

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mario Beyer

aus Frankenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2005

Entwicklung und Anwendung neuartiger
Trägeroberflächen
zur kombinatorischen Peptidsynthese
mit Aminosäure-Tonerpartikeln

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Reiner Dahint

PD Dr. rer. nat. Frank Breitling

Die vorliegende Dissertation wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in den Abteilungen „Molekulare Genomanalyse“ und „Chipbasierte Peptidbibliotheken“ angefertigt.

Die Betreuung der Arbeit wurde durch PD Dr. Reiner Dahint von der Angewandten Physikalischen Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg wahrgenommen.

Die Disputation findet an der Fakultät für Chemie und Geowissenschaften der Universität Heidelberg statt.

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

Beyer, M.; Bischoff, R.; Breitling, F.; Felgenhauer, T.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Poustka, A.; Stadler, V. *A novel surface design for laser printer made peptide arrays (Poster)*, 19th American Peptide Symposium, San Diego, 2005.

Beyer, M.; Felgenhauer, T.; Bischoff, R.; Breitling, F.; Stadler, V. *A new glass array support with high functionality resisting non-specific protein adsorption* 2005, Biomaterials, submitted

Mein Dank geht:

an PD Dr. Reiner Dahint aus dem Institut für Angewandte Physikalische Chemie an der Universität Heidelberg (APC) für die ausgezeichnete Betreuung, die mir während der gesamten Zeit zuteil wurde, die damit verbundenen zahlreichen Hinweise und Ratschläge, für das entgegengebrachte Vertrauen und seine Offenheit;

an PD Dr. Frank Breitling aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) für anregende Diskussionen und spannende Ausflüge in die Welt der Biologie, die spontane Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens und für seinen unerschöpflichen Ideenreichtum;

an Dr. Volker Stadler (DKFZ) für seine Geduld und seine Unterstützung beim Erlernen neuer Analysetechniken und Zurechtfinden auf dem Gebiet der Oberflächenchemie;

an PD Dr. Ralf Bischoff (DKFZ) für zahlreiche Denkanstöße, Hilfestellungen im praktischen Experimentieren sowie für eine gemeinschaftliche kritische Auseinandersetzung mit den erzielten Ergebnissen;

an Dr. Simon Fernandez (DKFZ) für sein angewandtes Wissen über die Herstellung von ausgezeichneten Mikropartikeln in allen Formen und Farben, seinen Eifer und seinen Beitrag zur Gewinnung von Aminosäuretonern, sowie für Tips und Tricks im Laboralltag;

an Dipl.-Ing. Klaus Leibe (DKFZ) für sein großartiges technisches Know-how, die damit verbundene Pragmatik, für seine vielen Geistesblitze und für seinen humorvollen Optimismus;

an Dr. Thomas Felgenhauer (DKFZ) für die Analytik der Aminosäuretoner, seine Kenntnisse über Partikelkollektive und den Schatz an Grafiken, Fotos und Datenreihen;

an Alexander Nesterov und an Kai König (beide DKFZ) für ihre herausragenden Leistungen bei der Entwicklung eines zukünftigen Peptidchips und an Ines Block für fleißiges Korrekturlesen;

an unsere technischen Assistenten am DKFZ: Dorothea Boy, Thorsten Kühlwein, Jürgen Kretschmer und Tim Seeberg für ihre ungezählten Synthesen, Inkubationen, Waschprozesse, Messungen, Tonerproduktionen am laufenden Band und für ihre insgesamt tatkräftige Unterstützung!

