordination des TcO^{3+} kaum beteiligt. Ursache könnte auch hier eine geringe Ausbeute bei der Kopplung dieser Aminosäure während der Arraysynthese sein. Da die Synthesequalität nur halbquantitativ durch die reversible Anfärbung mit Bromphenolblau überprüft wurde, kann diese Annahme nicht ausgeschlossen werden, hätte jedoch bei der Kontrolle des Färbungsmusters auffallen müssen. Unterschiedliche Kopplungsausbeuten könnten auch insgesamt zu Fehlinterpretationen geführt haben. In den folgenden Versuchen sollte diese Problematik zum Teil durch Aufbringen von Referenzspots (z.B. HHHHHH) untersucht werden.

Auch die Anwesenheit eines Threoninrestes im stärksten $^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ -Bindungsmotive XXTXHXX stimmt nur bedingt mit der Theorie und den Literaturangaben (Kramer et al., 1994; Malin et al., 1994) überein. Die Hydroxygruppe in der Seitenkette des Threonins sollte nur zu einer schwachen Koordination fähig sein (Kaim & Schwederski, 1995). Allerdings bindet das $^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$, z.B. in dem zur Darstellung der Niere verwendeten Glucoscan (Technescan), ebenfalls über einfache Hydroxygruppen an Glucoheptonate (Dilworth & Parrott, 1998). Folglich kann die Komplexbildung über den Hydroxyrest des Threonins in Verbindung mit der Koordination über den Histidinrest durchaus erklärt werden.

Insgesamt konnten beim Vergleich der $^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ -koordinieren Aminosäuren innerhalb der identifizierten Bindungsmotive mit den publizierten Daten von *Malin et al.* (1995) einige Übereinstimmungen gefunden werden. Allerdings beruhen die gewonnenen Daten nur auf einer einmaligen Versuchsdurchführung, so dass nur tendenziell eine Aussage getroffen werden kann. Zudem liegt am *N*-Terminus und am *C*-Terminus der betrachteten Hexapeptide ein Gemisch aus 19

Aminosäuren vor, so dass es sich bei den identifizierten Bindungsmotiven nur um vorläufige Ergebnisse handelt. Der Einfluss einer spezifischen Aminosäure an diesen Positionen kann noch nicht

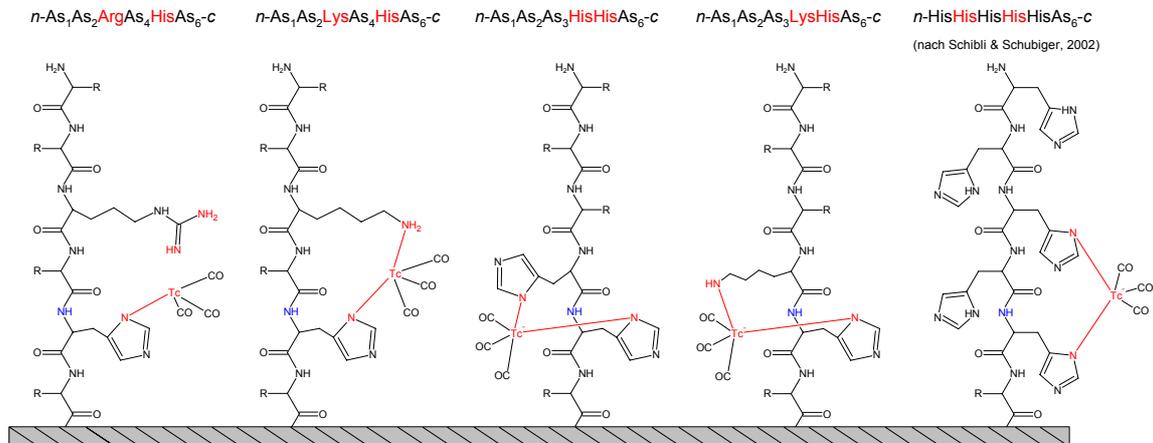


Abb. 65 Potentielle Bindungsstellen (rot) des $^{99m}\text{TcCO}_3^+$ -Komplexes am die identifizierten Bindungsmotive aus zwei Aminosäuren. Da die Koordination des $^{99m}\text{TcCO}_3^+$ -Komplexes sowohl über eine als auch beide Stickstoffatome des Argininrestes erfolgen könnte, wurde in diesem Fall keine Bindung (roter Strich) dargestellt.

beurteilt werden. Gleiches gilt auch für die identifizierten $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ -Bindungsmotiven.

Anhand der erzielten Daten kann jedoch von einer essentiellen Bedeutung des Histidins für die Bildung von stabilen $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ -Komplexen ausgegangen werden. Diese Annahme ist konform mit Literaturangaben, auch wenn nach spezifischen Peptidliganden für diese ^{99m}Tc -Spezies bis dato noch nie im Arrayformat gesucht wurde. Allerdings wurde z.B. der His-tag (bestehend aus drei bis fünf Histidinresten) als potentieller Chelator getestet. Dieser wird inzwischen standardmäßig eingesetzt, um kleinere Antikörper N-terminal oder C-terminal mit dem $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ -Komplex zu markieren (Schibli und Schubiger, 2002). Dabei wird z.B. für einen His-tag bestehend aus fünf Histidinresten von der Bildung eines Chelatkomplexes über die aromatischen Seitengruppen des zweiten und vierten Histidins (Abb. 65) in der Peptidsequenz ausgegangen (Schibli und Schubiger, 2002).

Eventuell könnte dieses Bindungsprinzip auch auf die Zweiermotive, die als $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ -Peptid-Komplexe identifiziert wurden, übertragen werden. In Abbildung 65 sind einige dieser Bindungsmotive und ihre funktionellen Gruppen zur Bildung eines zweizähligen Chelators dargestellt. Berücksichtigt man die eigentlich nur zur schwachen Koordination befähigte Carbamid-Bindung (Abb. 65, blau), würden bei der $^{99m}\text{TcCO}_3^+$ -Komplexierung des XXXHHX-Doppelmotivs sechser Ringe und ein siebener Ring entstehen. Dies ist sterisch recht günstig und würde in einem noch stabileren dreizähligen Chelator resultieren. Gleiches gilt für das XXXKHX-Motiv. Wenn die Carbamid-Bindung einbezogen wird, würde $^{99m}\text{TcCO}_3^+$ über einen Sechsringer mit dem aromatischen Histidinrest und über einen Neunring mit der Aminogruppe des Lysinrestes einen dreizähligen Komplex ausbilden. Anders sieht es jedoch aus, wenn der Abstand zwischen den komplexierenden Aminosäuren größer wird. Für das XXRCHX- und das XXKXHX-Motiv würden sich sterisch ungünstige Ringgrößen von 13ern und 12er Ringen ergeben. In diesen Fällen muss eher von einer bidentaten Koordination ausgegangen werden oder nur von einer einfachen Anbindung an die aromatische Histidinseitenkette, die durch die basischen Aminosäuren und die Stickstoffhaltigen Seitenkettengruppen der basischen Aminosäuren unterstützt wird (Abb. 65). Dies sind jedoch nur sehr vereinfachte und spekulative

Betrachtungen der Koordination. Eine Analyse der Koordinationsstruktur war bis dato noch nicht möglich. Zudem könnten auch zwei oder mehrere Peptide innerhalb eines Spots an der Koordination beteiligt sein, was in weiterführenden Versuchen (z.B. HPLC-Analyse) ausgeschlossen werden muss. Gleiches gilt für die potentielle Beteiligung von acetylierten Syntheseartefakten. Dazu müssen jedoch – wie bereits erwähnt - die Sequenzen der Hexapeptide vollständig entschlüsselt werden, so dass der Einfluss der Aminosäure in der ersten und sechsten Position (Gemisch aus 19 Aa) an der Komplexbildung abgeschätzt werden kann. Besonders die Bestimmung der *N*-terminalen Aminosäure könnte eine entscheidende Rolle spielen, da bereits kurze diagnostische Peptide über einen *N*-terminalen Histidinrest (bidentate Chelatoren) oder *N*-terminale acetylierte Histidinreste (tridentate Chelatoren) mit dem [^{99m}TcCO₃]⁺-Komplex markiert und getestet wurden (Schibli und Schubiger, 2002).

2.7 Peptidsynthese auf Mikrochips - Ergebnisse

In dem folgenden Kapiteln wurde geprüft, ob eine Peptidsynthese auf Mikrochips mit Hilfe der festen Aminosäurepartikel realisiert werden kann. Dazu wurde in einem ersten Schritt eine immunologische Modellanwendung getestet, die einen einfachen Nachweis der synthetisierten Peptide erlaubt. In einem zweiten Schritt wurde eine Peptidsynthese auf verschiedenen Mikrochips durchgeführt.

2.7.1 Immunologische Modellanwendung

Antikörper binden an bestimmte kurze Peptide (ca. 10-15 Aminosäuren) mit hoher Spezifität und Affinität. Dabei kann die Antikörperbindung vergleichsweise einfach durch die Verwendung von z.B. fluoreszenz- oder HRP-markierten Antikörpern nachgewiesen werden (Beyer, 2005; Stadler 2008a). Um nun einen Einfluss der Partikel-gestützten Synthese z.B. durch abgelagerte Si-Nanopartikel oder Syntheseartefakte auszuschließen, wurde dieser immunologische Nachweis in einem Vorversuch getestet. Mittels des Laserdruckers wurden die gut charakterisierten Epitope DYKDDDDK (FLAG-Epitop) und YPYDVPDYA (HA-Epitop) (Slootstra et al., 1997; Kolodziej & Young; 1991) in einem einfachen schachbrettartigen Muster (Spotgröße: 1 x 1 mm²) auf PEGMA- β Ala₃-Trägern synthetisiert. Der resultierende Array wurde mit Hilfe eines Flexiperm-Halters in drei Reaktionsräume (Abb. 66, Feld A-C) unterteilt und mit anti-FLAG- und anti-Ha-Antikörpern (*Sigma*, Steinheim) aus der Maus oder dem Kaninchen in TBST-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die unterschiedlichen Antikörper durch die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (*anti-Maus-AK-AlexaFluor*[®] 546 und

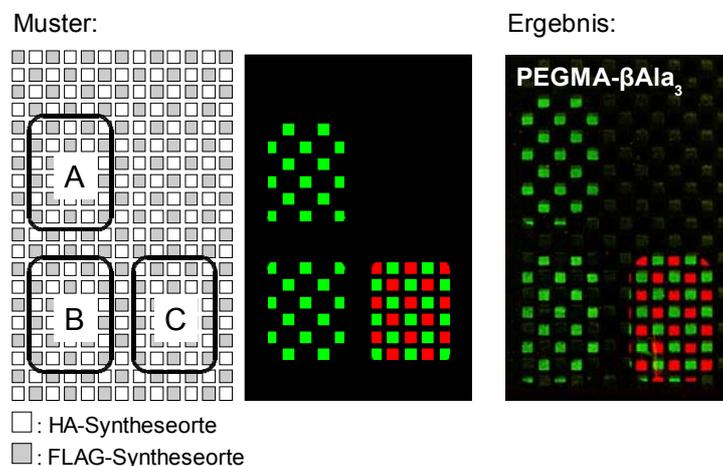


Abb.66 Nachweis der Epitope Ha und FLAG mit den spezifischen Erstantikörpern A) Maus-anti-FLAG-Antikörper (*Sigma*, Steinheim); B) Maus-anti-HA-Antikörper (*Sigma*, Steinheim); C) Maus-anti-FLAG-Antikörper (*Sigma*, Steinheim), Kaninchen-anti-HA-Antikörper und den Fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern *anti-Maus-AK-AlexaFluor*[®] 546 und *anti-Kaninchen-AK-AlexaFluor*[®] 647.

anti-Kaninchen-AK-AlexaFluor[®] 647) nachgewiesen. Diese Nachweismethode war sehr effektiv und ein spezifisches Fluoreszenzmuster konnte mittels eines *GenePix*[®] 4000B (Axon Instruments bzw. Molecular Devices, USA) Fluoreszenzscanner detektiert werden (Abb. 66). Da der Fluoreszenzscanner die Detektion von Fluoreszenzsignalen im Mikrometermaßstab (Größe der Pixelelektroden 30-100 μ m²) erlaubt, wurde diese Modellanwendung für die nachfolgenden Versuche zur Realisierung des Chip-Konzeptes genutzt.

2.7.2 Peptidsynthese auf Mikrochips

Die ersten Mikrochips wurden in Kooperation mit der Gruppe *Technischen Informatik am Kirchhoff-Institut für Physik* in Heidelberg konzipiert und an der TU Dresden angefertigt. Nachdem die Qualität der Chips durch einige elektronische Vortests überprüft worden waren, wurden die Oberflächen dieser Platinenchips (TU Dresden) mit einem Rastermass der Elektroden von 100 μm (10 000 Pixelelektroden/ cm^2) chemisch modifiziert (Abb. 67, A). Sie wurden mit PEGMA-Filmen versehen und anschließend mit der 11-(Fmoc-Amino)undecansäure funktionalisiert (PEGMA-Aun). Zur Peptidsynthese wurde das erste Partikelkollektiv (Lysin) in einem schachbrettartigen Muster aus dem Aerosol auf den Pixelelektroden abgeschieden und ca. 2 min auf 90°C erhitzt, um die Partikel zu fixieren. Anschließend wurde das zweite Partikelkollektiv (Alanin) auf den Chips adressiert und die Kopplungsreaktion durch Schmelzen der Partikel bei 100°C über 90 min unter Schutzgas durchgeführt. Die Partikelabscheidung wurde durch Dipl. Phys. K. König oder PD Dr. A. Nesterov vorgenommen. Nach der Kopplung und dem Abkühlen der Chips wurden Teflonabdeckungen auf der Platine befestigt und diese in eine spezielle Waschkammer montiert. Dabei blieb die Chipoberfläche frei und war damit der Flüssigphasenchemie zugänglich, während die Platine und die Anschlüsse der Elektroden (Bonddrähte) geschützt wurden. Derart geschützt wurden die Chips gewaschen und gemäß der Fmoc-Peptidsynthese prozessiert. Durch das repetitive Adressieren der Partikel, Koppeln der Aminosäuren, Waschen der Chips und Abspalten der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurden die angestrebten Peptide auf den Pixelelektroden kombinatorisch synthetisiert. In einem letzten Schritt wurden die Seitenschutzgruppen mittels TFA abgespalten und der Träger mit der Base DIPEA gewaschen, um Säurereste aus der Polymerschicht zu entfernen.

Für den Nachweis der Epitope DYKDDDDK (FLAG[®]-Epitop) und YPYDVPDYA (HA-Epitop) wurden die Chip von der Platine abgelöst und in TBS-Puffer (350 mM NaCl, pH 7.4) vorgequollen. Anschließend wurde ein Gemisch der spezifischen Antikörpern Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma, Steinheim) und Kaninchen-anti-HA-Antikörper (Sigma, Steinheim) in einer 1:1000 Verdünnung in TBST-Puffer (350 mM NaCl, 1% TWEEN[®], pH 7,4) auf den Chips aufgebracht. Nach 1 h Inkubationszeit wurde der Chip gewaschen und mit einem Gemisch aus fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörpern (anti-Maus-AK-AlexaFluor[®] 546 und anti-Kaninchen-AK-AlexaFluor[®] 647) in einer

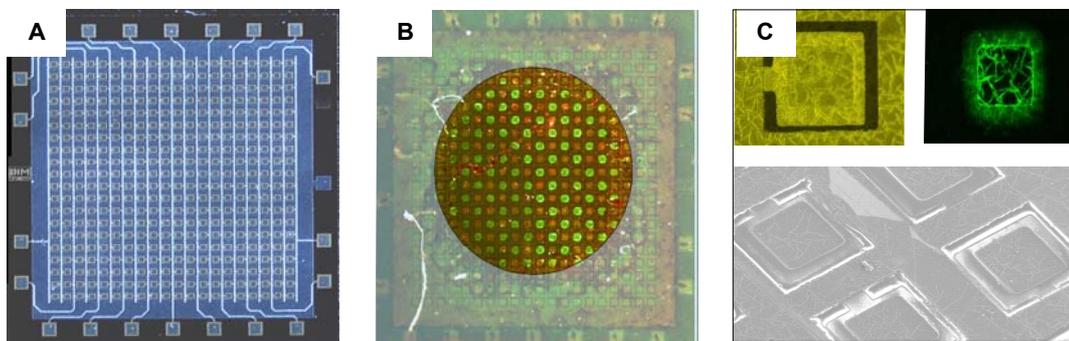


Abb. 67 (A) verwendeter unmodifizierter Testchip (Rastermass 100 μm ; 10 000 Pixelelektroden/ cm^2); (B) Nachweis der Epitope FLAG und HA im schachbrettartigen Muster durch korrespondierende Antikörper und fluoreszenzmarkierte Zweitantikörpern; (C) lichtmikroskopische (oben links), fluoreszenzmikroskopische (oben rechts) und elektronenmikroskopische Aufnahme (unten) zur Darstellung Schäden in der Polymerstruktur.

1:1000 Verdünnung in TBS-Puffer für 1 h geschüttelt. Nach dem wiederholten Waschen des Chips und dem Trocknen im Luftstrom wurden die Chips auf einem speziellen Halter in Objektträgergröße gespannt und die Fluoreszenzsignale in einem *GenePix*[®] 4000B (Axon Instruments bzw. Molecular Devices, USA) Fluoreszenzscanner detektiert. In Abbildung 67 ist der Originalchip im nicht modifizierten Zustand (A) und das Resultat der Fluoreszenzfärbung nach der Peptidsynthese dargestellt (B). Deutlich können die synthetisierten Epitope anhand der spezifischen roten und grünen Fluoreszenzsignale im schachbrettartigen Muster erkannt werden. Die schützende Teflonabdeckung begrenzt die Synthesefläche auf den dargestellten Ausschnitt. Allerdings wurden die PEGMA-Filme durch die TFA stark angegriffen. In Abbildung 67 (C) sind die Schäden anhand der Mikroskopiebilder zu erkennen.

Nachdem dieses Ergebnis mehrfach reproduziert werden konnte, wurde in den nächsten Versuchen ein neuer Synthesechip vom *IMS Stuttgart* mit einem Elektrodenrastermaß von 50 µm und 100 µm und großflächiger Si₃N₄-Passivierung verwendet. Mit Hilfe dieser Chip sollte getestet werden, ob die verwendete Passivierung eventuell die PEGMA-Filme stabilisiert und ob die Peptidspotdichte auf 40.000 Peptidspots/cm² erhöht werden kann. Auf diesem Chip wurden nach der oben beschriebenen Methode ebenfalls das FLAG[®]- und das HA-Epitop in einem schachbrettartigem Muster synthetisiert und mittels fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper nachgewiesen (Abb. 68). Wiederum konnte die spezifische Anfärbung der Epitope anhand der roten und grünen Fluoreszenzsignale detektiert werden. Dabei wurden Peptiddichten von 40 000 Peptidspots pro cm² erzielt. Damit übertrifft diese Technik zur Synthese von Peptidarrays die Peptiddichten der standardisierten Methoden (SPOT-Synthese) um den Faktor 1600 (Beyer et. al., 2007).

Auf diesem neuen Chips wurde der PEGMA-Film durch die Abspaltung der Seitenschutzgruppen der Aminosäuren durch TFA nicht angegriffen (Elektronenmikroskopaufnahme, Abb. 68). Dies ist jedoch nicht nur auf die Passivierung der Chips, sondern auch auf einige Verbesserungen bei der Synthese der PEGMA-Filme zurückzuführen z.B. die schonende Reinigung der Chips durch UV-Bestrahlung und die Verwendung des ATRP-Verfahrens zur Filmsynthese.

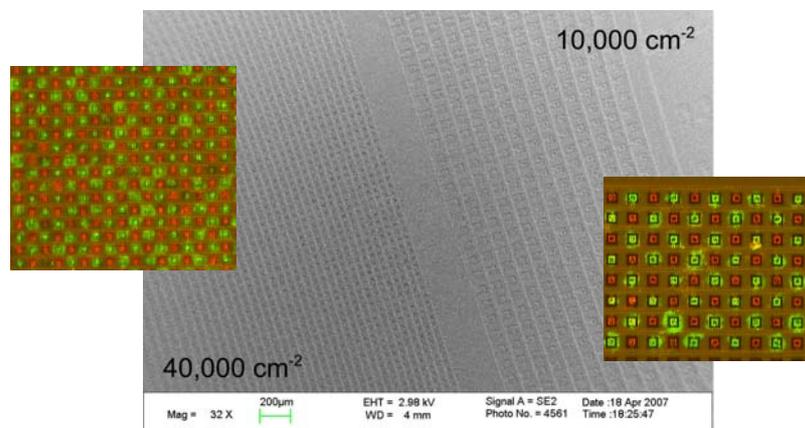


Abb. 68 Aufnahme mit dem Elektronenmikroskop der polymeren Struktur der Chipoberfläche; Nachweis der Epitope FLAG und HA im schachbrettartigen Muster durch korrespondierende Antikörper und fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper in einer Auflösung von 10.000 und 40.000 Peptidspots/cm².