Ich möchte mich bedanken bei Dr. Rüdiger Pipkorn und Mario Koch für die synthetischen Peptide; bei Dr. Martina Schnölzer und Dr. Tore Kempf für die MALDI-TOF-Messungen und die hilfreichen Anregungen; bei Christian Schmidt für das Spotten der Peptide mit dem Roboter; bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitskreise in der APC: Petra Bucker, Elka Trileva, Svetlana Stoicheva (XPS), Dr. Jaques Blümmel (XPS), Dr. Jörg Fick (Ellipsometrie) und PD Dr. Michael Himmelhaus für die Nutzung der Meßinfrastruktur und

ihre geleistete Hilfe; bei Angelika Seith und Norbert Nieth für ihre Kompetenz in der Messung von Massenspektren und bei Frau Margarete Fischer für ihren zuverlässigen Einsatz bei den NMR-Spektren.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Annemarie Poustka und an ihre Abteilung „Molekulare Genomanalyse“ (DKFZ), in der ich die Hälfte der Zeit unter lauter Biologen gefährliche chemische Experimente durchführen durfte und die nahezu alle meine Sonderwünsche erfüllen konnten. Ich fühlte mich wohl bei euch!

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für die mir zuteilgewordene Unterstützung, das konstante Interesse an meiner Arbeit und die vielen Ermunterungen.

Der Max Buchner-Forschungstiftung bei der DECHEMA gilt mein Dank für die finanziellen Zuwendungen im Rahmen eines Stipendiums.

Außerdem möchte ich Dr. Sandra Lüttgau Danke sagen für die vielen heiteren Stunden fernab jeder Wissenschaft mit Blick über die Rheinebene oder auf acht Rollen quer durch die Felder!

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

7-TCS	7-Octenyltrichlorosilan
18-TCS	Octadecyltrichlorosilan
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
Äq.	Äquivalent(e)
Ar	Aryl
APS	Aminopropylsilan (NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -SiR ₃)
AS	Aminosäure
β-Ala	β-Alanin
BCH	Bicyclohexyl
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPB	Bromphenolblau
br	breites Signal
Bu	Butyl
CyH	Cyclohexan
d	dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DepOAt	Diethoxyphosphinyloxy-7-azabenzotriazol
DepOBt	Diethoxyphosphinyloxybenzotriazol
DepODhbt, DEPBT	3-(Diethoxyphosphinyloxy)-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPF	<i>N,N</i> -Diphenylformamid
DPSO	Diphenylsulfoxid
DtpOAt	1-[Di(<i>o</i> -tolyl)phosphinyloxy]-7-azabenzotriazol
DtpOBt	1-[Di(<i>o</i> -tolyl)phosphinyloxy]benzotriazol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
ESA	Essigsäureanhydrid
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
gef.	gefunden
ges.	gesättigt

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
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
IR	Infrarot-Spektroskopie
<i>J</i>	¹ H-NMR-Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
Lit.	Literatur
m	Multiplett (NMR); mittleres Signal (IR)
M	molar
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
NSu	<i>N</i> -Succinimidyl
OEG	Oligo(ethylenglykol)
o.n.	over night (über Nacht); Angabe der Reaktionszeit, ca. 16 Stunden
OPfp	<i>siehe</i> : Pfp
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDFA	Piperidin-Dibenzofulven-Addukt
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEGMA ₅	Poly(ethylenglykol)-methacrylat, <i>n</i> ~ 5
PEG-OH	Poly(ethylenglykol), hydroxyterminiert
PEG-NH ₂	Poly(ethylenglykol), aminoterminiert
PEG-NH-ac	Poly(ethylenglykol), aminoterminiert und acetyliert
pent.	Pentett
PET	Polyethylenterephthalat
Pfp	Pentafluorphenyl
Ph	Phenyl
PP	Polypropylen
ppm	parts per million

PTFE	Polytetrafluorethylen
PyAOP	7-Azazbenzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium Hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium Hexafluorophosphat
q	Quartett
R	in Molekülstrukturen: unbestimmter organischer Rest
s	Singulett (NMR); stark (IR)
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SG	Schutzgruppe
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluronium Tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIBS	Triisobutylsilan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
w.E.	willkürliche Einheiten

Für die Aminosäuren wurde der Ein- bzw. Dreibuchstabencode verwendet:

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

Kurzfassung

Die Steigerung der Komplexität von Peptidbibliotheken bzw. Peptidarrays ist ein wichtiger Schritt bei der Identifizierung von bislang unbekanntem Ursachen und Verläufen häufiger Krankheiten. Die bereits erfolgreich vollzogene Weiterentwicklung der etablierten Tintenstrahl-Drucktechnik zu laser- und tonerbasierten Systemen hinsichtlich Druckauflösung und Druckgeschwindigkeit könnte ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Peptidarrayproduktionen dazu sein. Zu diesem Zweck wurden Aminosäuretoner entwickelt und charakterisiert, die mit einem technisch modifizierten Laserdrucker auf Trägeroberflächen gedruckt und mit ihnen zur Reaktion gebracht werden können. Die Entwicklung geeigneter Trägeroberflächen stand dabei im Mittelpunkt dieser Arbeit.

(1.) Oberflächenmodifikationen

Es konnten proteinresistente Glasoberflächen als Trägermaterialien für die kombinatorische Peptidsynthese im Arrayformat mit Hilfe einer UV-induzierten Graftpolymerisation von Poly(ethylenglykol)methacrylat (PEGMA) erzeugt werden. Zuvor werden dazu auf Glaträgern Monoschichten aus 7-Octenyltrichlorosilan hergestellt, auf denen anschließend durch Ozon photosensitive, oberflächengebundene Radikalstarter generiert wurden. Die Ozonisierung der Silanfilme wurde mittels XP- und IR-Spektroskopie sowie Messungen des Kontaktwinkels zeitlich verfolgt. Die Optimierung der Graftfilmdicke geschah durch Variation von Bestrahlungsdauer und Monomerkonzentration und erfolgte durch ellipsometrische Schichtdickenmessungen an Siliziumoberflächen. Die Einführung von Aminogruppen mit einer variablen Funktionalitätsdichte erfolgte über die Veresterung von Carbodiimid-aktiviertem Fmoc- β -Alanin. Die erzeugten Filme sind gegenüber 91 %iger Trifluoressigsäure (TFA) stabil und darüber hinaus resistent gegenüber unspezifischer Proteinadsorption. Die Verifizierung der Proteinresistenz erfolgte durch Inkubation mit vier verschiedenen Proteinlösungen (Fibrinogen, Lysozym, BSA und γ -Globulin) in PBS-Puffer und anschließender Auswertung von N1s-XP-Detaillspektren.

(2.) Aminosäure-Tonerpartikel

Es konnten mit allen zwanzig voraktivierten, proteinogenen Aminosäuren (Fmoc-L-Aminosäure-Pentafluorphenylester) Tonerpartikel auf der Basis von OKI-Farbtönen synthetisiert und charakterisiert werden, die vergleichbare Größenverteilungen im Bereich von 9 μm und Ladungseigenschaften wie ihre Vorbilder aufweisen. Ihre Fähigkeit zur qualitativen Kopplung an aminoterminierte Glasoberflächen konnte über ein Anfärben der entschützten Aminogruppen nach der Reaktion mit der Oberfläche gezeigt werden.

(3.) Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern

Drei verschiedene Peptidepitope (DTYRYIDYA, YPYDVPDYA und DYKDDDDK) wurden mit Aminosäuretoner (und zum Vergleich aus einer Lösung in DMF) auf mit Rink-Linker modifizierten, PEG-gegrafteten Glasobjektträgern großflächig synthetisiert. Die Kopplungsausbeuten der einzelnen Syntheseschritte wurden UV-spektroskopisch verfolgt. Nach Abspalten der Peptide vom Träger mit TFA konnten alle drei Sequenzen durch MALDI-TOF-Messungen als Amide identifiziert werden.