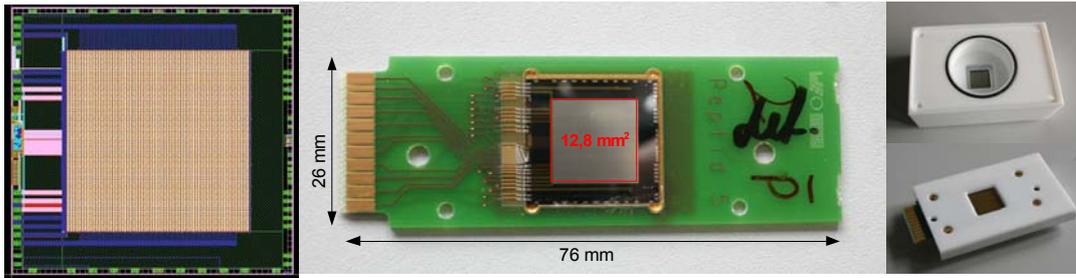


Abb. 69 (links) CMOS-Chip-Design und in der Aufsicht mit Platine in Objektträgergröße (Mitte); (rechts) CMOS-Chip geschützt durch passgenaue Teflonabdeckung und eingespannt in der passgenauen Waschkammer.

In der Folge wurde ein CMOS-Chip in Kooperation am *Kirchhoff-Institut für Physik* (Heidelberg/Deutschland) entwickelt und durch das *Europrattice Konsortium* (bzw. *ON Semiconductors*[®]) angefertigt. Auf diesem Chip können nicht nur einfache Schachbrettmuster erzeugt werden, sondern jede Pixelelektrode einzeln angesteuert werden. Diese variable Ansteuerung wird benötigt, wenn auf dem Chip eine Peptidbibliothek kombinatorisch synthetisiert werden soll. Dieser CMOS-Chip hat eine Größe von 19 x 19,8 mm². die Synthesefläche beträgt 12,8 x 12,8 mm². bei einem Rastermaß von 100 µm können auf diesem CMOS-Chip 16.348 Peptide simultan synthetisiert werden. Die einzelnen Pixelelektroden haben eine Metallfläche von 84 x 84 µm². Davon sind die zentralen 76 x 76 µm² freiliegendes Aluminium, während der Rand der Elektroden von einer Passivierung aus Siliziumnitrit (Dicke ca. 1µm) bedeckt ist. Die zugehörigen Platinen haben die Maße 76 x 26 x 1,2 mm³ und sind damit vergleichbar mit kommerziell erhältlichen Objektträgern (Abb. 69). Dies hat den großen Vorteil, dass die Chips nach Abschluss der Synthese nicht von der Platine gelöst und in einen Halter eingespannt werden müssen, sondern direkt zur Auslese in einen Standard-Fluoreszenzscanner eingelegt werden können. Zur Synthese wurden auch hier zum Schutz der

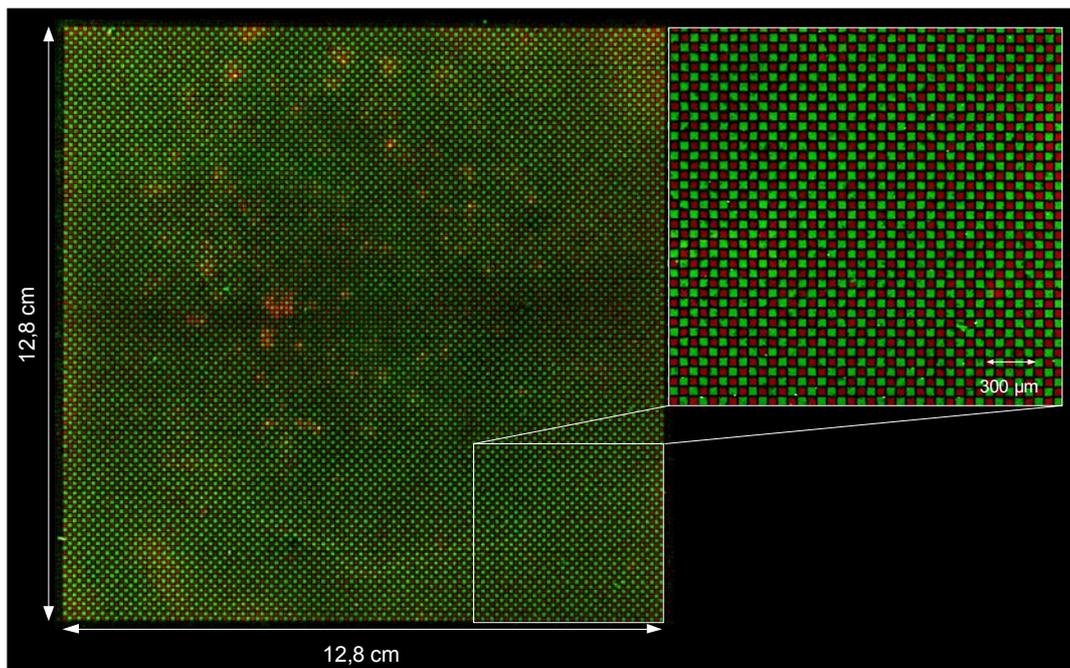


Abb. 70 Nachweis der Epitope *FLAG* und *HA* im schachbrettartigen Muster durch korrespondierende Antikörper und fluoreszenzmarkierte Zweitantikörpern.

elektronischen Anschlüsse eine passgenaue Abdeckung und eine Waschkammer aus Teflon hergestellt (Abb. 69, rechts). In einem ersten Vorversuch wurde die Funktionalität des Chips anhand der bewährten Synthese der Epitope FLAG und HA im schachbrettartigen Muster getestet. Dazu wurden die Chipoberflächen silanisiert und mit einem Copolymer-Film überzogen, da reine PEGMA-Filme zu Kurzschlüssen in der Elektronik führten. Die genauen Ursachen werden derzeit untersucht. Der Copolymer-Film bestand zu 20 % aus PEGMA und zu 80 % aus MMA (Methylmethacrylat) (Stadler et al., 2008b). Wiederum wurden im Schachbrettmuster das Flag- und das HA-Epitop synthetisiert, wobei der Kopplungszyklus zweimal durchgeführt wurde, um die Synthesequalität zu erhöhen. Die Peptide wurden mit korrespondierenden Antikörpern nachgewiesen (Abb. 70). Dazu wurde ein Gemisch der spezifischen Antikörpern Maus-anti-HA-Antikörper (Sigma, Steinheim) und Kaninchen-anti-Flag-Antikörper (Sigma, Steinheim) in einer 1:500 Verdünnung in TBST-Puffer (350 mM NaCl, 1% TWEEN[®], pH 7,4) auf den Chips aufgebracht. Nach 1 h Inkubationszeit wurde der Chip gewaschen und mit einem Gemisch aus fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (**anti-Maus-AK-AlexaFluor[®] 546** und **anti-Kaninchen-AK-AlexaFluor[®] 647**) in einer 1:1000 Verdünnung in TBS-Puffer für 1 h geschüttelt. Der Chips wurde gewaschen, die Platine inklusive Chip getrocknet und die Fluoreszenzsignale im *GenePix[®] 4000B* Scanner detektiert. Im Vergleich zu den bisher erzielten Ergebnissen waren die detektierten Fluoreszenzmuster wesentlich homogener und über die gesamte Chipoberfläche konnten die Signale detektiert werden. Dies ist zum einen auf den doppelten Kopplungszyklus und die dadurch verbesserte Synthesequalität und zum anderen auf das verwendete Copolymer zurückzuführen. Die PEGMA/MMA-Filme scheinen die Zugänglichkeit der Peptide für Antikörper zu erhöhen, wodurch eine starke Immunfärbung möglich ist. Diese Annahme muss jedoch noch in weiteren Experimenten belegt werden. Zusätzlich verhindert ein verbessertes Chipdesign das Verlaufen der Partikelschmelze über den Rand der einzelnen Pixelelektroden hinaus, wie es noch bei den Platinenchips (Abb. 67 und Abb. 68) beobachtet wurde.

2.8. Peptidsynthese mit dem Mikrochip – Diskussion

Die prinzipielle Durchführbarkeit der Peptidsynthese auf einfachen Platinenchips und CMOS-Mikrochips konnte belegt werden. Dabei wurden Dichten von bis zu 40.000 Peptidspots pro cm² auf einfachen Testchips erreicht, die den Stand der Technik (SPOT-Synthese) um ein 1600faches übertreffen. Bisher wurden zwei Epitope im Schachbrett-Muster manuell synthetisiert und nur fünf verschiedene Partikelsorten der Aminosäuren Alanin, Asparagin, Tyrosin, Prolin und Lysin eingesetzt. Für die Synthese von komplexen Peptidbibliotheken soll in Zukunft die Ablagerung der restlichen 15 Aminosäurepartikelsorten getestet und optimiert werden. Ferner wird ein höherer Automatisierungsgrad bei der Partikeladressierung und der Nasschemie angestrebt, um die Effektivität des Verfahrens zu erhöhen. Entsprechende Syntheseautomaten werden derzeit im Rahmen anderer Projekte in Zusammenarbeit mit dem *Kirchhoff-Institut für Physik* und der *TU Darmstadt* entwickelt. Ziel ist es, über den Nachweis gut charakterisierter Epitope hinaus die Peptidarrays allgemein zum Nachweis von Protein-Peptid-Wechselwirkungen einzusetzen. Denkbare Anwendungen wären z.B. der Nachweis von diagnostisch relevanten Antikörpern in Patientenseren und das Aufspüren therapeutisch einsetzbarer Peptide, mit denen durch Bindung an bestimmte Zielproteine Krankheiten geheilt werden können. Hierzu sollte das Verfahren es ermöglichen, dass im Unterschied zu den bislang getesteten hoch affin bindenden Antikörpern auch niedrig affine Wechselwirkungen auf den Peptidarrays ausgelesen werden können.

Die Synthesequalität der Peptidarrays konnte durch ein verbessertes Design, die Verwendung der PEGMA/MMA-Filme und den zweifach durchgeführten Kopplungsprozess erheblich verbessert werden. Allerdings würde diese Wiederholung der Kopplung bei der Synthese einer komplexen Peptidbibliothek aus allen 20 proteinogenen Aminosäuren einen erheblichen Mehraufwand bedeuten und sollte möglichst umgangen werden.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es mittels des Peptidlaserdrukers erste Arrays zu synthetisieren, zu charakterisieren und in verschiedenen Modellanwendungen zu testen. Für diese Aufgabenstellung wurde zunächst ein Syntheseprotokoll (Waschprotokoll; doppelter Kopplungszyklus) etabliert, welches speziell an die Peptidsynthese mit Hilfe von festen Aminosäurepartikeln angepasst war. Die erfolgreiche Synthese von Peptiden mittels des Laserdruckers wurde anhand von zwei Beispielpeptiden massenspektrometrisch belegt.

In der Folge konnte ein komplexer Peptidarray mit 22.791 Dekapeptiden zur Identifizierung von spezifischen Substraten der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) eingesetzt werden. In Übereinstimmung mit Literaturangaben (Kemp & Pearson, 1990; Kenelly & Krebs, 1991) wurden primär Serinreste phosphoryliert, wenn diese in der Erkennungssequenz RRXS (X = variable Aminosäure) vorlagen. Dabei wurde die Phosphorylierung durch Verwendung von radioaktivem [γ - 32 P]ATP oder [γ - 33 P]ATP³³ und anschließender Autoradiographie detektiert. Der Einsatz von alternativen Detektionsmethoden führte nicht zum Erfolg. Neben der PKA wurden weitere Modellkinasen (CKII, c-Src, Abl) getestet. Diese schienen bei Kontrollversuchen nur im geringen Maße die oberflächengebundenen Peptide zu phosphorylieren, weshalb nur geringe Signalstärken detektiert werden konnten. Diese geringe Phosphorylierungseffizienz könnte auf einer schlechten Zugänglichkeit der synthetisierten Peptide für die im Vergleich zur PKA größeren Kinasen beruhen. Mögliche Ursache könnten störende Syntheseartefakte (acetylierte Abbruchsequenzen) oder der Einsatz von funktionalisierten PEGMA-Filmen sein, die resistent gegenüber der unspezifischen Anlagerung von Proteinen sind. Diese Faktoren könnten eine Phosphorylierung der Substrate beeinträchtigen bzw. das Andocken der Peptide an die katalytischen Domänen der Enzyme sterisch verhindern. In zukünftigen Anwendungen sollen daher PEGMA/MMA-Mischpolymerfilme eingesetzt werden (Stadler et al, 2008b), die in ersten Vorversuchen sowohl bei Antikörperbindungstudien, als auch bei Phosphorylierungsexperimenten höhere Signalintensitäten als reine PEGMA-Filme lieferten. Zudem wird derzeit ein *in situ* Reinigungsverfahren entwickelt, um verbleibende Syntheseartefakte nach der Herstellung des Arrays zu entfernen. Hierbei sollen vollständig synthetisierte Peptide N-terminal mit einer Ankergruppe (z.B. Biotin) versehen und von der Trägermatrix abgespalten werden. Die freien Peptide sollen entweder lokal verankert (z.B. über Streptavidin) und ggf. auf einen separaten Träger übertragen werden (Schirwitz, 2008). Acetylierte Syntheseartefakte werden von dieser neuen Bindung ausgeschlossen. Zudem können bei diesem Reinigungsschritt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip unterschiedliche Syntheseausbeuten pro Peptidspot ausgeglichen werden, wenn eine definierte Menge an „Schlossgruppen“ nach der Abspaltung der Peptide zur Bindung Verfügung steht.

Auch wenn für eine breite Anwendung der Peptidarrays in der Kinaseforschung noch Optimierungsbedarf besteht, zeigen die erzielten Ergebnisse eine grundsätzliche Realisierbarkeit dieser Anwendung. Zukünftig sollen die neuartig synthetisierten Peptidarrays nicht nur zur Identifizierung der Substratspezifität von weniger gut charakterisierten Proteinkinasen (z.B. HIPK2) genutzt, sondern auch in weiteren enzymatischen Assays zur Charakterisierung von z.B. Proteasen oder Phosphatasen verwendet werden. Da derzeit ebenfalls Aminosäurepartikel für die D-

Aminosäuren entwickelt werden, könnten die Arrays auch zur Entwicklung von spezifischen peptidischen Kinaseinhibitoren verwendet werden, die im Körper gegenüber Proteasen stabil sind.

In einer weiteren Anwendung sollten Arrays hergestellt werden, die die Entwicklung von metallbindenden Peptiden und Peptidderivaten als Katalysatoren in biotechnologischen Anwendungen erlauben. Eine Etablierung eines Modellsystems zur hydrolytischen Spaltung von Phosphorsäureestern bzw. Phosphorsäurediestern in Anlehnung an Publikationen von *Berkessel et al.* (Berkessel, 2003; Berkessel & Riedl, 2000; Berkessel & Héault, 1999) scheiterte, da die durch die Spaltung entstehenden gefärbten Reaktionsprodukte nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten. Die eingesetzten zweidimensionalen PEGMA-Filme scheinen im Gegensatz zu den von *Berkessel et al.* eingesetzten Polymerbeads für diese Anwendung nicht geeignet zu sein. Gleiches gilt für den Nachweis von Ni^{2+} -Ionen komplexierenden Peptiden durch Ligandenaustausch mit Dimethylglyoxim unter Bildung des rot gefärbten Ni^{2+} -(Dimethylglyoximkomplex)₂. Der Komplex präzipitierte nicht an der Oberfläche, so dass keine Ni^{2+} -Bindung durch die lokale Ablagerung des Komplexes nachgewiesen werden konnte. Eine Oberflächenstrukturierung des Trägers in hydrophobe und hydrophile Bereiche sollte hier die Lokalisation der Komplexe vereinfachen. Die im Experiment eingesetzten perfluorierten Filme waren entweder nicht hydrophob genug, nicht reproduzierbar herstellbar oder nicht kompatibel mit den Peptidsynthesebedingungen. Eventuell könnte der Einsatz von angepassten Polymerbeschichtungen oder das bereits erwähnte *in situ* Reinigungsverfahren, wenn dabei die gereinigten Peptide auf z.B. Zellulose übertragen werden, bei diesen Anwendungen zum Erfolg führen.

Zur Detektion von $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ - und ${}^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ -komplexierenden Peptiden wurde eine Hexapeptid-Bibliothek mit 133.224 individuellen Peptidspots ($\text{NH}_2\text{-XAs}_1\text{As}_2\text{As}_3\text{As}_4\text{X}$ -Träger; X= Aminosäuregemisch) mittels des Peptidlaserdruckers synthetisiert. Anhand der radioaktiven Strahlung konnten $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ - und ${}^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ -komplexierende Peptide identifiziert und selektiv an der Koordination beteiligte Aminosäuren und Aminosäuremotive bestimmt werden. Die stabilste $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Bindung riefen die Aminosäuren Histidin, Lysin und Argin in den Hexapeptiden XXXXHX, XXXKHX > XRXHX > XXXHHX > XRXHX (X=variable As) hervor. Dabei wurden diese Komplexe auch in Anwesenheit eines Überschusses an kompetitiven Chelatoren (10 mM L-Histidin und 10 mM L-Cystein) nicht degradiert. In einem Kontrollversuch wurden ${}^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ -bindende Peptide detektiert. In Anlehnung an publizierte Resultate wurden an der Bindung beteiligte Aminosäuren (Histidin, Lysin und Threonin) in den Sequenzen XXTXHX > XXXHKX > XHXXHX > XKXXHX > XXXHHX identifiziert. Die essentielle Bedeutung des L-Histidins zur stabilen Komplexierung konnte in beiden Fällen belegt werden. Obwohl in der ersten und letzten Position der Hexapeptide ein Gemisch von Aminosäuren vorliegt und eine abschließende Verifizierung der Resultate (z.B. HPLC) noch aussteht, wurden solche Untersuchungen noch nie mit einer derartig hohen Vielfalt verschiedener Peptide auf einer Trägermatrix durchgeführt. Zudem wurde erstmalig eine Hochdurchsatzsuche für $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Peptid-Komplexe durchgeführt. In weiterführenden Versuchen sollen die N- und C-terminalen Aminosäuren permutiert und die stärksten $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -bindenden Sequenzen ermittelt werden. Weiterführende HPLC-Untersuchungen und der Einsatz der letztendlich entschlüsselten

Sequenzen als Label für tumorspezifische Liganden in *in vivo* Versuchen sind ebenfalls denkbar. Auch bei dieser Anwendung würde die Verwendung eines *in situ* Reinigungsverfahrens sicherlich zu einer Steigerung der Assayqualität und damit der Reproduzierbarkeit führen.

Um letztendlich eine mit Oligonukleotid-Arrays vergleichbare Komplexität zu erzielen und das Arrayformat weiter zu miniaturisieren, wurde das Konzept zur Synthese von Peptiden auf Mikrochips in Kooperation mit dem *Kirchhoff-Institut für Physik* (Universität Heidelberg) entwickelt. Die Realisierbarkeit dieses Konzeptes wurde sowohl auf einfachen Platinenmikrochips als auch auf komplexen CMOS-Chips demonstriert, wobei Dichten von bis zu 40.000 Peptidspots/cm² erreicht wurden. Dazu wurden zwei Epitope (YPYDVPDYA und DYKDDDDK) in einem schachbrettartigen Muster auf den verschiedenen Mikrochips synthetisiert und durch ihre korrespondierenden Antikörper (anti-HA- und anti-Flag-Antikörper) nachgewiesen. Die Synthese einer komplexen Peptidbibliothek auf den CMOS-Chips wird derzeit vorbereitet. Eine automatische Syntheseeinheit zur standardisierten Herstellung von Peptidarrays auf Mikrochips befindet sich ebenfalls in der Entwicklung.

Insgesamt konnten hoch komplexe Peptidarrays mit mehr als 130.000 Peptidspots auf einem Träger mittels des Peptidlaserdruckers hergestellt werden. Dabei wurde mit 400 Peptidspots/cm² Spotdichten erzielt, die den Stand der Technik (SPOT-Synthese; 25 Peptidspots/cm²) um ein Vielfaches übertreffen. Doch nicht nur die Effizienz der Partikel-basierten Peptidsynthese sondern auch der potentielle Nutzen dieser Peptidarrays für die Identifizierung spezifischer Kinasesubstrate in der funktionellen Proteomforschung und für die Untersuchung von Metall-Peptid-Interaktionen zur Entwicklung von Chelatoren für die diagnostische Nuklearmedizin wurden in dieser Arbeit veranschaulicht.. Derzeit befindet sich ein neuer Peptidlaserdrucker in der Entwicklung, durch den die Spotdichte von bisher 400 Peptidspots/cm² auf ca. 2000 Peptidspots/cm² gesteigert werden soll. Mit Hilfe der Mikrochips soll diese Komplexität noch weiter erhöht werden, mit dem Ziel die neuartig synthetisierten Peptidarrays in diversen biologischen und medizinischen Anwendungen als funktionelles Werkzeug einzusetzen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien zur Oberflächenmodifikation, Festphasensynthese sowie Synthese in flüssiger Phase wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität eingesetzt. Sie wurden unter anderem von den folgenden Unternehmen bezogen:

Sigma-Aldrich Chemie mit den Marken *Sigma*, *Aldrich*, *Fluka* bzw. *Riedel-de Haën* (Steinheim/Deutschland), *Merck Biosciences* mit den Marken *Calbiochem* und *Novabiochem* (Bad Soden/Deutschland), *VWR International* (Darmstadt/Deutschland), *New England Biolabs* (Frankfurt/Deutschland), *Invitrogen GmbH* (Karlsruhe/Deutschland), *Acros Organics* (Geel/Belgien), *Fisher Scientific* (Schwerte/Deutschland), *Carl Roth* (Karlsruhe/Deutschland), *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz/Deutschland) und *Biosolve* (Valkenswaard/Niederlande)

Essigsäureanhydrid (99+%), Piperidin (99 %), Methanol (p.a.), 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluorbutylacrylsäure (97 %), AD-mix-alpha, Poly(ethylenglycol)methacrylat, Kaliumhexacyanoferrat(III) (99 %), Pentadecafluorooktanoylchlorid (97 %), 2-Mercaptoethanol (≥ 98 %), Kupfer(I)chlorid (98 %), Methansulfonsäureamid (97%), 7-Octenyltrichlorosilan und Natriumhydroxid (97 %) wurden von *Aldrich*, *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (99 %), *N*-Methylimidazol (99,9 %), *N,N*-Diisopropylethylamin, Kresylviolettacetat, Bis(p-nitrophenyl)phosphat Natriumsalz (≥ 99 %) und Dimethylglyoxim wurden von *Sigma*; Triisobutylsilan ($\geq 98,5$ %), Zink(II)chlorid (ACS), Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Dinatriumsalz, 4-(Fmoc-amino)butansäure, 11-(Fmoc-amino)undecansäure, Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexa-1-carbonsäure (SMCC), Aceton (99,5 %) wurden von *Fluka* und *n*-Hexan (p.a.), Zinn(II)chlorid Dihydrat (98 %, p.a.), Zirkonium(IV)chlorid, Kupfer(II)chlorid Dihydrat (≥ 99 %, p.a.), Ethylendiamin (98 %, techn.) von *Riedel-de Haën* bezogen. Wasserstoffperoxid (30 %, p.a.), Essigsäure (100%, p.a., *N*-Ethylendiisopropylamin (≥ 98 %), Triethylenglycolmonomethylether (≥ 97 %; TGMME), Methylmethacrylat (99 %), *N,N,N,N,N*-Pentamethyldiethylentriamin (≥ 98 %) und Bromphenolblau (ACS), HOBt wurden von *Merck Biosciences* bezogen. Ethanol (p.a.), Chloroform (99,1 %, p.a.), Isopropanol ($\geq 99,7$ %) wurden von *VWR International* erworben. Eisen(III)chlorid Hexahydrat (ACS), Europium(III)chlorid Hexahydrat (99,9 %), Nickel(II)acetat Tetrahydrat (p.a.) wurden von *Acros Organics*, der *Rink*-Linker wurde von *Novabiochem*, Trifluoressigsäure (peptide synthesis grade) und *N,N*-Dimethylformamid (peptide grade) wurden von *Biosolve* (Valkenswaard/Niederlande) bezogen. Schwefelsäure (95 %, p.a.) wurde von *Carl Roth*, Dichlormethan (analytical reagent grade) wurde von *Fisher Scientific* und Phosphorsäure (85 %, p.a.) wurde von *Applichem* erworben. *N,N*-Dimethylformamid und Dichlormethan wurden vor der Verwendung über Molekularsieb 4 Å (*Carl Roth*) getrocknet.

Die voraktivierten Fmoc-*L*-Aminosäure-pentafluorphenylester von Histidin, Serin und Threonin wurden ebenso wie das nicht voraktivierte *L*-Histidin von *Fluka* bezogen. Die restlichen 17 der 20

proteinogenen Fmoc-L-Aminosäure-OPfp Ester wurden von *Novabiochem* erworben. L-Cystein wurde von *Sigma* und Fmoc- β -Alanin-OH wurde von *Iris Biotech GmbH* bezogen.

Stickstoff und medizinischer Sauerstoff wurden von AirLiquide (Düsseldorf/Deutschland) geliefert.

4.1.1.1 Produkte chemischer Synthesen

(2-Bromo-2-methyl-N-propyltriethoxysilyl)isobutyramid, der Komplex $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]\text{Br}$, (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat und die Aminosäurepartikel wurden in der Arbeitsgruppe *Chip-basierte Peptidbibliotheken* (DKFZ, Heidelberg) wie folgt hergestellt:

1. Synthese des (2-Bromo-2-methyl-N-propyltriethoxysilyl)isobutyramid

In 65 ml getrocknetem Dichlormethan wurden 2,78 ml frisch destilliertes Triethylamin (20 mmol) und 4,44 ml (3-Aminopropyl)triethoxysilan (19 mmol) gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter Kühlung auf -80°C (Trockeneis/Isopropanol) und unter Schutzgas eine Lösung aus 30 ml trockenem Dichlormethan und 2,47 ml 2-Bromisobuttersäurebromid (20 mmol) unter Rühren zugetropft. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Gefäße trocken waren und keine Luftfeuchtigkeit in die Apparatur eintrat. Anschließend wurde das Rohprodukt im Rotationsverdampfer bei 55°C und 550 mbar abrotiert, so dass im Ansatz enthaltene Salze ausfielen. Das Rohprodukt wurde anschließend mit ca. 40 ml trockenem n-Hexan versetzt, entgast und bei RT 30 min gerührt. Der Überstand wurde im Stickstoffstrom über eine Fritte (Porengröße 4) abfiltriert und das Filtrat nochmals am Rotationsverdampfer eingengt. Das entstehende Produkt wurde ca. 4 h im Vakuum getrocknet. Daraus entstand eine ölige, leicht trübe Substanz. Diese wurde unter völlig wasserfreien Bedingungen und mit Hilfe einer Kugelrohrdestille (0,4 mbar und 127°C) nochmals gereinigt und das gewonnene rosa Endprodukt unter Stickstoff bei -20°C gelagert.

2. Synthese des Rheniumcarbonylkomplex $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]\text{Br}$

1g $[\text{Re}(\text{CO})_5]\text{Br}$ wurden in einem Rundkolben vorgelegt und mit 10 ml dest. Wasser über 24 h unter Rückfluss und Schutzgas (Stickstoff) erhitzt. Nicht umgesetztes $[\text{Re}(\text{CO})_5]\text{Br}$ wurde vom Rückflusskühler in die Reaktionslösung zurückgespült. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung filtriert, um partikuläre Verunreinigungen zu entfernen. Das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert und ein hellgrünes Pulver als Produkt in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten (Lazarova et al.; 2004).

3. Synthese des (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphats

2 g 4-Nitrophenylphosphorodichloridat wurden in einem Rundkolben vorgelegt und in 40 ml Toluol gelöst. Unter stetigem Rühren wurde eine Lösung aus 1,25 ml Piperidin und 0,9 g 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl in 50 ml Toluol innerhalb von 2 h der Lösung tropfenweise und unter Schutzgas zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde ca. 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde über eine Filternutsche (Porengröße 4) filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bei 70 mbar und 50°C eingengt und schließlich im Vakuum getrocknet. Das Konzentrat wurde in 30 ml dest. Wasser in der Wärme aufgenommen und mit konzentrierter Salzsäure tropfenweise versetzt, bis die Lösung

eine gelbe Farbe annahm. Die Lösung wurde nochmals für 18 h bei 50°C gerührt. Der entstehende Niederschlag wurde mittels einer Glasfritte vom Reaktionsansatz getrennt und in Wasser umkristallisiert. Das weiße und kristalline (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat wurde im Vakuum getrocknet und unter Schutzgas bei -20°C gelagert.

4. Produktion von Aminosäurepartikeln

Die 20 verschiedenen Fmoc-geschützten OPfp Ester der proteinogenen L-Aminosäuren (13,5% w/w) wurden zur Partikelherstellung in eine feste Matrix eingebettet. Diese Matrix besteht aus folgenden Komponenten: *N,N*-Diphenylformamid (DPF), Diphenylsulfoxid (DPSO) oder di-*p*-Tolylsulfoxid (DTSO), die als festes Lösungsmittel in der Partikelmatrix fungieren (27% w/w), einem Harz, um die Matrix gegen thermische und mechanische Einflüsse zu stabilisieren (Polystyrene, *Merck Biosciences* oder S-LEC PLT-7552, 54% w/w; *Sekisui Chemical*, Osaka/Japan), Pyrazolone Orange (4,5% w/w; *ABCR GmbH & Co. KG*, Karlsruhe/Deutschland) und Natrium-di(aqua)-di(2-hydroxy-3-Naphtonsäure)ferrat(III) (1% w/w) zur Stabilisierung der triboelektrischen Ladung.

Zur Herstellung feiner Mikropartikel wurden die Komponenten in der Hitze gelöst, zu einer homogenen Masse vermengt, wiederum ausgehärtet und in einer Luftstrahlmühle (100AS, *Hosokawa*, Augsburg/Deutschland) gemahlen. Bei diesem Prozess wurden Silika Nanopartikel zugegeben (0,1% w/w, Aerosil 812, hydrophob; *Evonik Degussa GmbH*, Hanau-Wolfgang/Deutschland), um das Entstehen von Partikelagglomeraten zu verhindern. Es entstanden Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 4-8 µm. Um diese Fraktion abzutrennen wurden Partikel, deren Größe 32 µm überschritt, mit Hilfe eines analytischen Siebes (AS 200 digit, *Retsch GmbH*, Haan/Deutschland) entfernt. Der Herstellung folgte eine Qualitätskontrolle der Partikel bezüglich ihrer Größe, triboelektrischen Ladung, Schmelzpunkt und ihrer Tendenz Agglomerate auszubilden.

4.1.2 Pufferreagenzien, Antikörper, Peptide und Proteinkinasen

Bovine Serum albumin (BSA Fraktion V, ≥ 96 %), EPPS (99,5 %), MOPSO (99 %), Tween®20 (for electrophoresis), TRIZMA base (99,9 %) wurden von *Aldrich*, Glycerol (wasserfrei), Phospho(enol)pyruvat Trinatriumhydrat, β-Nicotinamidadenindinukleotid Dinatriumsalz (reduziert), *Coomassie Brilliant Blau G250* wurden von *Sigma* und Natriumhydrogencarbonat (99,7 %, p.a.), Natriumchlorid (99,8 %), Magnesiumacetat Tetrahydrat (99,5 %, p.a.), Magnesiumchlorid Hexahydrat wurden von *Riedel-de Haën* bezogen. Kaliumhydroxid (p.a.) wurde von *Applichem*, HEPES und SDS-b (Powder DABIO) wurden von der *GERBU Biotechnik GmbH* (Gaiberg/Deutschland) erworben. MOPS, EDTA (≥ 99 %), *Rotiphorese® Gel 30* Acrylamid/ Bisacrylamidlösung, *Rotiphorese® Gel A* Lösung Acrylamidlösung und Guanidiniumhydrochlorid (95,5 %) wurden von *Carl Roth*, Protein-Größenstandard 10-250 kDa von *New England Biolabs GmbH* (Frankfurt/Deutschland), Dinatriumhydrogenphosphat (≥ 99 %) und Kaliumhydrogenphosphat von *Merck Biosciences*, Brij 35 Detergent (30% aq. Lösung) von *Calbiochem* bezogen.

Die Kinasen wurden in Lösung geliefert, aliquotiert und bei - 80°C gelagert. Casein Kinase II und Abelson Tyrosin Kinase wurden inklusive eines 10X Kinaseassaypuffers von *New England Biolabs GmbH* (Frankfurt/Deutschland) bezogen. Die c-Src-Kinase wurde von *Biomol GmbH*

(Hamburg/Deutschland) erworben. L-Lactat-Dehydrogenase (Typ XXXIX, Aus dem Kaninchenmuskelgewebe) wurde von Sigma und die Pyruvatkinase (aus dem Kaninchenmuskelgewebe) von *Roche Diagnostics GmbH* (Mannheim/Deutschland) bezogen. Die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase wurde in der Arbeitsgruppe *Mechanismen biomolekularer Wechselwirkungen* (DKFZ, Heidelberg) von *Dr. D. Bossemeyer* hergestellt, aufgereinigt und in Lösung zur Verfügung gestellt.

ATP und AMP wurden von *Sigma* bezogen, in Tris-Puffer (25 mM Tris, pH 8) gelöst und als Aliquots (50 mM) bei -20°C gelagert. Radioaktives [γ -³³P]ATP und [γ -³²P]ATP in Lösung (Konzentration jeweils 370 MBq/ml) wurden von *PerkinElmer Las (EasyTides[®])*, Rodgau-Jügesheim/Deutschland bzw. *Redivue[®], Amersham Biosciences/GE Healthcare*, München/Deutschland) bezogen.

Anti-Ha-Antikörper (affinity isolated, 0,8 mg/ml aus dem Kaninchen oder der Maus), anti-FLAG[®]-Antikörper (monoklonal, gereinigt, aus dem Kaninchen oder der Maus) wurden von *Sigma* (Saint Louis/USA) bezogen, Alexa Fluor[®] 546 anti-Maus IgG (H+L, 2 mg/ml, aus der Ziege) und Alexa Fluor[®] 647 anti-Kaninchen IgG (H+L, 2 mg/ml, aus der Ziege) wurden von der *Invitrogen GmbH* (Karlsruhe/Deutschland) erworben. Anti-Phosphoserin-Antikörper (monoklonal, aus der Maus) und Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (monoklonal, aus dem Kaninchen) wurden von *Sigma* bezogen.

Die verschiedenen eingesetzten Peptide (Tab. 9) wurden in der Abteilung *Peptidsynthese* der *Genomics & Proteomics Core Facility* (DKFZ, Heidelberg/Deutschland) von *Dr. R. Pipkorn* an fester Phase synthetisiert, gereinigt und mittels MALDI-TOF charakterisiert.

Tab. 9 Synthetisierte Peptide

N-Terminus	Aminosäuresequenz	C-Terminus
frei	IYGEFKKKC	frei
frei	ADPSNIYASPFWFC	frei
frei	QASSPQSSDVEDEC	frei
frei	LRRASLGC	frei
frei	LRRASLG (Kemptid)	frei
frei	DYKDDDDK	frei
frei	YPYDVPDYA	frei
Fmoc-Gruppe	TGGYGG*	frei
Fmoc-Gruppe	HHHHHH*	frei

*Seitenkettenschutzgruppen vorhanden: Thr(tBu); Tyr(tBu); His(Trt)

4.1.3 Generatoren und Kits

Der Technetium-99m-Generator *Elumatic III* (*CBI Medical Products Vertriebs GmbH/Schweiz*) und der *IsoLink[®]*-Markierungskit (*Mallinckrodt*, Petten/Niederlande) wurden von *Prof. M. Eisenhut* (Radiopharmazeutische Chemie, DKFZ, Heidelberg/Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein/Phosphopeptide Microarray Stain inklusive *Destain Solution* wurden von der *Invitrogen GmbH* (Karlsruhe/Deutschland) geliefert.

4.1.4 Geräte und Zubehör

UV-induzierte Graftpolymerisation

Zur Herstellung von Ozon wurde ein Ozonisator *LAB2B* der Marke *Triogen* (*WS Industrievertretung und Technischer Fachhandel*, Bonn/Deutschland) verwendet. Für die UV-induzierte Graftpolymerisation wurde ein Quecksilber-Mitteldruck-Strahler (150 W) von *UV-Consulting Peschl* (Mainz/Deutschland) mit dem passenden Spannungsgerät TQ 150 der *Heraeus Noblelight GmbH* (Hanau/Deutschland) verwendet.

Spotroboter

Zum Spotten der Cystein-terminierten Peptide wurde ein *Biochip Arrayer* der Firma *PerkinElmer Las GmbH* (Rodgau/Deutschland) verwendet.

Peptidlaserdrucker

Der auf dem OKI LED-Farbdrucker C7400 basierende Peptidlaserdrucker wurde im *Fraunhofer Insitut für Produktion und Automatisierung* (Stuttgart/Deutschland) konzipiert und gefertigt.

Im Unterschied zum Seriengerät besitzt der Drucker 20 Druckwerke, die hintereinander angeordnet sind. Der Glasträger wird auf einem Probenhalter fixiert und mikrometergenau über Anschläge positioniert. Der Probenhalter bewegt sich präzise auf einem Linearvorschub (Abweichung auf 3 m: ca. 10 μm) unter den Druckwerken hinweg. Dies gewährleistet die genaue Ausrichtung bei repetitiven Druckzyklen. Der Druckvorgang wird über ein Softwareprogramm gesteuert, wobei das gewünschte Druckmuster und die Spotgröße über eine Eingabemaske aufgerufen werden.

Mikrochips

Die verschiedenen Mikrochips wurden am *Kirchhoff-Institut für Physik* (Universität Heidelberg/Deutschland) in der Abteilung *Technische Informatik* konzipiert. Die Herstellung einfacher Platinenchips erfolgte an der *TU Dresden* oder dem *Institut für Mikroelektronik* in Stuttgart. CMOS-Chips wurden vom *Europractice Konsortium* (Belgien) prozessiert und durch *ON Semiconductors*[®] angefertigt. Die Platinen wurden von *Häfele Leiterplattentechnik e.K.* (Schriesheim/Deutschland) und der *Würth Elektronik GmbH & Co. KG* (Deutschland) geliefert. Das Bonden der elektronischen Anschlüsse erfolgte am *Kirchhoff-Institut für Physik*.

Syntheseträger

Objektträger (76 x 26 mm², geputzt) wurden von *R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik* (Emmendingen/Deutschland) und Glasplatten (210 x 200 mm²) wurden von der *Gerhard Menzel GmbH & Co. KG* (Braunschweig/Deutschland) bezogen. Als Zellulosemembranen wurde das Gel Blotting Papier GB002 (Dicke: 0,4 mm) von *Schleicher&Schüll Bioscience* (Dassel/Deutschland) eingesetzt. Flexiperm-Halter wurden von *Greiner Bio-One GmbH* (Frickhausen/Deutschland) erworben. Si-Wafer 100 wurden von der Firma *Georg Albert PVD-Beschichtungen* (Silz/Deutschland) bezogen.

Synthesekammern und Abdeckungen

Die verschiedenen Synthesekammern und Abdeckungen aus Teflon zum Schutz der Mikrochips während der Flüssigphasenschritte bei der Peptidsynthese wurden in der Arbeitsgruppe *Chip-basierte Peptidbibliotheken* (DKFZ, Heidelberg) und in Kooperation mit dem *Kirchhoff-Institut für Physik* (Universität Heidelberg/Deutschland) konzipiert und hergestellt. Passende Magnetrührfische wurden von *neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH* (Heidelberg/Deutschland) und Parker Präzisions-O-Ringe aus *Kalrez®* von der Firma *Ralicks Industrie- und Umwelttechnik* (Haldern/Deutschland) bezogen.

4.2 Methoden

4.2.1 Bestimmung des Derivatisierungsgrades

Nach der Ankopplung einer Fmoc-Aminosäure oder Fmoc-Carbonsäure an eine Fläche mit definierter Größe A und nach dem Waschen mit DMF wird die Fläche mit einem bestimmten Volumen einer Lösung aus 20 vol.% Piperidin in DMF überschichtet. Nach 20 min wird diese Lösung gegen die Stammlösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm UV-spektroskopisch vermessen. Aus der gemessenen Extinktion E , der konstanten Schichtdicke in der Küvette $d = 1$ cm und dem molaren Extinktionskoeffizienten (Beyer, 2005) $\varepsilon = 5129$ L/mol kann der Derivatisierungsgrad DG nach (Eichler et al., 1991)

$$DG[\mu\text{mol} / \text{cm}^2] = \frac{E \cdot V[\text{mL}] \cdot 1000}{\varepsilon \cdot A[\text{cm}^2]}$$

ε = Extinktionskoeffizienten [L/mol]

E = Extinktion bei $\lambda = 301$ nm

V = Volumen [ml] der Abspalllösung

A = Flächeninhalt [cm^2]

berechnet werden. Indirekt kann aus den erzielten Werten auf die Kopplungsausbeute bei dem Aufbau eines Peptides aus z.B. Fmoc-Aminosäuren-OPfp geschlossen werden.