(4.) Peptidlaserdrucker und Peptidarray

Der entwickelte Peptidlaserdrucker ist in der Lage, innerhalb von ca. 70 Sekunden einen derivatisierten Glasträger (21 cm x 20 cm) mit ca. 155.000 Spots (\varnothing ca. 250 μ m) zu bedrucken. Er basiert auf der Technik der Farblaserdruckerserie C7200 von OKI und besteht aus zwanzig hintereinander angeordneten Tonerkartuschen in einer Rahmenkonstruktion. Der zu bedruckende Träger wird auf einem Schlitten mit präzisiertem Linearantrieb bewegt. Ein erster Test-Array vor Inbetriebnahme des Druckers, bestehend aus den schachbrettartig angeordneten Epitopen YPYDVPDYA und DYKDDDDK, wurde durch Ausdruck der Aminosäuretoner auf Laserdruckerfolien und anschließenden Transfer auf den Glasträger synthetisiert. Der Nachweis erfolgte durch eine Inkubation des Trägers mit Mischungen aus den spezifischen Erst- und den fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern und Auswertung mit einem Fluoreszenzscanner.

Schlagwörter: Peptidarray, Graftpolymerisation, Proteinresistenz, Tonerpartikel, Laserdrucker

Abstract

Complexity improvement of peptide libraries or peptide arrays respectively is an important step to identify unknown reasons and courses of common diseases. The already successfully implemented development of established ink-jet printing technology to laser and toner based systems with respect to speed and resolution could be a starting point for future peptide array productions. Therefore amino acid toners were developed and characterized which can be printed onto derivatized supporting materials by a technical modified laser printer. Centre of this work was the development of suitable supporting materials.

(1.) Surface Modifications

Protein resistant glass surfaces were generated as supporting materials for the combinatorial peptide synthesis by means of UV induced graft polymerization of poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA). Therefore glass slides were silanized with 7-octenyltrichlorosilane

and ozonized to produce surface-bound photosensitive polymerization initiators. The ozonization of the silane films was monitored over the time by XP and IR spectroscopy as well as contact angle measurements. The optimization of grafted film thickness was made by verifying both time of irradiation and monomer concentration. Film thickness was measured ellipsometrically on likewise graftpolymerized silicon surfaces. Introducing of amino groups with a variable density was performed with carbodiimide mediated esterifications of fmoc- β -alanine. Those films are stable to TFA (91 %) and are able to prevent unspecific protein absorption. Protein resistance was verified with four different proteins (fibrinogen, lysozyme, BSA, and γ -globuline) in PBS buffered solutions by analyzing N1s detail XP spectra.

(2.) Amino Acid Toner Particles

Toners of all twenty proteinogenic amino acids (fmoc-*L*-amino acid pentafluorphenylesters) based on OKI toners could be synthesized and characterized with comparable particle size distributions (9 μ m) and charging properties. They were coupled to amino modified glass surfaces, and free amino groups were stained after deblocking with bromophenol blue.

(3.) Peptide Syntheses with Amino Acid Toners

Three different peptide epitopes (DTYRYIDYA, YPYDVPDYA, and DYKDDDDK) were synthesized on modified, PEG grafted glass supports with an attached Rink linker. To compare these results syntheses in solution (DMF) was made. Coupling efficiencies were monitored with UV/Vis spectroscopy. After splitting off the peptides with TFA all three sequences could be identified as amides.

(4.) Peptide Laser Printer and Peptide Array

The developed peptide laser printer is able to print ca. 155,000 spots onto a glass support (21 cm x 20 cm) within about 70 sec. The average spot diameter is about 250 microns. It is based on the four-color laser printer series C7200 of OKI and consists of twenty toner cartridges which are arranged one after another inside a framework construction. The slide for printing is fixed on a sledge with a precise linear drive below the cartridges. A simple test array was produced by printing amino acid toners first to transparencies and then transferred to modified glass slides. The array consisted of a chessboard-like pattern of epitope YPYDVPDYA and DYKDDDDK. The successful synthesis was proved by incubating the slide with a mixture of specific first and fluorophore-labeled secondary antibodies and analyzing by means of a fluorescence scanner.