4.2.2 Cook-Assay

Die spezifische Aktivität der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase (PKA) wurde durch einen angepassten *Cook-Test* (Cook et al., 1982) bestimmt. Dabei wird die Spaltung des ATPs indirekt über die Bildung des oxidierten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) genutzt. Die Bildung erfolgt dabei durch eine enzymatische Umsetzung in drei Teilschritten (Abb. 71). Im ersten Schritt phosphoryliert die PKA ein Modellsubstrat (Abb. 76, Peptid) mit spezifischer Aktivität, wobei ADP entsteht. Das ADP nutzt die Pyruvatkinase im zweiten Schritt, um Phosphoenolpyruvat in Pyruvat zu überführen. Im letzten Schritt bildet die Laktatdehydrogenase aus dem Pyruvat Laktat und NAD^+ , welches im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm quantifiziert wird (Abb. 71). In einem typischen Assay werden dazu in 1 ml 100 mM MOPS-Puffer (pH 7,1) 15 U Laktatdehydrogenase

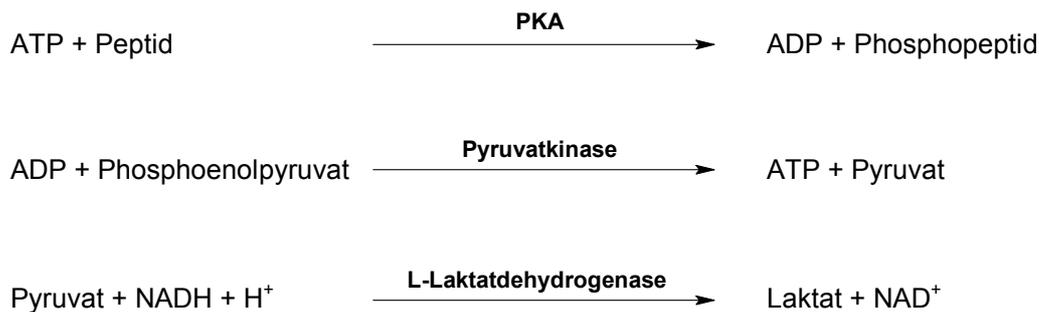


Abb. 71 Enzymatische Reaktionen die beim Cook-Assay zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der PKA genutzt werden.

(Muskelgewebe, Kaninchen), 8 U Pyruvatkinase (Muskelgewebe, Kaninchen), 100 mM KCl, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 210 μM NADH, 2 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 1 mM 2-Mercaptoethanol und 100 μM Kemptid (LRRASLG) gelöst. Ein Aliquot von 150 μl wird in eine Küvette gefüllt und die Reaktion durch Zugabe einer definierten Menge PKA gestartet. Die Änderung der Absorption dA mit der Zeit dt wird detektiert und aus der Steigung die Änderungsrate der Absorption $r_A = dA/dt$ bestimmt. Die spezifische Aktivität der PKA kann mittels dieser Änderungsrate nach

$$\text{Spezifische Aktivität [U]} = \frac{r_A}{\varepsilon \cdot l \cdot V_B} \cdot \frac{V_{\text{Küvette}}}{V_{\text{Probe}} \cdot p}$$

$r_A = dA/dt$, Änderungsrate der Absorption pro Zeit (Minute)

$\varepsilon =$ Extinktionskoeffizient des NADH bei 340 nm ($6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$l =$ Optische Weglänge (1 cm)

$V_B =$ Stöchiometrische Anzahl an Substanz B (NADH) bei der Reaktion (=1)

$V_{\text{Küvette}} =$ Volumen der Lösung in der Küvette (= 150 μl)

$V_{\text{Probe}} =$ Volumen der Enzymlösung, das in die Küvette pipettiert wird

$p =$ Konzentration des Enzyms (mg/ml)

berechnet werden. Dabei ist die spezifische Aktivität definiert als die Menge (μM) an Substrat, die pro Zeiteinheit (1 min) und pro mg des Enzyms umgesetzt wird. Sie wird in Units (U) pro mg Enzym angegeben, wobei, eine Unit (U) definiert ist als die Menge an Enzym, die die Reaktion von μM Substrat pro Minute bewirkt.

4.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinmengen in Lösung wurde mit dem *Bradford*-Test ausgeführt (Bradford, 1976). Dieser Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes *Coomassie brilliantblau G* an Proteine. Dieser Farbstoff bindet über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Argininreste sowie im geringeren Maße an einige basische und aromatische Aminosäurereste (Compton und Jones 1985). Der Farbstoff liegt in saurer Lösung hauptsächlich in der protonierten, kationischen Form vor (Absorptionsmaximum 470 nm). Bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes wird die anionische

Form des Farbstoffes stabilisiert, welche ein Absorptionsmaximum von 595 nm besitzt. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Proteinkomplexes sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes sehr sensitiv gegen den freien Farbstoff photometrisch gemessen werden. Zur Durchführung wird eine Standard-Eichkurve erstellt, für die unterschiedliche Konzentrationen von BSA (0 - 20 µg/ml) in Gegenwart einer *Coomassie Brilliant Blau G250*-Lösung (10 mg/ml) nach einer Inkubationszeit von 5 min bei einer Wellenlänge $\lambda = 595$ nm im Spektrophotometer (*SmartSpec Plus Spektrophotometer, Bio-Rad laboratories*) vermessen werden. Die Proteinlösung mit unbekannter Proteinmenge wird in verschiedenen Stufen verdünnt und ebenfalls vermessen. Anhand der bestimmten Extinktion kann mit Hilfe der Eichkurve direkt auf die Proteinmenge in der Lösung geschlossen werden.

4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen sowie eine Analyse ihres Reinheitsgrades nach einer Aufreinigung. Die Proteine werden hierbei ihrer Molmasse nach aufgetrennt. Ladungsunterschiede zwischen Proteinen werden durch das Detergenz SDS kompensiert, welches sich in Lade- und Lauf-Puffern befindet und darüber hinaus Proteine denaturiert und so den Einfluss von Tertiärstrukturen unterbindet. Proteine werden zusätzlich vor dem Gelauftrag durch Erhitzen und durch das Einwirken von β -Mercaptoethanol denaturiert. In Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld verschieden schnell durch die poröse Polyacrylamidmatrix zum Pluspol.

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 15 % Kornberg-Gele (Thomas & Kornberg, 1975) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

<i>Sammelgel:</i>	1,125 mL	Gel 30-Lösung
	1,65 mL	Sammelgel-Puffer
	4 mL	H ₂ O
	180 µL	APS
	6 µL	TEMED

<i>15 % Kornberg Trenngel:</i>	1 mL	Gel 30-Lösung
	4 mL	Gel A-Lösung
	2,5 mL	Trenngel-Puffer
	4,0 mL	H ₂ O
	75 µL	APS
	2,5 µL	TEMED

10-20 µL Proteinprobe wurden mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem 10x *Laemmli*-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden in die Taschen eines vertikal eingespannten SDS-Gels geladen (leere Taschen mit 1x Probenpuffer auffüllen) und ca. 1 h bei 28 mA (V_{\max} 400 V) aufgetrennt. Die eingesetzte Proteinmenge geht aus den Legenden der Abbildungen hervor. Zur korrekten Analyse des Protein Bandenmusters wurde zusätzlich zu den Proben auch ein Größenstandard (Marker) mit auf das Gel aufgetragen. Der Marker

10-250 kDa Ladder Mix von der Firma *New England Biolabs* ergibt folgende Referenzen in kDa: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 250.

Die SDS-Gele wurden kurz in H₂O gewaschen um SDS-Spuren zu entfernen und dann mindestens 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt. Abschließend wurde der Hintergrund so lange mit H₂O bzw. Superentfärbelösung herausgewaschen bis sich die Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Flachbettscanner digitalisiert.

4.2.4.1 Zusammensetzungen verwendeter Lösungen und Puffer

Coomassie-Lösung	200 mL Methanol; 100 mL Essigsäure; 200 mL H ₂ O, 1 g Coomassie;
<i>Laemmli</i> -Probenpuffer, 10x (nicht reduzierend)	400 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % Bromophenolblau; 8 % SDS; 50 % (v/v) Glycerol; auf 10 ml H ₂ O; bei -20°C lagern
<i>Laemmli</i> -Probenpuffer, 10x (reduzierend)	400 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % Bromophenolblau; 8 % SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 1,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; auf 10 ml H ₂ O; bei -20°C lagern
Laufpuffer	0,05 M Tris-Base; 0,38M Glycine; 1 % SDS; auf 2 L H ₂ O
Superentfärbelösung	400 mL Methanol; 200 mL Essigsäure; 400 mL H ₂ O
Sammelgelpuffer	0,75 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% SDS
Trenngelpuffer	3 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% SDS

4.2.5 Auswertung der Autoradiographien zur Identifizierung von ^{99m}Tc-komplexierenden Peptiden

Mittels Autoradiographie konnten spezifische Signale auf den Peptidarrays detektiert werden, die anhand des Schwärzungsgrades auf die Bindung einer ^{99m}Tc-Spezies hinwiesen. Die Identifizierung dieser Spots und Zuordnung der spezifischen Aminosäureabfolgen gestaltete sich allerdings als schwierig. Aufgrund der hohen Anzahl an Spots war nur eine subjektive manuelle Auswertung möglich. Standardisierte Softwarepakete konnten nur bedingt eingesetzt werden, da das detektierte Spotmuster aufgrund des Druckprozesses bei der Arraysynthese leicht unregelmäßig war. Die gedruckten Spots variierten leicht in ihrer Größe und Form. Zudem waren untereinander oder nebeneinander angeordnete Spots teilweise horizontal oder vertikal gegeneinander verschoben. Zudem zeigten die mittels Autoradiographie erhaltenen Bilder einen sehr unregelmäßigen Hintergrund. Außerdem fehlten entsprechende Annotierungsdateien, die den Standardprogrammen eine Zuordnung der Aminosäuresequenzen zu den Spots anhand ihrer Position in x- und y-Richtung erlaubt hätten. Aus diesen Gründen wurde von *G. Torralba* am *Kirchhoff-Institut für Physik* (Heidelberg/Deutschland) ein angepasstes Auswertverfahren inklusive Analysesoftware entwickelt. Dieses berücksichtigt lokale Schwankungen des Hintergrundes und ermöglicht die Zuordnung der Aminosäuresequenzen zu den detektierten Signalen. Die Ausgabe der Analyseergebnisse erfolgte in Tabellenform (excel-Dateien), in denen nach Sequenzübereinstimmungen gesucht wurde.

4.3 Analytik

XP-Spektroskopie

Die XP-Spektren wurden mittels eines *MAX-200-Spektrometers* (*Oerlikon Leybold Vacuum GmbH*, Köln/Deutschland) aufgenommen. Dabei diente eine Aluminiumanode mit einer Energie der $K\alpha_{1,2}$ -Linie von 1486,6 eV als nicht-monochromatische Röntgenstrahlungsquelle. Ein Energieanalysator EA 200

Tab. 10 Messparameter für ausgewählte XP-Spektren

Orbital	Startenergie [eV]	Endenergie [eV]	Schrittweite [meV]	Verweilzeit [ms]	Passenergie [eV]	Scanzahl
C1s	300	275	200	100	48	15
O1s	545	525	200	40	48	20
Si2s	178	145	200	40	48	20
Si2p	115	85	200	40	48	20
N1s	410	390	200	100	48	20
Übersicht	1000	-4,8	200	10	96	5

wurde zur Detektion der Elektronen eingesetzt. Die experimentell bestimmte Auflösung der Anlage betrug 0,9 eV (Köhn, 1998). In Tabelle 10 sind einige der verwendeten Messparameter zusammengefasst. Zunächst wurde bei den Messungen ein Übersichtsspektrum aufgenommen, um die Signalintensitäten und Probenposition zu kontrollieren. Anschließend wurden die Detailspektren zur qualitativen und quantitativen Analyse aufgezeichnet. Die resultierenden Spektren wurden aufgrund von Aufladungsspektren mittels des C1s-Peaks (284,6 eV) kalibriert. Zudem werden die Spektren vor der Analyse durch eine apparatespezifische Transmissionsfunktion normiert, da die Nachweisempfindlichkeit des Analysators vom jeweiligen Energiebereich abhängig ist. Die quantitative Analyse wurde mittels der Programmpakete *Microcal Origin 3.0* und *Microcal Origin 6.0* (*Microcal Software, Inc.*; USA) durchgeführt. Zur Bestimmung von Stöchiometrieverhältnissen N_A/N_B zwischen den analysierten Elementen *A* und *B* wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A}$$

I_A und I_B : Intensitäten der Elementsignale

σ_A und σ_B : elementspezifische Wirkungsquerschnitte

λ_A und λ_B : Abschwächungslängen [Å] eines Photoelektrons bei der Energie E_A bzw. E_B

Die Intensitäten I_X wurden dabei durch Anpassung von Voigt-Profilen an die jeweiligen Signale und durch Integration der Einzelpeaks erhalten. Wirkungsquerschnitte σ_X (normiert auf $\sigma_{C1s} = 1$) und

Tab. 11 Verwendete Wirkungsquerschnitte σ_x und Abschwächungswellenlängen λ_x

Orbital	σ [w.E.]	λ [Å]
C1s	1,00	24,0
O1s	3,08	20,3
Si2s	0,855	30,5
Si2p	0,82	35,2
N1s	1,84	21,5
Br3p	3,31	28,59
F1s	4,43	19,7
Zr3d	7,04	28,4

Abschwächungswellenlängen λ_x wurden der Literatur entnommen (Scofield, 1976; Yeh & Lindau, 1885) und sind beispielhaft in Tabelle 11 aufgelistet.

Ellipsometrie

Zur Bestimmung der Dicke der verschiedenen Filme auf Siliziumoberflächen diente ein Ellipsometer *Typ M-44 (J. A. Woollam Co. Inc.; USA)*. Dabei wurde die Bestimmung der Filmdicke bei einem festen Winkel von 75° durchgeführt unter Verwendung der Software *WVase32™* und des CAUCHY-Modells (Cauchy, 1830).

Kontaktwinkel

Kontaktwinkel (advancing contact angles) wurden mit einem *Goniometer G1 (Krüss GmbH; Hamburg/Deutschland)* bestimmt, wobei die Methode des liegenden Tropfens („sessile drop method“) verwendet wurde. Dabei wird eine Tangente an einen Wassertropfen gelegt und der Winkel von einer Skala abgelesen, nachdem die Tangente zum Mittelpunkt parallel verschoben wurde. Die Messung erfolgt dabei dynamisch durch die Aufnahme des Vorrückwinkels unter stetiger Volumenzunahme des Tropfens, die manuell über eine Kanüle dosiert wird. Pro Probe wurden 4-5 Werte aufgenommen und der Mittelwert bestimmt.

Massenspektrometrie/ MALDI

Die massenspektrometrischen Analysen wurden in der Arbeitsgruppe *Zentrale Proteinanalytik (DKFZ, Heidelberg)* mit einem *MALDI time of Flight PSD Reflektrom* und einem linearen Massenspektrometer (*Reflex II, Bruker Daltonics, Bremen/Deutschland*) durchgeführt. Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 0,1 vol.% TFA verdünnt und vor der Messung mit *ZipTipC18* Pipettenaufsätzen (Millipore, Schwalbach/Deutschland) chromatographisch gereinigt. Dabei wurden die Peptide an der stationären Phase adsorbiert und direkt mit der Matrix (α -Cyanozimtsäure, 50 vol.% Acetonitril in 0,1 vol.% TFA) auf den MALDI-Messträger eluiert.

UV-Spektroskopie

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen wurden in chemikalienbeständigen Einmalküvetten aus Kunststoff (220-900 nm; *neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg/Deutschland*) durchgeführt. Die Proben wurden mittels eines *SmartSpec Plus Spektrophotometers* (Bio-Rad Laboratories, München/Deutschland) vermessen. Der Cook-Assay wurde in einem *Spectrod 200* Spektrophotometer (*Analytik Jena AG, Jena/Deutschland*) durchgeführt.

Fluoreszenzscanner

Bei Immunoassays im Objektträger-Format wurden Fluoreszenzsignale mit einem *GenePix® 4000B* (*Axon Instruments* bzw. *Molecular Devices, USA*) Fluoreszenzscanner bei einer Laseranregung von 632 nm (rot) und 532 nm (grün) detektiert. Zur Darstellung der Bilder wurde die Software *GenePix® Pro* (*Axon Instruments* bzw. *Molecular Devices, USA*) verwendet. Zum Scannen von Mikrochips in

kleinen Formaten ($\leq 5 \times 5$ mm) wurde ein spezifischer Halter verwendet, der in der Abteilung *Chip-basierte Peptidbibliotheken* (DKFZ, Heidelberg) hergestellt wurde.

Fluoreszenzmikroskop

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde ein *Axiovert 35* Mikroskop (*Carl Zeiss MicroImaging GmbH*, Göttingen/Deutschland) genutzt. Die Bilder wurden dabei mit einer *pixelfly* Digitalkamera (*PCO AG*, Kelheim/Deutschland) aufgenommen.

Radio-HPLC

Die qualitativen Analysen der Umsetzung des Technetiumperotechnetats in den Technetiumcarbonylkomplex wurden in der Arbeitsgruppe *Radiopharmazeutische Chemie* (DKFZ, Heidelberg/Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Spezies isokratisch in einer *Chromalit RP 18 E* Säule (*Merck KGaA*, Darmstadt/Deutschland) getrennt und mittels eines *BIOSCAN Flow Count* (*Bioscan*, Washington DC/ USA) detektiert. Als Elutionspuffer wurde ein saurer Phosphatpuffer (8 vol.% Triethylamin, 6 vol.% Phosphorsäure (85 %); pH 2,4) genutzt.

Autoradiographie

Zur Detektion der radioaktiven Signale, wurden die Arrays einem *Storage Phosphor Screen* (z.B. *Molecular Dynamics GmbH*, Krefeld/Deutschland) ausgesetzt und die Screens nach Ablauf einer definierten Expositionszeit in einem *Typhoon 9400 variable Mode Imager* (*Amersham Biosciences* bzw. *GE Healthcare*, München/Deutschland) ausgelesen.

5 Durchführung

5.1 Modifizierung der Syntheseträger

5.1.1 Reinigung der Oberflächen

1. Reinigung der Trägeroberflächen mit CAROscher Säure

Die Träger (Glasplatten oder Objektträger) wurden 1 h in heißer (80°C), frisch zubereiteter CAROscher Säure (H₂SO₄/H₂O₂ 30%, 70 vol.% / 30 vol.%) gegeben und anschließend gründlich mit deionisiertem Wasser gespült. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und im Trockenofen für 30 min bei 100°C getrocknet, um sämtliche Wasserreste zu entfernen.

2. Reinigung der Trägeroberfläche mit 2 M Kaliumhydroxidlösung

Die Träger (Glasplatten oder Objektträger) wurden 1 h in einer Lösung aus KOH (2 M) in Isopropanol gegeben und anschließend gründlich mit deionisiertem Wasser gespült. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und im Trockenofen für 30 min bei 100°C getrocknet, um sämtliche Wasserreste zu entfernen.

3. Reinigung der Mikrochip-Oberflächen durch UV-Bestrahlung

Zur schonenden Reinigung von Mikrochips und Silizium-Testwafern wurden diese ca. 10 cm unterhalb einer UV-Lampe mit der Oberseite nach oben platziert und ca. 2 h bestrahlt. Der in der Luft befindliche Sauerstoff wird dabei teilweise zu Ozon umgewandelt und eventuelle Schmutzreste auf der Chipoberfläche durch Oxidation entfernt.

5.1.2 Synthese der Polymerfilme

Die in den Kapiteln 2.3 und 2.5 verwendeten PEGMA-Filme wurden mittels einer UV-induzierten Graftpolymerisation hergestellt (Beyer et al., 2005). Gleiches gilt für die in Abbildung 26, 28, 29 und 67 dargestellten Versuche. Alle übrigen PEGMA-Filme wurden mittels des einfacher anzuwendenden ATRP-Verfahrens synthetisiert.

5.1.2.1 Synthese von PEGMA-Filmen mittels UV-induzierter Graftpolymerisation

1. Silanisierung

Nach der Reinigung und Trocknung der Objektträger wurden diese über Nacht in einer Lösung aus 7-Octenyltrichlorsilan (0,2 mM) in Cyclohexan unter Schutzgas bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Träger mit *n*-Hexan und EtOH gründlich gespült und mit Chloroform (mind. 3x 15 min) gewaschen. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und zur längerfristigen Lagerung unter Schutzgas lichtgeschützt verpackt.

2. Ozonisierung

Die silanisierten Objektträger wurden mit der Oberseite nach oben in eine Polypropylen-Schale gelegt. Diese Schale wurde in eine Edelstahlwanne mit Gasanschlüssen gestellt und die Wanne luftdicht

verschlossen. Über Silikonschläuche wurde Ozon eingeleitet mit einer Flussrate von 1 L/min. Das Ozon wurde in einem Ozonisator aus medizinischem Sauerstoff hergestellt. Die Objektträger wurden 30 min dem Ozonfluss ausgesetzt. Danach wurde die Apparatur 1 min mit reinem Sauerstoff gespült und nochmals für mindestens 3 min mit Stickstoff geflutet. Die Träger wurden umgehend zur UV-induzierten Graftpolymerisation weiterverwendet.

3. UV-induzierte Graftpolymerisation

Parallel zur Ozonisierung wurden 149 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat (0,4 mM) in 190 ml Wasser gelöst. Unter Rühren wurden 10 ml Poly(ethylenglycol)methacrylat (PEGMA₅; ~ 30 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde mehrmals unter Rühren evakuiert und mit Stickstoff begast, bis keine signifikante Gasentwicklung mehr festzustellen war. Die wässrige Lösung wurde vorsichtig über die frisch ozonisierten Objektträger in der Polypropylen-Schale gegossen unter Vermeidung von Blasen. Die Schale wurde wiederum in die Edelstahlwanne gesetzt und luftdicht mit einer Quarzglasplatte verschlossen. Über die Gasanschlüsse wurde 5 min Stickstoff eingeleitet. Der Stickstoffstrom wurde reduziert (Flussrate < 1 L/min) und die UV-Lampe mittig über der Schale platziert. Nach einer Bestrahlungszeit von 60 min wurden die Träger der Wanne entnommen und gründlich mit Wasser gespült. Um Homopolymer aus den Filmen zu waschen, wurden die Träger 90 min bei 80°C in bidest. Wasser gewaschen. Über Nacht wurden die Träger in DMF gewaschen und anschließend mit DMF und Methanol gespült, im Luftstrom getrocknet und bis zur Weiterverwendung unter Stickstoff bei 4°C gelagert.

5.1.2.2 Synthese von PEGMA-Filmen mittels ATRP

1. Silanisierung

Für einen Standardansatz zur Silanisierung von 40 Objektträgern wurden 250 ml DCM in einem ausgeheizten Standzylinder gefüllt. Unter Rühren wurde 1 ml (2-Bromo-2-methyl-*N*-propyltriethoxysilyl)isobutyramid (20 mM) zugegeben. Die Träger wurden mit der Lösung übergossen und unter Stickstoff über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde am folgenden Tag mit EtOH ausgedünnt und die Träger mehrmals mit EtOH gewaschen. Zudem wurden die Träger 2 min in EtOH im Ultraschallbad von weiteren Silanresten befreit. Der Träger wurden abschließend im Luftstrom getrocknet und 1 h bei 110°C im Muffelofen gebacken. Nach dem Abkühlen wurden die Träger entweder unter Schutzgas bei 4°C gelagert oder es wurde gleich mit der Polymerisation von PEGMA- (2.) oder PEGMA/MMA-Filmen (3.) fortgefahren.

2. Synthese von PEGMA-Filme

Für 40 silanisierte Objektträger wurden 60 ml MeOH (p.a.), 60 ml dest. Wasser und 60 ml Poly(ethylenglycol)methacrylat (PEGMA₅; ~ 30 mmol) gemischt. Das Gemisch wurde dreimal entgast und mit Stickstoff versetzt, bevor 1,69 g 2,2'-Bipyridyl (0,9 mM) und 0,768 g Cu(I)Br (0,45 mM) zugegeben wurden. Die Feststoffe wurden im Ultraschallbad gelöst. Die Träger wurden in eine Reaktionskammer eingeordnet und diese Kammer in einen Exsikator gestellt. Die Polymerisationslösung wurde über die Träger gegossen und der geschlossene Exsikator anschließend dreimal entgast und bestickt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT stehen gelassen. Am

nächsten Tag wurden die Träger mit viel bidest. Wasser gespült und dreimal mit MeOH gewaschen. Abschließend wurden die Träger im Luftstrom getrocknet und unter Stickstoff bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3. Synthese von PEGMA/MMA-Filme

Für die Graftpolymerisation von PEGMA/MMA Filmen wurden Mischungen aus dem Poly(ethylenglycol)methacrylat und dem Monomer Methylmethacrylat (MMA) im jeweiligen molaren Verhältnis (50/50; 70/30) hergestellt und als Lösungsmittel für Cu(I)Cl (0,35 mM) und PMDETA (0,7 mM) genutzt. Es wurde TGMME als zusätzliches Lösungsmittel zugegeben und eine endgültige Monomerkonzentration von 30 mM eingestellt. Das Gemisch wurde dreimal entgast, mit Stickstoff versetzt und das Kupfersalz im Ultraschallbad gelöst. Die Träger oder Mikrochips wurden in einem geeigneten Gefäß eingeordnet und dieses in einen Exsikator gestellt. Die Polymerisationslösung wurde über die Träger gegossen und der geschlossene Exsikator anschließend dreimal entgast und bestickt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT stehen gelassen und die Träger am nächsten Tag dreimal 5 min mit DMF, zweimal 5 min MeOH, zweimal 5 min mit bidest. Wasser und zweimal 5 min mit EtOH gewaschen. Abschließend wurden die Träger im Luftstrom getrocknet und unter Stickstoff bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

5.1.3 Aminoterminierung der PEGMA-Filme

5.1.3.1 Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-β-Alanin

Zum Anbinden des ersten Fmoc-β-Alanins an eine Charge von 40 mit PEGMA modifizierten Objektträgern wurden 300 ml trockenes DMF und 4,67 g Fmoc-β-Alanin (0,1 M) in einem ausgeheizten Kolben dreimal entgast und bestickt. Anschließend wurden 2,79 ml DIC (0,12 M) und 2,38 ml NMI (0,24 M) im Stickstoffstrom zugegeben und vermengt. Die Träger wurden in einer Reaktionskammer in einen Exsikator gestellt und mit der Lösung überschichtet. Der Exsikator wurde wiederum dreimal entgast und mit Stickstoff gefüllt und über Nacht bei RT stehen gelassen. Am folgenden Tag wurden die Träger gründlich mit DMF gewaschen und über Nacht in einer Lösung aus 70 vol.% DMF, 20 vol.% *N,N*-Diisopropylethylamin und 10 vol.% Essigsäureanhydrid inkubiert, um verbleibende freie Hydroxygruppen des Polymerfilms zu acetylieren. Die Träger wurden dreimal 5 min mit DMF und zweimal 5 min mit MeOH gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die Träger wurden unter Schutzgas bei 4°C gelagert. Vor der Weiterverwendung wurden die *N*-terminalen Fmoc-Gruppen abgespalten, wobei gleichzeitig die Kopplungsausbeute bzw. der Derivatisierungsgrad spektrophotometrisch bestimmt wurde (vergleiche Kapitel 4.2.1). Dazu wurden die trockenen Träger 30 min in DMF vorgequollen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden die Träger 20 min in 200 ml einer frisch hergestellten Lösung aus 20 vol.% Piperidin in DMF inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Träger dreimal 5 min mit DMF und zweimal 2 min mit MeOH und EtOH gewaschen. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und konnten wiederum unter Schutzgas bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

5.1.3.2 Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-NH-(CH₂)_n-COOH-Derivaten

Zur Kopplung der 11-(Fmoc-amino)undecansäure oder 4-(Fmoc-amino)butansäure wurden die PEGMA-Filme ca. 10 min in DMF vorgequollen. Die Fmoc-geschützte Alkansäure (0,1 M) wurden in getrocknetem DMF gelöst. Die Lösung wurde entgast und mit Stickstoff versetzt. Dann wurden die Kopplungsreagenzien DCC (0,12 M) und NMI (0,24 M) im Stickstoffstrom zugegeben. Die Filme wurden mit der resultierenden Lösung überschichtet und über Nacht bei RT unter Stickstoff inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Träger gründlich mit DMF gewaschen und über Nacht in einer Lösung aus 70 vol.% DMF, 20 vol.% *N,N*-Diisopropylethylamin und 10 vol.% Essigsäureanhydrid inkubiert, um verbleibende freie Hydroxygruppen des Polymerfilms zu acetylieren. Die Träger wurden dreimal 5 min mit DMF und zweimal 5 min mit MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und die Kopplungsausbeute bzw. der Derivatisierungsgrad mittels Fmoc-Abspaltung bestimmt (vergleiche Kapitel 4.2.1 und 5.1.3.1).

5.1.4 Einfügen von Linkern und Anbindung von vorsynthetisierten Peptiden

5.1.4.1 Kovalente Anbindung des SMCC-Linkers

Die aminoterminierten Objektträger wurden für 15 min in trockenem DMF vorgequollen. Nach dem Entfernen des DMF wurde jeder Objektträger mit 1 ml einer Lösung bestehend aus 3,4 mg/ml SMCC (Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-Carbonsäure, 10 mM) gelöst in 1 ml trockenem DMF überschichtet. Die Träger wurden über Nacht bei RT unter Stickstoff inkubiert und am folgenden Tag viermal je 3 min mit DMF gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Bis zu Verwendung wurden die Objektträger unter Stickstoff bei 4°C aufbewahrt.

5.1.4.2 Kopplung von Cystein-terminierten Peptiden an SMCC-Oberflächen

Von den vorsynthetisierten Peptiden (Freier *N*- und *C*-Terminus, Seitenketten entschützt, Cystein *C*-terminal) wurden Lösungen verschiedener Konzentration (1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM) in Natriumphosphatpuffer (2,75 mM KH₂PO₄, 4,0 mM Na₂HPO₄, pH 7) hergestellt. Die SMCC-modifizierten Oberflächen wurden 30 min in Phosphatpuffer vorgequollen und anschließend im Luftstrom getrocknet. Die gepufferten Peptidlösungen wurden entweder mittels einer Pipette (≥ 0,2 µl pro Spot) oder eines Spotroboters (0,9 nl pro Spot) auf den Träger aufgespottet und für 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Träger zur Blockierung von freien SMCC-Gruppen in einer Lösung aus 218 µl 2-Mercaptoethanol (50 mM) in 50 ml Phosphatpuffer 30 Minuten geschüttelt. Die Träger wurden dreimal 5 min mit Phosphatpuffer und viermal 5 min mit EtOH gewaschen. Abschließend wurden die Träger im Luftstrom getrocknet und bis zur Verwendung unter Schutzgas bei 4°C gelagert.

5.1.4.3 Kovalente Anbindung des Rink-Amid-Linkers

Die aminotermi­nierten Träger wurden für 15 min in trockenem DMF vorgequollen. Nach dem Entfernen des DMF wurden die Objektträger mit jeweils 1 ml einer Lösung bestehend aus 73 mg *Rink*-Linker (2 mM), 18,5 µl DIC (2,4 mM) und 16 µl NMI (4mM) in 1 ml trockenem DMF überschichtet. Die Träger wurden über Nacht bei RT unter Stickstoff inkubiert und am folgenden Tag viermal 3 min mit DMF, zweimal 5 min mit MeOH und zweimal 5 min mit EtOH gewaschen. Abschließend wurden die Träger im Luftstrom getrocknet und bis zur Verwendung unter Stickstoff bei 4°C aufbewahrt.

5.1.4.4 Kopplung von Peptiden an den Rink-Amid-Linker

Die mit dem *Rink*-Linker-modifizierten Oberflächen wurden 30 Minuten in trockenem DMF vorgequollen. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Es wurde eine Lösung aus den vorsynthetisierten Peptiden (0,1 M), HOBt (0,1 M) und HBTU (0,1 M) und *N,N*-Diisopropylethylamin (0,2 M) in trockenem DMF angesetzt. In diesem Fall trugen die vorsynthetisierten Peptide sowohl *N*-terminal eine Fmoc-Schutzgruppe als auch Seitenkettenschutzgruppen, um eine selektive *C*-terminale Ankopplung zu gewährleisten. Die Träger wurden mit der Lösung überschichtet und mindestens 2 h bei Raumtemperatur unter Schutzgas inkubiert. Anschließend wurden die Träger einer Lösung aus 70 vol.% DMF, 20 vol.% *N,N*-Diisopropylethylamin und 10 vol.% Essigsäureanhydrid für 2 h ausgesetzt. Die Träger wurden mit DMF (3x 5 min) gewaschen, 15 min in DMF vorgequollen und 20 min in einer Lösung aus 20 vol.% Piperidin in DMF inkubiert zur Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe. Anschließend wurden die Träger dreimal 5 min mit DMF, zweimal 2 min mit MeOH und zweimal 2 min mit EtOH gewaschen. Sie wurden im Luftstrom getrocknet und unter Schutzgas bei 4°C gelagert. Die Abspaltung der Peptide als Amid von der Trägeroberfläche erfolgt parallel zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Beschreibung in Kapitel 5.2.4.

5.1.5 Oberflächenmodifikation durch Ankopplung von perfluorierten Gruppen

5.1.5.1 Graftpolymerisation von Heptafluoroacrylsäure

1. Ozonisierung

Die silanisierten (vergleiche Kapitel 5.1.2.1) oder aminotermi­nierten Objektträger wurden mit der Oberseite nach oben in eine Polypropylen-Schale gelegt. Diese Schale wurde in eine Edelstahlwanne mit Gasanschlüssen gestellt und die Wanne luftdicht verschlossen. Über Silikonschläuche wurde Ozon mit einer Flussrate von 1 L/min eingeleitet. Das Ozon wurde in einem Ozonisator aus medizinischem Sauerstoff hergestellt. Die Objektträger wurden 30 min dem Ozonfluss ausgesetzt. Danach wurde die Apparatur 1 min mit reinem Sauerstoff gespült und nochmals für mindestens 3 min mit Stickstoff geflutet. Die Träger wurden umgehend zur UV-induzierten Graftpolymerisation weiterverwendet.

2. UV-induzierte Polymerisation

Parallel zur Ozonisierung wurden 5 vol.% 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluorbutylacrylsäure in EtOH gelöst. Die Lösung wurde mehrmals unter Rühren evakuiert und mit Stickstoff begast, bis keine signifikante

Gasentwicklung mehr festzustellen war. Die Lösung wurde vorsichtig über die frisch ozonisierten Objektträger in der Polypropylen-Schale gegossen unter Vermeidung von Blasen. Die Schale wurde wiederum in die Edelstahlwanne gesetzt und luftdicht mit einer Quarzglasplatte verschlossen. Über die Gasanschlüsse wurde 5 min Stickstoff eingeleitet. Der Stickstoffstrom wurde reduziert (Flussrate < 1 L/min) und die UV-Lampe mittig über der Schale platziert. Nach einer Bestrahlungszeit von 60 min wurden die Träger der Wanne entnommen und gründlich mit Wasser gespült. Um Homopolymer aus den Filmen zu waschen, wurden die Träger 90 min bei 80°C in Wasser gewaschen. Über Nacht wurden die Träger in DMF gewaschen und nochmals zweimal 15 min in Hexan im Ultraschallbad gereinigt. Abschließend wurden die Träger zweimal gründlich mit EtOH gespült, im Luftstrom getrocknet und bis zur Weiterverwendung unter Stickstoff bei 4°C gelagert.

5.1.5.2 Kovalente Anbindung von Pentadecafluorooktanoylchlorid

Die aminoterminierten Träger wurden 20 min in trockenem DMF vorgequollen. Das DMF wurde abgesaugt und die Träger in eine Lösung aus 56,6 µl Pyridin (0,1 M) in 7 ml trockenem DMF gelegt. Anschließend wurden 138,9 µl Pentadecafluorooktanoylchlorid (0,08 M) unter starkem Schütteln zur Reaktionslösung gegeben und die Träger 15 min bei RT geschüttelt. Die Träger wurden zweimal 15 min mit DMF und zweimal 5 min mit EtOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und unter Stickstoff bei -20°C gelagert.

5.1.5.3 Kovalente Anbindung von Pentafluoro-1-oktansulfonylfluorid

Aminoterminierte Träger wurden mit einer Lösung bestehend aus 250 µl einer 1 %igen NaOH-Lösung, 613 µl Wasser und 137 µl Pentafluoro-1-oktansulfonylfluorid (0,35 M) unter stetigem Schütteln bei RT über Nacht inkubiert. Die Träger wurden dreimal 10 min mit einer 0,25 %igen NaOH-Lösung gewaschen und dreimal gründlich mit Wasser gespült. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und unter Schutzgas bei -20°C gelagert.

5.2 Kombinatorische Peptidsynthese

5.2.1 Peptidsynthese mittels Fmoc-Aminosäure-OPfp Estern aus Lösung

Zur Synthese von Peptiden wurden die aminoterminierten Träger ca. 15 min in trockenem DMF vorgequollen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Träger mit einer Lösung bestehend aus dem jeweiligen Fmoc-Aminosäure-OPfp Ester (0,1 M) gelöst in trockenem DMF überschichtet. Die Träger wurden bei RT unter Schutzgasatmosphäre mindestens 2 h inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und die Träger mit einer Lösung aus 70 vol.% DMF, 20 vol.% *N,N*-Diisopropylethylamin und 10 vol.% Essigsäureanhydrid 1 min, 5 min und 15 min gewaschen. Anschließend wurden die Träger zweimal 5 min mit DMF gewaschen und für 30 min in DMF eingelegt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Fmoc-Schutzgruppen durch Inkubation in einer Lösung aus 20 vol.% Piperidin in DMF abgespalten und die Kopplungsausbeute spektrophotometrisch bestimmt (vergleiche Kapitel 4.2.1).

Die Träger wurden dreimal 5 min mit DMF, zweimal 5 min mit MeOH und zweimal 5 min mit EtOH gewaschen und anschließend im Luftstrom getrocknet. Dann wurden die Träger mit dem nächsten Fmoc-Aminosäure-OPfp Ester in Lösung überschichtet und der beschriebene Kopplungszyklus wiederholt. Nach dem vollständigen Aufbau der gewünschten Peptide wurden diese entweder wie in Kapitel 5.3 beschrieben modifiziert oder die noch vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen der verschiedenen Aminosäuren gemäß der Beschreibung in Kapitel 5.2.4 entfernt. Die im Luftstrom getrockneten Träger wurden bis zur Verwendung unter Schutzgas bei 4°C gelagert.

5.2.2 Synthese von Peptidbibliotheken mittels des Peptidlaserdruckers

Die trockenen funktionalisierten Träger (z.B. PEGMA- β Ala₃) wurden in den Peptidlaserdrucker eingelegt und mit allen 20 verschiedenen Aminosäurepartikelkollektiven in einem vorab definierten Muster bedruckt. Unter einer Schutzgasatmosphäre wurden die Aminosäuren bei 90°C 90 min gekoppelt. Die Träger wurden auf RT abgekühlt und die Partikelbestandteile zügig mittels DMF und Methanol von der Trägeroberfläche gespült ggf. wurden der Träger zweimal 2 min mit Chloroform gewaschen, um Silika Nanopartikel (grauer Schleicher auf dem Träger) zu entfernen. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet, nochmals im gleichen Druckmuster mit den Aminosäurepartikeln belegt. Wiederum wurden die Aminosäuren bei 90°C 90 min gekoppelt. Alternativ wurden Peptide auch durch einfache Kopplungszyklen synthetisiert. Hier entfielen der beschriebene Waschschrift und der zweite Druckvorgang. Die Träger wurden auf RT abgekühlt und mit einer Lösung aus 70 vol.% DMF, 20 vol.% *N,N*-Diisopropylethylamin und 10 vol.% Essigsäureanhydrid (1 min, 5 min, 15 min) gewaschen. Anschließend wurden die Träger zweimal 5 min mit DMF und zweimal 5 min Chloroform unter starkem Schütteln gewaschen. Die Träger wurden 30 min in DMF eingelegt, das Lösungsmittel wurde entfernt und die Fmoc-Schutzgruppen durch die Inkubation in einer Lösung aus 20 vol.% Piperidin in DMF abgespalten ggf. wurde die Kopplungsausbeute spektrophotometrisch bestimmt (vergleiche Kapitel 4.2.1). Die Träger wurden dreimal 5 min in DMF und zweimal 5 min in MeOH gewaschen. Um die Synthesequalität halbquantitativ zu kontrollieren, wurden die freien *N*-terminalen Aminogruppen durch eine ca. 5minütige Inkubation in einer Lösung bestehend aus 0,01 % Bromphenolblau in MeOH angefärbt. Die Anfärbung wurde optisch kontrolliert und ggf. durch einen Flachbettscanner digitalisiert. Die Träger wurden dreimal 5 min in DMF - um die Anfärbung zu entfernen - dreimal 5 min in MeOH und zweimal 5 min in EtOH gewaschen. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet. Anschließend wurde die nächste Monomerlage aufgedruckt und der beschriebene Synthesesyklus wiederholt. Nach dem Aufbau der gewünschten Peptide wurden die Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Beschreibung in Kapitel 5.2.4 entfernt.