Keywords: peptide array, graft polymerization, protein resistance, toner particles, laser printer

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung.....	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Zielsetzung.....	5
2.	Theoretische Grundlagen.....	8
2.1	Peptidsynthese an fester Phase.....	8
2.1.1	Schematischer Ablauf der Peptidsynthese an festen Phasen	9
2.1.1.1	Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen.....	9
2.1.1.2	Aktivierungsmethoden in der Peptidsynthese.....	11
2.1.2	Ortsaufgelöste Peptidsynthese – die Peptid-SPOT-Synthese	13
2.1.2.1	Prinzip der SPOT-Synthese	13
2.2	Oberflächenmodifikationen zur SPOT-Peptidsynthese.....	16
2.2.1	Modifizierung von Cellulose	16
2.2.1.1	Struktur der Cellulose.....	16
2.2.1.2	Oberflächenmodifikationen von Cellulose.....	17
2.2.2	Modifizierung von PET-Folien	17
2.2.2.1	Struktur und Eigenschaften von Polyethylenterephthalat (PET).....	17
2.2.2.2	Oberflächenmodifikationen von PET.....	18
2.3	Laserdruckprozeß.....	19
2.3.1	Xerographie oder Elektrophotographie	19
2.3.2	Aufbau und Funktionsweise eines Monochrom-Laser- bzw. LED-Druckers	19
2.3.3	Aufbau und Funktionsweise eines Farb-Laser- bzw. LED-Druckers.....	20
2.3.4	Der Toner - die „elektronische Tinte“ des Laserdruckers.....	23
2.3.4.1	Zusammensetzung.....	23
2.3.4.2	Ladungseigenschaften	24
2.4	Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen	26
2.4.1	Nachteile unspezifischer Proteinadsorption	26
2.4.2	Möglichkeiten der Verringerung unspezifischer Proteinadsorption durch gezielte Oberflächenmodifikationen	28
2.4.3	Verwendung von Poly- (PEG) bzw. Oligo(ethylenglykolen) (OEG) zur Verringerung unspezifischer Proteinadsorption auf Oberflächen.....	29
3.	Ergebnisse	31
3.1	Oberflächenmodifikationen	31
3.1.1	Modifizierung von Cellulose	31
3.1.2	Modifizierung von Laserdruckerfolien aus PET.....	32
3.1.3	Modifizierung von Glasoberflächen.....	37
3.1.3.1	Silanisierung.....	37
3.1.3.2	Ozonisierung zur Einführung photosensitiver Gruppen	42
3.1.3.3	Graftpolymerisation mit Poly(ethylenglykol)-methacrylat, PEGMA ₅	47
3.1.3.4	Funktionalisierung mit Aminogruppen.....	50