5.2.3 Mikrochip-basierte Peptidsynthese

Die funktionalisierten Mikrochips wurden im Aerosol durch Anlegen von definierten Spannungen mit Aminosäurepartikeln im Schachbrettmuster belegt. Die Bestäubung erfolgte durch *K. König* oder *A.*

Nesterov in der Abteilung *Chip-basierte Peptidbibliotheken* (DKFZ/Heidelberg). Nach der Ablagerung einer Partikelsorte wurde das Bestäubungsmuster lichtmikroskopisch kontrolliert und die Partikellage in der Hitze (90°C) ca. 2 min fixiert, bevor mit der nächsten Bestäubung fortgefahren wurde. Nach der Belegung aller Pixelelektroden wurden die Aminosäuren bei 90°C 90 min in einer Schutzgasatmosphäre gekoppelt. Nach dem Abkühlen der Mikrochips auf RT wurden diese mit schützenden Teflonabdeckungen versehen und in die jeweilige Synthesekammer eingebaut. Nun wurden zügig die Aminosäurepartikel mittels DMF und MeOH von der Trägeroberfläche entfernt. Die Mikrochips wurden im Luftstrom getrocknet, aus der Synthesekammer ausgebaut und nochmals im gleichen Ablagerungsmuster mit den Aminosäurepartikeln belegt. Wiederum wurden die Aminosäuren bei 90°C 90 min gekoppelt. Bei der Synthese eines Peptides durch einen einfachen Kopplungszyklus entfielen der beschriebene Waschschrift und die zweite Partikelablagerung. Die Träger wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und in die Synthesekammer montiert. Anschließend wurden die Mikrochips gewaschen und die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Abschließend wurden die Mikrochips wieder aus der Synthesekammer entfernt, die nächste Monomerlage aufgebracht und der beschriebene Synthesesyklus wiederholt. Nach dem Aufbau der gewünschten Peptide wurden die Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Beschreibung in Kapitel 5.2.4 entfernt.

5.2.4 Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Zur Abspaltung der Seitenschutzgruppen der synthetisierten Peptide wurden die Syntheseträger 30 Minuten DCM ausgesetzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Träger dreimal 30 min in einer Lösung bestehend aus 51 vol.% TFA, 44 vol.% DCM, 3 vol.% Triisobutylsilan und 2 vol.% Wasser inkubiert. Die Träger wurden viermal 5 min mit DCM, zweimal 15 min mit DMF und zweimal 15 min mit einer Lösung aus 5 vol.% *N,N*-Diisopropylethylamin in DMF gewaschen. Dieser Waschschrift mit einer basischen Lösung wurde durchgeführt, um eine Protonierung der Aminosäurereste auszuschließen und um eventuell in der Polymerschicht verbliebene Säurereste zu neutralisieren. Abschließend wurden die Träger zweimal 5 min mit DMF, zweimal 5 min mit MeOH und zweimal 5 min mit EtOH gewaschen. Die Syntheseträger wurden im Luftstrom getrocknet und bis zur Verwendung unter Schutzgas bei 4°C gelagert.

5.3 Bildung von katalytisch aktiven Peptidderivaten

1. Anbindung *N*-terminaler Carbonsäuren

Die Träger mit den gebundenen seitenkettengeschützten Peptiden wurden 10 min in trockenem DMF vorgequollen. Zur Anbindung der *N*-terminalen Carbonsäuren wurden die *trans*-3-(3-Pyridylacrylsäure) oder penta-Fluorzimtsäure (je 0,1 M) in DMF gelöst. Zu der jeweiligen Lösung wurden äquimolare Mengen von HOBt (0,1 M) und DIC (0,1 M) gegeben und die Lösungen 20 min bei RT vorinkubiert. Die Träger wurden oberflächlich im Luftstrom getrocknet und jeweils mit ca. 2 Tropfen einer 1%igen Bromphenolblau-Lösung in DMF beträufelt. Dabei färbten sich die Träger blau. Anschließend wurden die blauen Träger mit der jeweiligen Carbonsäure-Lösung überschichtet und bei RT und unter

leichtem Schütteln inkubiert bis die Blaufärbung deutlich abnahm (ca. 2 h). Die Träger wurden viermal 3 min mit DMF und dreimal 3 min mit MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und unter Schutzgas bei 4°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2. Sharpless Dihydroxylierung

Zur Bildung von Diolen an den N-terminalen Carbonsäuren wurden 40 ml THF und 40 ml Wasser gemischt und mit 373,3 mg AD-Mix- α und 25,3 mg Methansulfonamid (3,3 mM) versetzt. Die Träger wurden 15 min in DMF vorgequollen, zweimal mit einem THF/Wasser-Gemisch (50 vol.% / 50 vol.%) gespült und anschließend mit der Reaktionslösung überschichtet. Nach ca. 4 h wurden die Träger im Ultraschallbad in einem THF/Wasser-Gemisch (50 vol.% / 50 vol.%) gereinigt und mit DMF, mit DCM und mit MeOH jeweils 5 min gewaschen. Die Träger wurden im Luftstrom getrocknet und unter Schutzgas bei -20°C gelagert. In einem letzten Schritt wurden die Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Beschreibung in Kapitel 5.2.4 abgespalten.

5.4 Nachweis von Peptidinteraktionen

5.4.1 Proteinkinase Assay

Für die in Kapitel 2.1 beschriebenen Phosphorylierungsexperimente durch die cAMP-abhängige Untereinheit der Proteinkinase wurden verschiedene Versuchsprotokolle eingesetzt. Die PKA wurde z.B. in unterschiedlich zusammengesetzten Reaktionslösungen eingesetzt. Dabei wurde jedoch der optimale pH-Bereich (pH 6,8 - pH 7,4) und Temperaturbereich (30 - 37°C) für eine hohe Aktivität der PKA eingehalten und grundsätzlich gut verträgliche MOPS-Puffer-Formulierungen eingesetzt. Nach Aussagen von *Dr. D. Bossemeyer* gibt es derzeit keine Publikationen oder veröffentlichte Angaben, die auf einen negativen Einfluss der verwendeten Detergenzien und Puffer- und Salzbedingungen schließen lassen. Der Vollständigkeit halber sind hier die unterschiedlichen Protokolle pro Abbildung in Kapitel 2.1 aufgeführt.

5.4.1.1 Puffer und Reaktionslösungen

Die Casein Kinase II (CKII) und die Abelson Tyrosin Kinase (Abl) wurden gemäß den Herstellerangaben im jeweiligen mitgelieferten 10X Reaktionspuffer eingesetzt. Für die Inkubation der c-Src Kinase wurden ein 5X Reaktionsbuffer und ein Verdünnungspuffer gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Für die Phosphorylierung des Arrays mit der PKA wurden die gleichen Puffer wie bei der c-Src Kinase eingesetzt oder ein 10X MOPS-Puffer. Für die Verdünnung der [γ - ^{33}P]ATP-Lösung und [γ - ^{33}P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) wurde eine Magnesiumacetat/HEPES-Lösung genutzt. Zum Waschen wurden neben verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) und einer 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung verschiedene Waschlösungen und -puffer verwendet. Die jeweiligen Zusammensetzungen lauten wie folgt:

10X Reaktionspuffer (Abl)

50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 2mM DTT; 0,01 vol.% Brij35; pH 7,5 (*New England Biolabs*)

10X Reaktionspuffer (CKII)	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl, pH 7,5 (New England Biolabs)
5X Reaktionspuffer:	40 mM MOPS; 1mM EDTA; pH 7,0
Verdünnungspuffer:	20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 0,01 vol.% Brij-35; 5 vol.% Glycerol; 0,1 vol.% Mercaptoethanol; 1 mg/ml BSA; pH 7,0
10X MOPS-Puffer	200 mM MOPS; 40 mM Magnesiumacetat; pH 6,8
Magnesiumacetat/HEPES-Lösung:	50 mM Magnesiumacetat; 2,5 mM HEPES
Natriumcitratpuffer:	0.75 M Natriumchlorid; 0.075 M Natriumcitrat; 1% SDS; pH 7; 60°C
alkalischer TBS-Puffer:	100 mM Tris; 200 mM NaCl; 0.2% SDS; pH 10,4
MOPS-Puffer:	20 mM MOPS; 4 mM Magnesiumacetat; 1 % BSA; pH 7,0

5.4.1.2 Blockieren mit Bovine Serum Albumin (BSA)

Zum Blockieren der Träger wurden 2 g BSA in 100 ml TBST-Puffer (50 mM Tris; 150 mM NaCl 0,1 vol.% Tween 20[®]; pH 7,4) gelöst. Die Träger wurden in dieser Lösung 2 h bei RT geschüttelt. Die Träger wurden zweimal 2 min mit TBST-Puffer und zweimal kurz mit der jeweiligen in Kapitel 5.4.1.4. verwendeten Reaktionslösung (ohne Radioaktivität) gespült und im feuchten Zustand weiterverwendet.

5.4.1.3 Blockieren mit nicht radioaktivem Adenosintriphosphat (ATP)

Zum Blockieren der Träger mit „kaltem“ ATP wurden 45 µl ATP-Lösung (50 mM ATP, 25 mM Tris, pH 8) mit 2 ml TBST-Puffer (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 vol.% Tween 20[®]; pH 7,4) gemischt. Die Träger wurden in dieser Lösung 2 h bei RT geschüttelt. Die Träger wurden zweimal 2 min mit TBST-Puffer und zweimal kurz mit der jeweiligen in Kapitel 5.4.1.4. verwendeten Reaktionslösung (ohne Radioaktivität) gespült und im feuchten Zustand weiterverwendet.

5.4.1.4 Phosphorylierungsexperimente

Abbildung 25:

Bei diesem Versuch wurden in acht Reaktionsräumen des Flexiperm-Halters verschiedene Kinasen in verschiedenen Puffern inkubiert. Die einzelnen Zusammensetzungen sind pro Feld in Tabelle 12 zusammengestellt. Dabei wurden drei verschiedene [γ -³³P]ATP-Lösung verwendet:

1. für die PKA und die c-Src wurden 2,5 µl [γ -³³P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) in 497,5 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung verdünnt.
2. für die Abl wurden 5 µl 10X Abl-Reaktionspuffer, 42,5 µl Wasser und 2,5 µl [γ -³³P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) gemischt und die resultierende Lösung 1:10 mit 1X Abl-Reaktionspuffer verdünnt.

3. für die CKII wurden 5 µl 10X CKII-Reaktionspuffer, 42,5 µl Wasser und 2,5 µl [γ -³³P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) gemischt und die resultierende Lösung 1:10 mit 1X CKII-Reaktionspuffer verdünnt.

Als Kinaselösung wurde für die PKA eine Lösung der Konzentration 0,1µg/µl eingesetzt. Alle übrigen Kinasen wurden in den gelieferten Lösungen eingesetzt.

Nachdem alle Reaktionsräume des Flexiperm-Halters mit den verschiedenen Lösungen gefüllt wurden, wurden diese durch einen unmodifizierten Objektträger abgedeckt und 1 h bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Träger 1 h unter kräftigem Schütteln mit 1 %iger Phosphorsäure, 30 min mit heißem Natriumcitrat-Puffer, 5 min mit 1 %iger Phosphorsäure, 30 min mit

Tab. 12 Pipettierschema

Feld	Wasser [µl]	5X Reaktionspuffer [µl]	Verdünnungspuffer [µl]	[γ - ³³ P]-ATP-Lösung [µl]	10X Reaktionspuffer [µl]	Kinaselösung [µl]
A	18	5	113	12		2 (PKA)
B	18	5	113	12		2 (c-Src)
C	14	5	113	12		6 (PKA)
D	14	5	113	12		6 (c-Src)
E	20	5	113	12		
F	117			12 (CKII)	15 (CKII)	5 (CKII)
G	117			12 (Abl)	15 (Abl)	5 (Abl)
H	123			12 (CKII)	15 (CKII)	

Guanidiniumhydrochlorid-Lösung, 5 min mit 1 %iger Phosphorsäure, 30 min mit alkalischem Puffer und nochmals 5 min mit 1 %iger Phosphorsäure gewaschen. Abschließend wurde der Träger mit Aceton abgespült und an der Luft getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie.

Abbildung 26:

Es wurden 10 µl [γ -³³P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) in 190 µl Wasser verdünnt ([γ -³³P]ATP-Stammlösung) und die in Tabelle 13 beschriebenen Lösungen angesetzt. Aus einer „kalten“ ATP-Lösung (50 mM ATP, 25 mM Tris, pH 8) wurden Lösungen der Konzentrationen 25 mM; 2,5 mM; 0,25 mM und 0,025 mM durch das Verdünnen mit Wasser hergestellt. Jeweils 5 µl dieser Lösungen und Wasser als Referenz wurden mit 225 µl Wasser und 25 µl der [γ -³³P]ATP-Stammlösung gemischt. Die resultierenden Lösungen hatten ATP-Konzentrationen von 0,5 mM, 0,05 mM, 0,005 mM, 0,0005 mM und 0 mM. Als Kinaselösung wurde für die PKA eine Lösung der Konzentration 0,01µg/µl in 1X

Tab. 13 Pipettierschema

Nr.	Wasser [µl]	10X MOPS-Puffer [µl]	[γ - ³³ P]ATP-Lösung [µl]	Kinaselösung [µl]
1	280	250	20 (0,5 mM ATP)	500
2	280	250	20 (0,05 mM ATP)	500
3	280	250	20 (0,005 mM ATP)	500
4	280	250	20 (0,0005 mM ATP)	500
5	280	250	20 (0 mM ATP)	500
6	280	750	20 (0,5 mM ATP)	0
7	280	750	20 (0,05 mM ATP)	0
8	280	750	20 (0,005 mM ATP)	0
9	280	750	20 (0,0005 mM ATP)	0
10	280	750	20 (0 mM ATP)	0

MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 4 mM Magnesiumacetat, pH 6,8) hergestellt.

Die gespotteten Arrayabschnitte wurden in Petrischalen verteilt und mit den in Tabelle 13 zusammengestellten Lösungen 1 h bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Trägerabschnitte zweimal 5 min mit MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 4 mM Magnesiumacetat, pH 7,0) und zweimal (1 min, 20 min) mit einer 20%igen wässrigen SDS-Lösung gewaschen. Die Träger wurden zweimal mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) abgespült und zweimal (5 min, 30 min) gewaschen. Abschließend wurden die Abschnitte mit Aceton abgespült, an der Luft getrocknet und die Signale mittels Autoradiographie detektiert.

Abbildung 28:

Für diesen Versuch wurden das c-Src und das PKA-Substrat auf verschiedene modifizierte Träger gespottet. Die Träger wurden zerteilt, so dass 6 Abschnitte mit PEGMA-βAla-SMCC-Filmen, 6 Proben mit PEGMA-Aun-SMCC-Filmen und jeweils 4 Abschnitte der aminoterminierten und SMCC-modifizierten Objektträger der Firmen *Nunc* und *Schott* zur Verfügung standen.

Jeweils zwei Proben jeder Sorte wurden vor der Verwendung mit BSA blockiert (siehe 5.4.1.2). Je eine Probe der PEGMA-Träger wurden vor der Versuchsdurchführung mit ATP blockiert (siehe 5.4.1.3). Für den Assay wurden 5 µl [γ -³²P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) und 95 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung gemischt. Die resultierende Lösung wurde 1:10 mit Magnesiumacetat/HEPES-Lösung verdünnt. Als Kinaselösung wurde für die PKA eine Lösung der Konzentration 0,1µg/µl vorbereitet. Es wurden

1. 20 µl 5X Reaktionspuffer, 10 µl Kinaselösung, 30 µl dest. Wasser, 40 µl [γ -³²P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 900 µl Verdünnungspuffer und
2. als Kontrolle wurden 20 µl 5X Reaktionspuffer, 40 µl dest. Wasser, 40 µl [γ -³²P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 900 µl Verdünnungspuffer gemischt.

Jeweils eine der unterschiedlich behandelten Proben wurde mit der Kinaselösung, die jeweils andere mit der Referenzlösung überschichtet. Die Proben wurden 2 h bei 30°C inkubiert. Je eine Probe der PEGMA-Träger, die mit der 1. Lösung behandelt wurden, wurden in einer Lösung bestehend aus 10 µl ATP-Lösung (50 mM) und 2000 µl Phosphorsäure (1 vol.%) 30 min gewaschen. Anschließend wurden alle Proben mehrmals (zweimal 1 min, einmal 30 min und einmal 60 min) mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen. Die Abschnitte wurden mit Aceton abgespült, an der Luft getrocknet und die Signale mittels Autoradiographie detektiert.

Abbildung 29:

Ein gedruckter Array und ein gespotteter Kontrollarray wurden 25 min in einem Gemisch aus 20 µl 5X Reaktionspuffer, 40 µl dest. Wasser, 40 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 900 µl Verdünnungspuffer vorgequollen.

Für den Assay wurden 2,5 µl [γ -³³P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) und 47,5 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung gemischt. Die resultierende Lösung wurde 1:10 mit Magnesiumacetat/HEPES-Lösung verdünnt. Als Kinaselösung wurde für die PKA eine Lösung der Konzentration 0,1µg/µl vorbereitet.

Der feuchte Träger wurde mit einer Lösung aus 20 µl 5X Reaktionspuffer, 10 µl Kinaselösung (PKA), 30 µl dest. Wasser, 40 µl [γ -³³P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 900 µl Verdünnungspuffer überschichtet und 1,5 h bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Proben wurden mehrmals

(zweimal 1 min; dreimal 60 min) mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen und mit Aceton abgespült. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie.

Abbildung 34:

Der synthetisierte Array wurde in vier Teilstücke zerlegt. Für den Assay wurden 2,5 µl [γ - ^{33}P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) und 47,5 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung gemischt. Die resultierende Lösung wurde 1:10 mit Magnesiumacetat/HEPES-Lösung verdünnt. Als Kinaselösung wurde für die PKA eine Lösung der Konzentration 0,1 µg/µl vorbereitet. Es wurden

1. 10 µl 5X Reaktionspuffer, 5 µl Kinaselösung (PKA), 15 µl dest. Wasser, 20 µl [γ - ^{33}P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 450 µl Verdünnungspuffer
2. 10 µl 5X Reaktionspuffer, 15 µl Kinaselösung (c-Src), 5 µl dest. Wasser, 20 µl [γ - ^{33}P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 450 µl Verdünnungspuffer
3. 10 µl 5X Reaktionspuffer, 5 µl Kinaselösung (PKA), 15 µl Kinaselösung (c-Src), 20 µl [γ - ^{33}P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 450 µl Verdünnungspuffer
4. und als Kontrolle wurden 20 µl 5X Reaktionspuffer, 40 µl dest. Wasser, 40 µl [γ - ^{33}P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 900 µl Verdünnungspuffer gemischt.

Jeweils ein Teilstück wurde mit einer dieser Lösungen überschichtet und 2 h bei 30°C geschüttelt. Die Träger wurden nach Ablauf der Reaktionszeit mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült, zweimal 1 h mit einer Lösung aus verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) und NaCl (2 M) gewaschen und nochmals 40 min in verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) geschüttelt. Abschließend wurden die Abschnitte mit Aceton abgespült, an der Luft getrocknet und die Signale mittels Autoradiographie detektiert.

Abbildung 35:

Der mittels des Laserdruckers synthetisierte Array wurde in zwei Teilstücke geteilt. Für den Assay wurden 2,5 µl [γ - ^{32}P]ATP-Lösung (370 MBq/ml) und 47,5 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung gemischt. Die resultierende Lösung wurde 1:10 mit Magnesiumacetat/HEPES-Lösung verdünnt. Als Kinaselösung wurde für die PKA eine Lösung der Konzentration 0,1 µg/µl vorbereitet. Es wurden

1. 10 µl 5X Reaktionspuffer, 5 µl Kinaselösung (PKA), 15 µl dest. Wasser, 20 µl [γ - ^{32}P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 450 µl Verdünnungspuffer und
2. Als Kontrolle 10 µl 5X Reaktionspuffer, 20 µl dest. Wasser, 20 µl [γ - ^{32}P]ATP/Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 450 µl Verdünnungspuffer gemischt.

Jeweils ein Teilstück wurde mit einer dieser Lösungen überschichtet und 2 h bei 30°C geschüttelt. Die Träger wurden nach Ablauf der Reaktionszeit mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült und 1 h mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen. Dann wurden die Teilstücke zweimal 20 min mit dem heißen Natriumcitratpuffer gewaschen, zweimal mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült und zweimal 20 min in einer Guanidiniumhydrochlorid-Lösung kräftig geschüttelt. Abschließend wurden die Abschnitte zweimal (1 min, 60 min) mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen, mit Aceton abgespült und an der Luft getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie.

Abbildung 38:

Für die Umsetzung des mit dem Peptidlaserdruker hergestellten Dekapeptid-Arrays wurde eine Lösung bestehend aus 4 µl [γ - 32 P]ATP-Lösung (370 MBq/ml), 5 ml dest. Wasser, 2 ml Magnesiumacetat/HEPES-Lösung, 360 µl PKA-Lösung (1 U) und 840 µl Verdünnungspuffer hergestellt. Der Array wurde mit der Lösung überschichtet und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Träger wurde nach Ablauf der Reaktionszeit mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült und 1 h mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen. Dann wurden die Teilstücke 30 min mit heißem Natriumcitratpuffer (60°C) und zweimal mit alkalischem Waschpuffer gewaschen. Dann wurde der Träger zweimal mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült und zweimal 30 min in einer Guanidiniumhydrochlorid-Lösung kräftig geschüttelt. Abschließend wurden die Abschnitte zweimal 10 min mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen, mit Aceton abgespült und an der Luft getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie. Um die Signalstärke zu erhöhen wurde der beschriebene Versuchablauf nochmals auf demselben Träger wiederholt.