3.1.3.5	Untersuchung der PEG-Oberflächen auf deren Stabilität gegenüber TFA.....	52
3.2	Proteinresistenz auf PEG-gegrafteten Glasoberflächen	55
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopie an adsorbierten, FITC-gelabelten Proteinen	55
3.2.2	XP-Spektroskopie von adsorbierten Proteinen auf Glasoberflächen	57
3.3	Peptidepitop-Synthesen an modifizierten Glasobjektträgern.....	59
3.3.1	Peptidsynthesen aus Lösung	59
3.3.1.1	Anbindung des Rink-Linkers	59
3.3.1.2	Auswahl der Peptidepitop-Sequenzen.....	59
3.3.1.3	Ergebnisse der Epitopsynthese aus Lösung.....	60
3.3.1.4	Ergebnisse der Epitopsynthese aus Aminosäuretonern	62
3.4	Antikörper-Bindungsstudien	67
3.4.1	Immobilisierung von Peptid-Epitopen auf PEG-gegrafteten Glasträgern.....	67
3.4.2	Nachweis der SMCC-immobilisierten Peptidepitope mittels Antikörper.....	69
3.4.3	Vergleich mit kommerziell erhältlichen, aminoterminierten Glasobjektträgern...	70
3.5	Herstellung und Charakterisierung der Aminosäure-Tonerpartikel.....	72
3.5.1	Vorbetrachtungen.....	72
3.5.2	Herstellungsverfahren	73
3.5.3	Bestimmung von Kopplungsfähigkeit, Größenverteilung und Ladungseigenschaften der einzelnen Aminosäure-Tonerpartikel	74
3.5.4	Synthese von Ladungskontrollreagenzien (CCA)	76
3.6	Erzeugung eines 2-Peptid-Arrays im Schachbrettmuster mit dem Laserdrucker.....	77
3.6.1	Verwendung von Laserdruckerfolien als Aminosäuretoner-Transporter.....	77
3.7	Peptidlaserdrucker-Prototyp auf Basis der OKI C7200er Serie.....	79
3.7.1	Aufbau.....	79
3.7.2	Leistungsfähigkeit	80
4.	Zusammenfassung.....	81
4.1	Modifikationen von Glasoberflächen mit proteinresistenten Eigenschaften	81
4.2	Peptidsynthesen	82
4.3	Antikörper-Bindungsstudien und Vergleich mit kommerziell erhältlichen Arraysystemen.....	82
4.4	Aminosäure-Tonerpartikel, Peptidarray und Peptid-Laserdrucker	83
5.	Ausblick.....	85
5.1	Erzeugen eines Peptidarrays mit dem Peptidlaserdrucker.....	85
5.2	Hintergrund und Idee eines „Peptidchips“	85
5.2.1	Aufbau und Syntheseprinzip	86
5.2.2	Erste Ergebnisse.....	87

6. Materialien und Analytik	88
6.1 Materialien und Geräte	88
6.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel	88
6.1.2 Geräte	89
6.2 Analytik.....	90
7. Durchführung.....	94
7.1 Oberflächenmodifikationen	94
7.1.1 Modifizierung von Cellulosemembranen	94
7.1.1.1 <i>Bestimmung des Derivatisierungsgrades.....</i>	<i>94</i>
7.1.2 Modifizierung von Laserdruckerfolien aus Polyethylenterephthalat (PET).....	95
7.1.2.1 <i>Peroxidierung mit Wasserstoffperoxid und UV-Licht</i>	<i>95</i>
7.1.2.2 <i>UV-induzierte Graftpolymerisation</i>	<i>95</i>
7.1.2.3 <i>Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-β-Alanin</i>	<i>95</i>
7.1.2.4 <i>Aufdrucken des Aminosäuretoners.....</i>	<i>96</i>
7.1.3 Modifizierung von Glasobjektträgern.....	96
7.1.3.1 <i>Silanisierung.....</i>	<i>96</i>
7.1.3.2 <i>Ozonisierung</i>	<i>96</i>
7.1.3.3 <i>UV-induzierte Graftpolymerisation</i>	<i>96</i>
7.1.3.4 <i>Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-NH-(CH₂)_n-COOH-Derivaten.....</i>	<i>97</i>
7.2 Proteinresistenz-Tests	98
7.2.1 Markierung von Proteinen und Antikörpern mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC).....	98
Substanz	98
7.2.2 Fluoreszenzmikroskopie adsorbierter FITC-Proteine auf Glasoberflächen	99
7.2.3 XP-Spektroskopie adsorbierter Proteine auf Glasoberflächen.....	99
7.3 Antikörperbindungsstudien.....	100
7.3.1 Kovalente Anbindung von Peptiden an NH ₂ -funktionalisierte Glaträger.....	100
7.3.1.1 <i>Einführung des bifunktionellen Linkers Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carbonsäure, SMCC.....</i>	<i>100</i>
7.3.1.2 <i>Kopplung der Cystein-terminierten Peptide an SMCC-Oberflächen.....</i>	<i>100</i>
7.3.2 Inkubation mit spezifischem bzw. sekundärem, POD-markiertem Antikörper .	100
7.3.3 Nachweis des Sekundärantikörpers mittels Chemilumineszenz.....	101
7.3.4 Nachweis des Sekundärantikörpers mittels Fluoreszenz.....	101
7.3.5 Entfernen der gebundenen Antikörper	101
7.4 Peptidsynthesen an fester Phase.....	101
7.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Peptidsynthesen aus Lösung	101
7.4.1.1 <i>Spotsynthese auf derivatisierter Cellulose.....</i>	<i>101</i>
7.4.1.2 <i>Manuelle Peptidsynthesen aus Lösung am RINK-Amid-Linker auf Gläsern</i>	<i>102</i>
7.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern.....	102
7.4.2.1 <i>Testausdrucke auf derivatisierter Cellulosemembran.....</i>	<i>102</i>
7.4.2.2 <i>Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern auf NH₂-terminiertem Glas.....</i>	<i>103</i>
7.4.2.3 <i>Manuelle Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern am RINK-Amid-Linker auf Gläsern</i>	<i>103</i>
7.5 UV-spektroskopische Untersuchungen.....	104
7.5.1 Iodometrische Konzentrationsbestimmung an Hydroperoxogruppen nach Ozonisierung.....	104

7.5.2	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten vom Piperidin-Dibenzofulven-Addukt.....	104
7.6	Synthesen von Ladungskontrollreagenzien	105
7.6.1	Natrium-diaquobis(3-hydroxy-2-naphthonsäure)-ferrat(III)	105
7.6.2	Natrium-bis[2-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzoesäure]-aluminat(III).....	106
7.6.2.1	<i>Synthese des Komplexliganden 2-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)benzoesäure.....</i>	<i>106</i>
7.6.2.2	<i>Komplexbildung mit Aluminium(III)-sulfat.....</i>	<i>106</i>
7.7	Herstellung von Aminosäuretoner	107
8.	Anhang	108
8.1	MALDI-TOF Spektren von mit Aminosäuretonern synthetisierten Peptiden (Rohdaten)	108
8.1.1	Epitop 1 (DTYRYIDYA)	108
8.1.2	Epitop 2 (YPYDVPDYA).....	108
8.1.3	Epitop 5 (DYKDDDDK)	109
9.	Literaturverzeichnis	110

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Sämtliches Leben beruht auf dem kontrollierten Zusammenspiel von Molekülen. Der genetische Bauplan, der in unseren Chromosomen abgelegt ist, wird von einer Vielzahl von Proteinen in das für den Menschen typische Erscheinungsbild umgesetzt. Bei ihrem Zusammenwirken kommunizieren die Proteine, indem sie Bindungen untereinander eingehen. Bei Krankheiten sind diese Bindungen verändert oder gestört. Mit möglichst komplexen Peptidarrays können diese Bindungen schnell und umfassend analysiert werden. Ein Fernziel ist es daher, sämtliche im Menschen vorkommenden Proteine, also das gesamte Proteom, in Form von überlappenden Peptiden ortsdefiniert auf einem Träger zu plazieren. Mit diesem Proteinabbild des Menschen können Bindungspartner gefunden werden, die mit den einzelnen Proteinen unseres Körpers wechselwirken. Mit komplexen Arrays könnte die Suche nach Bindungspartnern (u. U. millionenfach) parallelisiert und dadurch konkurrenzlos schnell und kostengünstig werden. Bislang fehlt aber noch eine robuste und einfache Technik, um solche komplexen Arrays herzustellen.