Abbildung 39:

Für die Umsetzung der gespotteten Proben auf Zellulose, PEGMA- und PEGMA/MMA-Filmen wurde eine Lösung bestehend aus 1 µl [γ - 32 P]ATP-Lösung (370 MBq/ml), 1,25 ml dest. Wasser, 0,5 ml Magnesiumacetat/HEPES-Lösung, 90 µl PKA-Lösung und 210 µl Verdünnungspuffer hergestellt. Die Proben wurde mit der Lösung überschichtet und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Träger mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült und 1 h mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen. Dann wurden Probenträger 30 min mit heißem Natriumcitratpuffer (60°C) und zweimal mit alkalischem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Träger zweimal mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gespült und zweimal 30 min in einer Guanidiniumhydrochlorid-Lösung kräftig geschüttelt. Abschließend wurden die Abschnitte zweimal 10 min mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen, mit Aceton abgespült und an der Luft getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie.

5.4.1.5 Nachweis mittels Pro-Q[®] Diamond Microarray Stain

Für den Nachweis von phosphorylierten Peptiden im Arrayformat wurden 5 µl ATP-Lösung (50 mM) in 495 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung und 5 µl AMP-Lösung (50 mM) in 495 µl Magnesiumacetat/HEPES-Lösung verdünnt. Anschließend wurden folgende Lösungen angesetzt:

1. 5 µl 5X Reaktionspuffer, 6 µl PKA-Lösung, 14 µl dest. Wasser, 12 µl ATP-Lösung, 113 µl Verdünnungspuffer
2. 5 µl 5X Reaktionspuffer, 6 µl PKA-Lösung, 14 µl dest. Wasser, 12 µl AMP-Lösung, 113 µl Verdünnungspuffer
3. 5 µl 5X Reaktionspuffer, 20 µl dest. Wasser, 12 µl ATP-Lösung, 113 µl Verdünnungspuffer
4. 5 µl 5X Reaktionspuffer, 20 µl dest. Wasser, 12 µl AMP-Lösung, 113 µl Verdünnungspuffer
5. 5 µl 5X Reaktionspuffer, 6 µl PKA-Lösung, 26 µl dest. Wasser, 113 µl Verdünnungspuffer
6. 5 µl 5X Reaktionspuffer, 32 µl dest. Wasser, 113 µl Verdünnungspuffer

Der Träger wurde durch Aufbringen eines Flexiperm-Halters in sechs Reaktionsräume unterteilt. Pro Reaktionsraum wurde eine Kinaselösung aufgebracht. Der Flexiperm-Halter wurde durch einen Objektträger abgedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Träger 1 h unter kräftigem Schütteln mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen. Anschließend wurde der Träger 30 min mit dem heißen Natriumcitrat-Puffer, 5 min mit 1 %iger Phosphorsäure, 30 min mit der mit der Guanidiniumhydrochlorid-Lösung, 5 min mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%), 30 min mit alkalischem TBS-Puffer und nochmals 5 min mit verdünnter Phosphorsäure (1 vol.%) gewaschen. Dann wurde der Träger mehrfach mit dest. Wasser gespült, das Wasser entfernt und in jeden Reaktionsraum ca. 50 µl *Phosphoprotein/Phosphopeptide Microarray Stain (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland)* pipettiert. Der Träger wurde lichtgeschützt verpackt und mit dem Farbstoff für 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Träger mit Destain solution (*Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland*) zweimal 15 min und zweimal 2 min im Ultraschallbad gewaschen. Abschließend wurde der Träger mit dest. Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte im *GenePix® 4000B*-Fluoreszenzscanner.

5.4.2 Metallionen-bindende katalytisch aktive Peptide und Peptidderivate

Die Versuchsbedingungen zur Detektion von Metallionen-bindenden und katalytisch aktiven Peptiden und Peptidderivaten wurden mehrfach variiert, um optimale Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Hier sind typische Beschreibungen aufgeführt, die zu den dargestellten Ergebnissen in Kapitel 2.3 führten.

5.4.2.1 BCIP-Assay

Die Objektträger mit den gebundenen Peptiden (Ac-WGGWGGWGGWF; Ac-SGGSGGSGGHF) und Referenzträger (PEGMA-Träger; Ac-PEGMA-Träger) wurden in kleinere Stücke (ca. 0,5 x 2 cm) zerteilt und in unterschiedlichen wässrigen Metallsalz-Lösungen inkubiert. Dazu wurden ZrCl₄, CuCl₂, EuCl₃, ZnCl₂ und FeCl₃ (je 0,1 µM) in EPPS-Puffer (10 mM, pH 8) gelöst. Je ein Abschnitt der unterschiedlichen Probenabschnitte wurde in 2 ml einer der gepufferten Metallsalzlösungen oder in Pufferlösung als Referenz inkubiert. Nach 2 h wurden 100 µl einer Lösung aus 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, 15 mM) in EPPS-Puffer (10 mM) zugegeben und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Dabei blieben die Reaktionsgefäße geöffnet, um eine Oxidation durch den Luftsauerstoff zu gewährleisten. Die Trägerabschnitte wurden im Luftstrom getrocknet und die katalytische Aktivität anhand der Blaufärbung detektiert.

5.4.2.2 Berliner-Blau-Assay

Die Träger mit den gebundenen Peptidderivaten (ETQ-pfz und HKR-pfz) und Referenzträger (PEGMA-Träger; Ac-PEGMA-Träger) wurden in kleinere Stücke (ca. 0,5 x 2 cm) zerteilt und in unterschiedlichen wässrigen Metallsalz-Lösungen inkubiert. Dazu wurden ZrCl₄, CuCl₂, EuCl₃, ZnCl₂ und FeCl₃ (je 0,1 µM) in MOPSO-Puffer (0,1 M; pH 7) gelöst. In einer zweiten Lösung wurde das Katalysesubstrat (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-(4-nitrophenyl)-hydrogenphosphat (1

mM) in MOPSO-Puffer (0,1 M; pH 7) gelöst. Je ein Abschnitt der unterschiedlichen Probenabschnitte wurde in einem Gemisch aus 1 ml Metallsalz-Lösung (Referenz: Pufferlösung) und 1 ml Katalysesubstrat-Lösung über Nacht in 2 ml einer der gepufferten Metallsalzlösungen oder nur in Pufferlösung als Referenz inkubiert. Die Trägerabschnitte wurden 15 min in Wasser, 15 min in einem Gemisch aus Wasser und THF (1:1) und 15 min in DMF gewaschen. Dann wurden die Abschnitte dreimal ca. 2 h in einer Lösung aus 10 vol.% Methoxyethylamin in Wasser geschüttelt. Anschließend wurden die Abschnitte mit Wasser, einem Gemisch aus Wasser und THF (1:1) und DMF gewaschen. Danach wurden die Abschnitte dreimal ca. 2 h in einer wässrigen 10 %igen EDTA-Lösung inkubiert. Die Träger wurden wiederum mit Wasser, einem Gemisch aus Wasser und THF (1:1) und DMF gewaschen und anschließend in einer 1 %igen NaOH-Lösung (pH 11) über Nacht inkubiert. Die Träger wurden anschließend mit Wasser, einem Gemisch aus Wasser und THF (1:1), DMF und zweimal 2 min mit Wasser gewaschen. Für den Nachweis wurden 50 ml einer frisch hergestellten 1 %igen Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung und 50 ml einer frisch hergestellten 7,5 %igen Eisen(III)chlorid-Lösung gemischt und die Abschnitte sofort mit der resultierenden Lösung 20 min inkubiert. Abschließend wurden die Proben zweimal 2 min mit Wasser gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die katalytische Umsetzung wurde anhand der Blaufärbung der Abschnitte detektiert.

5.4.2.3 Kresylviolett-Assay

Träger mit den gebundenen Peptidderivaten (HKH-pas und QTE-pas) und Referenzträger (PEGMA-Träger; Ac-PEGMA-Träger) wurden in kleinere Stücke (ca. 0,5 x 2 cm) zerteilt und in unterschiedlichen wässrigen Metallsalz-Lösungen inkubiert. Dazu wurden $ZrCl_4$, $CuCl_2$, $EuCl_3$, $ZnCl_2$ und $FeCl_3$ (je 0,1 μM) in EPPS-Puffer (10 mM; pH 8) gelöst. In einer zweiten Lösung wurde das Katalysesubstrat Bis(p-nitrophenyl)phosphat Natriumsalz (2 M) in EPPS-Puffer (10 mM; pH 8) gelöst. Je ein Abschnitt der unterschiedlichen Probenabschnitte wurde in einem Gemisch aus 1 ml Metallsalz-Lösung (Referenz: Pufferlösung) und 1 ml Katalysesubstrat-Lösung über Nacht inkubiert. Die Trägerabschnitte wurden 15 min in Wasser, 15 min in einem Gemisch aus Wasser und THF (1:1) und 15 min in DMF gewaschen. Dann wurden die Abschnitte dreimal ca. 2 h in einer Lösung aus 10 vol.% Methoxyethylamin in Wasser geschüttelt. Anschließend wurden die Abschnitte mit Wasser, einem Gemisch aus Wasser und THF (1:1) und DMF gewaschen. Für den Nachweis wurden 100 mg Kresylviolettacetat in 200 ml Wasser 30 min gemischt. Die Lösung wurde filtriert und die Abschnitte in jeweils 8 ml des Filtrates 1 h inkubiert. Abschließend wurden die Proben zweimal 2 min mit Wasser gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die katalytische Umsetzung wurde anhand der Rotfärbung der Abschnitte detektiert.

5.4.3 Nachweis von Metallopeptiden

5.4.3.1 Nachweis von Ni(II)-bindenden Peptiden

Träger mit den gebundenen Peptidderivaten (DAH und EAY) und Referenzträger (PEGMA-Träger; Ac-PEGMA-Träger) wurden in kleinere Stücke (ca. 0,5 x 2 cm) zerteilt. Für den Nachweis von Ni^{2+} -

bindenden Peptiden wurden die Trägerabschnitte mit einer Lösung aus Nickel(II)acetat (5 mM) in Methanol überschichtet und unter leichtem Schütteln 2 h inkubiert. Die Träger wurden zweimal 5 min mit MeOH, einmal 5 min mit einer Lösung aus Essigsäure (10 mM) in DMF und zweimal 5 min mit MeOH gewaschen. Anschließend wurden die Träger getrocknet und mit einer gesättigten Lösung von Dimethylglyoxim in MeOH überschichtet. Nachdem das Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdampft war, konnte die Ni²⁺-Bindung anhand der Rotfärbung der Träger detektiert werden.

5.4.3.2 Nachweis von [Re(CO)₃]⁺-bindenden Peptiden

Träger mit den gebundenen Peptiden (HHHHHH und TGGYGG) und Referenzträger (PEGMA-Ac) wurden 30 min in PBS-Puffer (pH 7,4) vorgequollen. Anschließend wurden die Träger 1 h bei 100°C in der Schutzgasatmosphäre in einer Lösung aus [Re(H₂O)₃(CO)₃]Br (10 mM) in PBS-Puffer (pH 7,4) inkubiert. Die Abschnitte wurden dreimal 5 min in PBS-Puffer gewaschen und zweimal mit Wasser gespült. Dann wurden die Träger 30 min in DMF vorgequollen und 1 h in einer Lösung aus 5 vol.% Ethylendiamin in DMF gewaschen. Die Träger wurden zweimal 5 min mit DMF gewaschen und zweimal mit MeOH gespült und im Luftstrom getrocknet. Abschließend wurden die Träger mit verschiedenen Aminosäurelösungen bei 37°C gewaschen. Als Aminosäurelösungen wurde

1. Histidin (10 mM),
2. Cystein (10 mM) und
3. Histidin (10 mM) und Cystein (10 mM) in PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst.

Die Träger wurden mit den frisch hergestellten Lösungen entweder nur 1 h oder 16 h über Nacht gewaschen. Abschließend wurden alle Abschnitte nochmals mit PBS-Puffer, zweimal 2 min mit Wasser und zweimal 2 min mit MeOH gewaschen. Die Proben wurden im Luftstrom getrocknet und mittels Ellipsometrie oder XP-Spektroskopie analysiert.

PBS-Puffer: 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 10,4 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,4

5.4.3.3 Nachweis von [^{99m}Tc(CO)₃]⁺-bindenden Peptiden

Die synthetisierten Peptidarrays wurden 30 min in 200 ml PBS-Puffer (pH 7,4) vorgequollen. In der Zwischenzeit wurden ca. 2,6 GBq (ca. 1 ml) frisch eluiertes Pertechnetat in physiologischer Kochsalzlösung in den *IsoLink*[®] Generator injiziert. Der Generator wurde 20 min bei 90°C im Wasserbad erhitzt, wobei das Pertechnetat in den [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Komplex überführt wurde. Anschließend wurden 200 ml PBS-Puffer mit 0,5 ml (ca. 1,3 GBq) der [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Lösung versetzt und der vorgequollene Peptidarray unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 30 min wurde der Array entnommen und dreimal 10 min mit PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Pro Waschschrift wurden ca. 200 ml des jeweiligen Reaktanden eingesetzt. Der Array wurde zweimal mit MeOH gespült and 30 min in DMF gewaschen unter starkem Schütteln. Anschließend wurde zweimal 30 min mit einer Lösung aus 5 vol.% Ethylendiamin in DMF gewaschen. Die Träger wurden zweimal mit DMF und zweimal mit MeOH gespült und 30 min wiederum in PBS-Puffer (pH 7,4) vorgequollen. Anschließend wurde der Array zweimal 30 min mit einer frisch angesetzten Lösung aus L-Histidin (10 mM) und L-Cystein (10 mM) in PBS-Puffer (pH 7,4) unter starkem Schütteln gewaschen. Abschließend wurde der

Array zweimal mit PBS-Puffer gespült, zweimal mit Wasser und zweimal ca. 5 min mit MeOH gewaschen. Der Array wurde an der Luft getrocknet und die Signale mittels Autoradiographie (Expositionszeit 6 h) detektiert.

5.4.3.4 Nachweis von $^{99m}\text{TcO}_3^+$ - und $^{99m}\text{TcO}_4^+$ -bindenden Peptiden

Die synthetisierten Peptidarrays wurden 30 min in 200 ml PBS-Puffer (pH 7,4) vorgequollen. In der Zwischenzeit wurden 4,8 GBq frisch eluiertes Per technetat in physiologischer Kochsalzlösung mit 2 ml einer 0,1 M wässrigen Kaliumgluconsäurelösung gemischt. Dieses Gemisch wurde mit 10 μl einer frisch präparierten Lösung aus SnCl_2 (25 mM) in 0,1 M HCl versetzt. Dabei wurde das Per technetat in den stabilisierten $^{99m}\text{TcO}_3^+$ -Komplex bei Raumtemperatur innerhalb von ca. 15 min überführt. Anschließend wurden 200 ml PBS-Puffer mit 1 ml der $^{99m}\text{TcO}_3^+$ -Lösung (ca. 1,2 GBq) versetzt und der vorgequollene Peptidarray unter leichtem Schütteln inkubiert. Ein weiterer Array wurde in 200 ml PBS-Puffer inkubiert, der ca. 1,2 GBq der Per technetatlösung in physiologischer Kochsalzlösung enthielt (Negativkontrolle). Nach 30 min wurden die Arrays entnommen und dreimal mit PBS-Puffer (pH 7,4, 200 ml) gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Signale wurden mittels Autoradiographie (Expositionszeit 6 h) ermittelt.

5.4.4 Antikörperbindungstudien

5.4.4.1 Inkubation mit spezifischen und fluoreszenzmarkierten sekundären

Antikörpern

Die Mikrochips oder Objektträger mit den kovalent gebundenen Epitopen oder Phosphopeptiden wurden zunächst in Waschpuffer (50 mM Tris; 350 mM NaCl; pH 7,4) vorgequollen. Die spezifischen Antikörper wurden in TBST-Puffer (50 mM Tris; 0,1 vol.% Tween 20[®]; 350 mM NaCl; pH 7,4) 1:500 oder 1:1000 verdünnt. Der Waschpuffer wurde entfernt und die Trägermatrix mit der Antikörperlösung überschichtet. Nach 1 h Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung entfernt und die Trägermatrix sechsmal 5 min abwechselnd mit dem Waschpuffer und dem Inkubationspuffer unter starkem Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper in TBST-Puffer 1:1000 verdünnt. Nach 1 h Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung wiederum entfernt und die Trägermatrix sechsmal 5 min abwechselnd mit dem Waschpuffer und dem Inkubationspuffer unter starkem Schütteln gewaschen ggf. wurden die Träger noch einmal mit dest. Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte im *GenePix*[®] 4000B-Fluoreszenzscanner.

6 Literatur

Affymetrix : www.affymetrix.com

Albericio, F.; *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 211-221

Albericio, F.; *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 123-139

Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Najera, C.; *Organic Preparations and Procedures International* **2001**, *33*, 203-303

Alberto, R.; Schibli, R.; Waibel, R.; Abram, U.; Schubiger, A. P.; *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *901*, 190-192

Alberto, R.; Pak, J. K.; van Staveren, D.; Mundwiler, S.; Benny, P. D.; *Biopolymers (Peptide Science)* **2004**, *76*, 324-333

Alberto, R.; Welch, M. J.; *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2003**, *30*, 1299-1302

Allende, J. E.; Allende, C. C.; *The FASB Journal* **1995**, *9*, 313-323

Anderson, J. H.; *The Journal of Imaging Science and Technology* **2000**, *44*, 534-543

Applied Biosystems:

http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologies/Proteomics/PeptideSynthesis/index.htm

Bairoch, A.; Apweiler, R.; *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 1, 45-48

Balachandra, A. M.; Baker, G. L.; Bruening, M. L.; *Journal of Membrane Science* **2003**, *227*, 1-14

Basso, A.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P.; *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2006**, *81*, 1626-1640

Beier, M.; Hoheisel, J. D.; *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, e11

Berkessel, A.; Héroult, D. A.; *Angewandte Chemie International. Edition* **1999**, *38*, 1/2, 102-105

Berkessel, A.; Riedl, R.; *Journal of Combinatorial Chemistry* **2000**, *2*, 215-219

Berkessel, A.; *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 409-419

Beyer, M.; Felgenhauer, T.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; Stadler, V.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 3505-3514

Beyer, M.; Dissertation **2005**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Beyer, M.; Nesterov, A.; Block, I.; König, K.; Felgenhauer, T.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Torralba, G.; Hausmann, M.; Trunk, U.; Lindenstruth, V.; Bischoff, F. R.; Stadler, V.; Breitling, F.; *Science* **2007**, *318*, 1888

Blackwell, H. E.; *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 203-212

Bossemeyer, D.; *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **1995**, *369*, 57-61

Bradford, M. M.; *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.

Brantley, E. L.; *Dissertation* **2005**, Faculty of the Graduate School of Vanderbilt University Nashville, Tennessee, USA

Brookhaven-Generator: <http://www.bnl.gov/bnlweb/history/Tc-99m.asp>

Bruus-Jensen, K.; *Dissertation* **2005**, Technische Universität München

Bülle, J.; Hüttermann, A.; „Das Basiswissen der organischen Chemie“ **2000**, Stuttgart, Georg Thieme Verlag

Campbell, N. A.; „Biologie“, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum, Akademischer Verlag **1997**

Camperi, S. A.; Marani, M. M.; Iannucci, N.B.; Cotè, S.; Albericio, F.; Cascone, O.; *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 1561-1564

Carpino, L. A.; *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4397-4398

Carpino, L. A.; Xia, J.; El-Faham, A.; *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 54-61

Carpino, L. A.; Han, G. Y.; *Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3404

Cauchy, A. L.; *Bulletin des Sciences Mathématiques* **1830**, *14*, 6-10

Cezari, M. H. S., Juliano, L.; *Peptide Research* **1996**, *9* (2),88-91

Chan, W. C.; White, P. D.; „Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis- A Practical Approach“ **2000**, The practical Approach series, Oxford University Press

Comagic, S.; *Dissertation* **2004**, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Compton, S. J., Jones, C. G.; *Analytical Biochemistry* **1985**, *151*, 369–374.

Cook, K. L.; Sayler, G. S.; *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 311-318

Cook, P. F.; Neville, M. E.; Vrana, K. E.; Hartl, F. T.; Roskoski, R. ; *Biochemistry* **1982**, *21*(23), 5794-5799

de Silva, S.; de Silva, R. M.; de Silva, K. M. N. ; *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2004**, *711*, 73-81

Dikmans, A.; Beutling, U.; Schmeisser, E.; Thiele, S.; Frank, R.; *QSAR & Combinatorial Science* **2006**, *25*, 1069-1080

Dilworth, J. R.; Parrot, S. J.; *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 43-55

Dirscherl, G.; König, B.; *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 597-634

Dittrich, F.; Tegge, W.; Frank, R.; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 2351-2356

Eggenweiler, H.-M.; *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 12, 552-560

Eichler, J.; *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2005**, *8*, 135-143

Eichler, J. ; Bienert, M. ; Stierandova, A. ; Lebl, M.; *Peptide Research* **1991**, *4*, 296-307

Engh, R. A.; Bossemeyer, D.; *Advances in Enzyme Regulation* **2001**, *41*, 121-149

Europractice Konsortium: <http://www.europractice-ic.com/>

Felgenhauer, T.; Stadler, V.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; *Biospektrum* **2008**, *02.08*, 2-4

Feng, W.; Chen, R.; Brash, J. L.; Zhu, S.; *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 1383-1388.

- Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D.; *Science*, **1991**, *251*, 767-773
- Francis, M. B.; Finney, N. S.; Jacobsen, E. N.; *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 8983-8984
- Francis, M. B.; Jacobsen, E. N.; *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 937-941
- Frank, R.; *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2002a**, *5*, 429-440
- Frank, R.; *Journal of Immunological Methods* **2002b**, *267*, 13-26
- Frank, R.; *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232
- Furka, A.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G.; *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, *37*, 487-493
- Gao, X.; Zhou, X.; Gulari, E.; *Proteomics* **2003**, *3*, 2135-2141
- Garber, K.; *Nature Biotechnology* **2006**, *24*, 2, 2006
- Gizzi, P.; Henry, B.; Rubini, P.; Giroux, S.; Wenger, E.; *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, *99*, 1182-1192
- Greene, T. W.; Wuts, P.G.M.; "Protective Groups inorganic synthesis – third edition" **1999**, John Wiley & Sons, Inc.
- Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M.; *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 2091-2157
- Halling, P. J.; Ulijn, R. V.; Flitsch, S. L.; *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 385-392
- Hanks, S. K.; Hunter, T., *The FASEB Journal* **1995**, *9*, 576-595
- Harford, C.; Sarkar B.; *Accounts of Chemical Research* **1997**, *30*, 123-130
- Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H.; *Nature* **1991**, *354*, 84-86
- Houghten, R. A.; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 5131-5135; US Patent 4.631.211
- Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Giulianotti, M. A.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Nefzi, A.; Ostresh, J. M.; Yu, Y.; Maggiora, G. M.; Medina-Franco, J. L.; Brunner, D.; Schneider, J.; *Journal of Combinatorial Chemistry* **2008**, *10*, 3-19
- Houseman, B. T.; Huh, J. H.; Kron, S. J.; Mrksich, M.; *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 270-274
- Institut für Mikroelektronik, Stuttgart* : <http://www.ims-chips.de/>
- Intavis AG* : http://www.intavis.com/en/Custom_Peptide_Synthesis/peptidearrays/index.php
- International Humane Genome Sequencing Consortium, *Nature*, **2001**, *409*, 860
- Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; de Gennes, P. G.; *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142* (1), 149-158
- Jeon, S. I.; Andrade, J. D.; *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142* (1), 159-166
- JPT Peptide Technologies GmbH*: http://www.jpt.com/products/peptide_arrays/peptide_arrays.htm
- Johnson, D. A.; Akamine, P.; Radzio-Andzelm, E.; Taylor, M.; Taylor, S. S.; *Chemical*

Reviews **2001**, 101, 2243-2270

Johnson, L. N.; Noble, M. E. M.; Owen, D. J.; *Cell* **1996**, 85, 149-158

Jones, J.; "Amino Acid and Peptide Synthesis - second edition", Oxford University Press, **2002**

Jurisson, S. S.; Lydon, J. D. ; *Chemical Reviews* 1999, 99, 2205-2218

Kaim, W.; Schwederski, B.; „Bioanorganische Chemie“, 2. Auflage **1995**, Stuttgart: Teubner, (Teubner-Studienbücher: Chemie)

Kalume, D. E.; Molina, H.; Pandey, A.; *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7, 64-69

Karavelas, T. ; Mylonas, M. ; Malandrinou, G. ; Plakatouras, J. C. ; Hadjiliadis, N. ; Mlynarz, P.; Kozlowski, H. ; *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, 99, 606-615

Kawagishi, Y.; Ishida, Y.; Ishikawa, K.; (Orient Chemical Ind.) US 4404271A1, **1983**

Kemp, B. E.; Pearson, R.B.; *Trends in Biochemical Science* **1990**,15(9), 342-346

Kenelly, P. J.; Krebs, E. G.; *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 24, 15555-15558

Knippers, R.; "Molekulare Genetik", 8. Auflage **2001**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Kobe, B.; Kampmann, T.; Forwood, J. K.; Listwan, P.; Brinkworth, R. I.; *Biochemica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* **2005**, 1754, 200-209

Köhn, F.; *Diplomarbeit* **1998**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

König, K.; *Diplomarbeit* **2005**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Kramer, A.; Schuster, A.; Reineke, U.; Malin, R.; Volkmer-Engert, R.; Landgraf, C.; Schneider-Mergener, J.; *Methods: a Companion to Methods in Enzymology* **1994**, 6, 388-395

Kreepipuu, A.; Blom, N.; Brunak, S.; *Nucleic Acids Research* **1999**, 27, 1, Seiten fehlen...

Kuijpers, W. H. A.; Kaspersen, F. M.; Veeneman, G. H.; Van Boeckel, C. A. A.; Bos, E. S.; *Bioconjugate Chemistry* **1993**, 4, 94-102

Laemmli, U. K.; *Nature* **1970**, 227(259), 680-685.

Lam, K.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J.; *Nature* **1991**, 354, 84

Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnak, V.; *Chemical Reviews* **1997**, 97, 411-448

Latscha, H. P.; Klein, H. A.; „Organische Chemie, Chemie-Basiswissen, 4. Auflage **1997**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Laurent, R. Haddoub, S.L. Flitsch, *Trends in Biotechnology* **2008**, 26 (6), 328-337

Lazarova, N.; James, S.; Babich, J.; Zubieta, J.; *Inorganic Chemistry Communications* **2004**, 7, 1023-1026

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; „Prinzipien der Biochemie“, 2. Auflage **1998**, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag

Li, C. P.; Proctor, Hercules, D. M.; *Applied Spectroscopy* **1984**, 38, 880-886.

Licini, G.; Scrimin, P.; *Angewandte Chemie* **2003**, 115, 4720-4723

- Liu, S.; Edwards, D. S.; *Chemical Reviews* **1999**, 99, 9, 2235-2268
- Malin, R.; Steinbrecher, R.; Jannsen, J.; Semmler, W.; Noll, B.; Johannsen, B.; Frömmel, C.; Höhne, W.; Schneider-Mergener, J.; *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 11821-11822
- Martin, K.; Steinberg, T. H.; Cooley, L. A.; Gee, K. R.; Beechem, J. M.; Patton, W. F.; *Proteomics* **2003**, 3, 1244-1255
- Martin, K.; Steinberg, T. H.; Goodman, T.; Schulenberg, B.; Kilgore, J. A.; Gee, K. R.; Beechem, J. M.; Patton, W. F.; *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screenin*, **2003**, 6, 331-339
- Merrifield, R. B.; *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154
- Merrifield, R. B.; *Journal of the American Chemical Society* **1964**, 86, 304
- Min, D.-H.; Mrksich, M.; *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, 8, 554-558
- Mitchell, A. R.; *Peptide Science* **2008**, 90, 175-184
- Multisyntech*: <http://www.multisyntech.de/>
- Nesterov-Müller, A.; *Dissertation* **2006**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Nesterov, A.; König, K.; Felgenhauer, S.; Lindenstruth, V.; Trunk, U.; Fernandez, S.; Hausmann, M.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; Stadler, V.; *Review of Scientific Instruments* **2008**, 79 (3), 35106
- Nesterov, A.; Löffler, F.; König, K.; Trunk, U.; Leibe, K.; Felgenhauer, T.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; Lindenstruth, V.; Stadler, V.; Hausmann, M.; *Journal of Physics D – Applied Physics* **2007**, 40(19), 6115-6120
- Nunc*: <http://www.nuncbrand.com/de/page.aspx?ID=1349>
- Okarvi, S. M.; *Cancer Treatment Reviews* **2008**, 34, 13-26
- ON Semiconductors*[®]: <http://www.amis.com/>
- Pai, D. M.; Sprigett, B. E.; *Reviews of Modern Physics* **1993**, 65, 163-211
- Panicker, R. C.; Huang, X.; Yao, S. Q.; *Combinatorial chemistry & High Throughput Screenings* **2004**, 7, 547-556
- Panse, S.; Dong, L.; Burian, A.; Carus, R.; Schutkowski, M.; Reimer, U.; Schneider-Mergener, J.; *Molecular diversity* **2004**, 8, 291-299
- Pellois, J. P.; Zhou, X.; Srivannavit, O.; Zhou, T.; Gulari, E.; Gao, X.; *Nature Biotechnology* **2002**, 20, 922-926
- Pepscan Systems*: <http://www.pepscanpresto.com/>
- Proteinkinasen*: http://www.proteinkinase.info/Proteinkinase_Familie/proteinkinase_familie.htm
- Reents, R.; Jeyarai, D. A.; Waldmann, H.; *Adanced Synthesis & Cataysis* **2001**, 343, No.6-7, 501-513
- Reimer, U.; Reineke, U.; Schneider-Mergener, J.; *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, 315-320
- Reineke, R.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J.; *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, 12, 559-564
- Riedl, R.; *Dissertation* **1998**, Universität Köln
- Rink, H.; *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, 3787

- Sasikumar, P. G.; Kumar, K. S.; Rajasekharan Pillai, V. N.; *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, *92*, 288-294
- Schibli, R.; Schubiger, P. A.; *European Journal of Nuclear Medicine* **2002**, *29* (11), 1529-1542
- Schirwitz, C., *Diplomarbeit* **2008**, Philipps-Universität Marburg
- Schott: http://www.schott.com/nexterion/english/products/coated_substrates/slide_a/index.html
- Schutkowski, M.; Reimer, U.; Panse, S.; Dong, L.; Lizcano, J. M.; Alessi, D. R.; Schneider-Mergener, J.; *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 2671-2674
- Schutkowski, M.; Reineke, U.; Reimer, U.; *ChemBioChem* **2005**, *6*, 513-521
- Schwartz, D.; Gygi, S. P.; *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 11
- Scofield, J. H.; *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, *8*(2), 129-137
- Scott, P. J. H.; Steel, P. G.; *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 2251-5568
- Sicheri, F.; Kuriyan, J.; *Current Opinion in Structural Biology* **1997**, *7*, 777-785
- Smith, G. P.; Petrenko, V. A.; *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 391-410
- Songyang, Z.; Carraway III, K. L.; Eck, M. J.; Harrison, S. C.; Feldman, R. A.; Mohammadi, M.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R.; Smith, D. P.; Eng, C.; Lorenzo, M. J.; Ponder, B. A. J.; Mayer, B. J.; Cantley, C. L.; *Nature* **1995**, 539-543
- Stadler, V.; Felgenhauer, F.; Beyer, M.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Güttler, S.; Gröning, M.; König, K.; Torralba, G.; Hausmann, M.; Lindenstruth, V.; Nesterov, A.; Block, I.; Pipkorn, R.; Poustka, A.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; *Angewandte Chemie International Edition* **2008a**, *47*(37), 7132-7135
- Stadler, V.; Beyer, M.; König, K.; Nesterov, A.; Torralba, G.; Lindenstruth, V.; Hausmann, M.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; *Journal of Proteome Research* **2007**, *6*, 3197-3202
- Stadler, V.; Kirmse, R.; Beyer, M.; Breitling, F.; Ludwig, T.; Bischoff, F. R.; *Langmuir* **2008b**, *25* (15), 8151-5157
- Strähle, J.; Schweda, E.; „Jander–Blasius-Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum“, 14. Auflage **1995**, Hirzel Verlag, Stuttgart
- Taylor, S. S.; Kim, C.; Vigil, D.; Haste, N. M.; Yang, J.; Wu, J.; Anand, G. S.; *Biochemica et Biophysica Acta – Proteins & Proteomics* **2005**, *1754*, 1-2, 25-37
- Tegge, W.; Frank, R.; Hofmann, F.; Dostmann, W. R. G.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 10569-10577
- Thomas J. O, Kornberg R. D.; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1975**, *72*(7), 2626-30.
- TU Dresden: <http://www.ihm.tu-dresden.de/>
- van Staveren, D.; Mundwiler, S.; Hoffmanns, U.; Pak, J. K.; Spingler, B.; Metzler-Nolte, N.; Alberto, R.; *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 2593-2603
- van Staveren, D. R.; Benny, P. D.; Waibel, R.; Kurz, P.; Pak, J. K.; Alberto, R.; *Helvetica Chimica Acta* **2005**, *88*, 447-460
- Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finnern, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli, A.; Abram, U.; Mach, J.-P.; Plückthun, A.; Schubiger, P.A.; *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 897-901

- Walsh, D. A.; Perkins, J. P.; Krebs, E. G.; *The Journal of Biological Chemistry* **1968**, *243*, 3763
- Walsh, D. P.; Chang, Y. T.; *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2004**, *7*, 557-564
- Wang, J. S.; Matyjaszewski, K. J.; *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5614-5615
- Wang, P.; Tan, K. L.; Kang, E. T.; Neoh, K. G.; *Journal of Material Chemistry* **2001**, *11*, 2951-2957
- Wang, S. S.; Merrifield, R. B.; *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 6488
- Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Brudel, M.; Winter, R.; Schümann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M.; *Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3275-3280
- Winter, M. J.; „Konzepte der Übergangsmetallchemie“, Basistext Chemie, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH, **1996**
- Xing, G.; DeRose, V. J.; *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5*, 196-200
- Xu, F. J.; Zhong, S. P.; Yung, L. Y. L.; Kang, E. T.; Neoh, K. G.; *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2392-2403.
- Xu, D.; Yu, D. H.; Kang, E. T.; Neoh, K. G.; *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *279*, 78-87
- Yaffe, M. B.; Leparc, G. G.; Lai, J.; Obata, T.; Volinia, S.; Cantley, L. C.; *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 348-353
- Yeh, J. J.; Lindau, I.; *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **1985**, *32(1)*, 1-155

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abl	Abl Protein Tyrosin Kinase
Abu	4-Aminobutansäure
Ac	Acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aun	11-Aminoundecansäure
βAla	β-Alanin
BCIP	Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
<i>t</i> -Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CKII	Casein Kinase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
c-Src	c-Src Tyrosinkinase (<u>c</u> ellular <u>s</u> ar <u>c</u> oma)
Da	Dalton
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMG	Dimethylglyoxim
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPSO	Di-phenylsulfoxid
DTSO	Di(<i>p</i> -tolyl)-sulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinepropansulfonsäure
ESA	Essigsäureanhydrid
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HDATU	<i>O</i> -(3,4-Dihydro-4-oxo-5-azabenzo-1,2,3-triazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HDTU	<i>O</i> -(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HODhat	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzo-1,2,3-triazin
HODhbt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MOPSO	β -Hydroxy-4-morpholinepropansulfosäure
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulphonyl
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDFA	Piperidin-Dibenzofulven-Addukt
PEG	Poly(ethylenglykol)methacrylat
PEGMA-Ac	Poly(ethylenglykol)methacrylat, aminoterminiert und acetyliert
PEGMA-Abu	Poly(ethylenglykol)methacrylat, aminoterminiert mit Abu
PEGMA-Aun	Poly(ethylenglykol)methacrylat, aminoterminiert mit Aun
PEGMA- β Ala	Poly(ethylenglykol)methacrylat, aminoterminiert mit β Ala
PEGMA- β Ala ₃	Poly(ethylenglykol)methacrylat, aminoterminiert mit β Ala- β Ala- β Ala
PEGMA-OH	Poly(ethylenglykol), hydroxyterminiert
Pfp	Pentafluorphenyl
PKA	katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase
PMDETA	<i>N,N,N,N,N</i> -Pentamethyldiethylentriamin
MMA	Methylmethacrylat
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium Hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium Hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
SCC	Citratgepufferte Kochsalzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexa-1-carbonsäure
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween [®] 20
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Tetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>t</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TGMME	Triethylenglycolmonomethylether
TIBS	Triisobutylsilan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
vol. %	Volumenprozent
w.E.	Willkürliche Einheiten
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Für die Aminosäuren verwendete Ein- und Dreibuchstabencodes:

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

Publikationen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits vorgestellt oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Beyer, M., Nesterov, A., Block, I., König, K., Felgenhauer, T., Fernandez, S., Leibe, K., Torralba, G., Hausmann, M., Trunk, U., Lindenstruth, V., Bischoff, F.R., Stadler, V., Breitling, F.; Combinatorial synthesis of peptide arrays onto a microchip, *Science* 2007, 318, 1888

Stadler, V., Felgenhauer, T., Beyer, M., Fernandez, S., Leibe, K., Güttler, Gröning, M., König, K., Torralba, G., Hausmann, M., Lindenstruth, V., Nesterov, A., Block, I., Pipkorn, R., Poustka, A., Bischoff, F.R., Breitling, F.; Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer, *Angewandte Chemie International Edition* 2008, 47, 7132-7135

Auf den folgenden Veranstaltungen wurden Poster mit den angegebenen Titeln präsentiert:

“A novel peptide array support resisting non-specific protein adsorption”

Retreat of the DKFZ: Research Program Functional and Structural Genomics

Heilbronn, 2.11 - 3.11.2006

“Synthesis of high density peptide arrays using a laser printer”

Retreat of the DKFZ: Research Program Functional and Structural Genomics

Heilbronn, 18.11 - 20.11.2007

“High Complexity peptide Libraries on a microchip”

Chemical Genomics Workshop

Braunschweig, 5.03. - 6.03. 2007

“High complexity peptide arrays – a novel approach”

Single-molecule Spectroscopy meets Chip-Technology

Heidelberg, 18.10. - 20.10. 2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich fachlich oder persönlich unterstützt haben und damit zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Mein Dank geht an Dr. Volker Stadler, PD Dr. F.R. Bischoff und PD Dr. Frank Breitling, die mir in ihrer Arbeitsgruppe am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten und durch Ihre Betreuung, Anregungen und Hilfestellungen zum Gelingen dieser Arbeit beitragen. Ebenso möchte ich Prof. M. Hausmann und Prof. V. Lindenstruth am Kirchhoff-Institut für Physik danken, die mich insbesondere im letzten Jahr unterstützten und mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Ich danke Prof. Dr. N. Metzler-Nolte für die Betreuung dieser Dissertation und die zahlreichen Anregungen und Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Kollegen in der Arbeitsgruppe „Chip-Basierte Peptidbibliotheken“, die mich hier sehr herzlich aufgenommen haben und mich mit Rat und Tat auf vielfältigste Weise unterstützten. Dipl. Ing. K. Leibe danke ich für seine Hilfestellung bei der Synthese mit dem Peptidlaserdrucker und sein Geschick bei der Konstruktion und dem Bau von Zubehör. Dr. S. Fernandez, Dr. T. Felgenhauer, D. Rambow und J. Kretschmer danke ich für die Unterstützung bei der Arraysynthese und die unaufhörliche Produktion von Aminosäurepartikeln. PD Dr. A. Nesterov-Müller und Dipl. Phys. K. König danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Realisierung der Peptidsynthese auf den Mikrochips. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle sowohl an Dipl. Chem. C. Schirwitz für die kollegiale Zusammenarbeit im Labor als auch an Dipl. Biotech. D. Deppe und M. Sohindrio für ihre Unterstützung in biologischen Fragestellungen.

Ebenso möchte ich mich bei den ehemaligen Mitglieder Dr. M. Beyer, D. Freidank und T. Kühlwein bedanken, die mich bei den chemischen Synthese und den Oberflächenmodifikationen tatkräftig unterstützten.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe „The Peptide Chip“ am Kirchhoff-Institut für Physik an der Universität Heidelberg danke ich für die verschiedenen Anregungen und die tolle Zusammenarbeit. Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. G. Torralba für die Entwicklung des angepassten Analyseprogrammes bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Prof. M. Eisenhut, der mir in seiner Abteilung das Arbeiten mit radioaktivem ^{99m}Techneium ermöglichte und mich dabei betreute.

Ich danke Dr. D. Bossemeyer für die Bereitstellung der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A sowie die erhaltenen Ratschläge und Informationen bezüglich der Proteinkinasen.

Zudem möchte ich Dr. M. Schnölzer für die massenspektrometrischen Analysen und Dr. Pipkorn für seine Hilfestellung bei Fragen zur Peptidsynthese danken. Bei der Abteilung „Molekulare Genomanalyse“ (DKFZ, Heidelberg) unter der Leitung von PD Dr. S. Wiemann (ehemals Prof. Dr. A. Poustka) möchte ich mich für die Möglichkeit zum Arbeiten mit radioaktiven ³³P und ³²P und die Bereitstellung der verschiedenen Scanner bedanken.

Last but not least danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre unentwegte Unterstützung. Im Besonderen danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihren jahrelangen Rückhalt, ihre

Hilfe in allen Lebenslagen, ihre Motivation und ihr Interesse. Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Thorsten bedanken, der mir in den letzten drei Jahren immer zur Seite stand und nicht müde wurde mich zu motivieren. Vielen Dank euch allen!