Seit einigen Jahren werden mit zunehmendem Erfolg Molekülbibliotheken auf Arraybasis für die parallelisierte Suche eingesetzt. Für die Genomanalyse stehen mittlerweile Oligonukleotidarrays mit hohen Komplexitäten zur Verfügung (250.000 pro cm^2) und es werden weitere Komplexitätssteigerungen folgen.¹ Auf Peptidarrays können zur Zeit mit den gängigen Techniken nur zwischen 10.000 und 50.000 unterschiedliche Peptide auf einem Träger von ca. 20 cm x 20 cm synthetisiert werden.² Der Grund liegt in der komplexeren Peptidchemie und der größeren Zahl von Grundbausteinen, aus denen Proteine aufgebaut sind. Zudem werden die einzelnen Synthesebausteine nacheinander aufgetragen, was die Zahl der Kopplungszyklen pro Syntheseschritt erhöht. Man nimmt an, daß die Anzahl der Proteine im menschlichen Körper bei ungefähr 30.000 liegt. Die durchschnittliche Zahl an Grundbausteinen eines Proteins, den Aminosäuren, beträgt dabei ca. 500. Will man nun das Proteom eines Menschen auf einem Träger darstellen, müssen die Proteinsequenzen in kürzere Oligopeptide mit einer Überlappung von z.B. fünf Aminosäuren geteilt und kombinatorisch auf dem Träger synthetisiert werden. Daraus ergibt sich eine theoretische Zahl von drei Millionen Peptiden. Diese Beispielrechnung verdeutlicht die Notwendigkeit, die bisher möglichen Dichten von Peptidarrays weiter zu erhöhen.

1.2 Zielsetzung

Handelsübliche Laserdrucker sind Tintenstrahldruckern in Geschwindigkeit und Auflösung überlegen. Bezieht man in diese Tatsache die oben angeführte Rechnung und die zur Zeit üblichen Synthesestrategien zur Herstellung von Peptidarrays (Spotrobotern, die kleinste Flüssigkeitsmengen an aktivierten Monomerbausteinen auf einem Träger absetzen) mit ein, so müßte ein technisch modifizierter Laserdrucker in der Lage sein, auch Peptidarrays schneller und mit höherer Spotdichte generieren zu können. Das dabei zugrundegelegte Verfahren der

Xerographie beruht auf der Möglichkeit, elektrisch aufladbare **Tonerpartikel** ortsgenau mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Trägeroberfläche abzusetzen. Die Aufgabe muß daher sein, für einen solchen Aminosäure-Laserdrucker die notwendigen Komponenten (Tonerpartikel mit eingebetteten Aminosäuren, spezielle Trägermaterialien zur Peptidsynthese) bereitzustellen. Für die erforderliche Genauigkeit des Druckprozesses und für den zukünftigen Einsatz des Peptidarrays sind nur bestimmte Materialien geeignet. Sie müssen eine gewisse Starrheit (z.B. Glas) besitzen und den chemischen und physikalischen Bedingungen während der Peptidsynthese standhalten. Zudem wäre es vorteilhaft, wenn bei der Analyse von erfolgreichen Peptid-Protein-Bindungen auf dem Träger unspezifische Proteinabsorptionen unterdrückt werden könnten, da diese sich negativ auf die Signalqualität auswirken.

Das Hauptziel meiner Arbeit ist daher die Entwicklung von neuartigen, die unspezifische Proteinadsorption verhindernden Glasoberflächen zur Peptidsynthese und deren Einsatz als bedruckbare Trägeroberflächen.

Mit einem Polymerfilm auf der Basis von Poly(ethylenglykolen) (PEG) sollen zwei substantielle Eigenschaften eines zukünftigen Peptidarrays sichergestellt werden:

- 1.) seine guten Quelleigenschaften während der Peptidsynthese, damit genügend aktiviertes Monomer (Aminosäure) an die gewünschten Synthesorte gelangen und somit die repetitive Kopplungsausbeute des Peptids möglichst hoch sein kann und
- 2.) seine Fähigkeit, unspezifische Adsorptionen von Proteinen zu verhindern, damit bei einer Inkubation des synthetisierten Peptidarrays mit Seren oder anderen Antikörper- bzw. Proteinmischungen für ein eventuelles Screening ausschließlich die wahren Peptid-Protein-Bindungspartner detektiert werden, d.h. ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis gewährleistet wird.

Für das Aufbringen eines solchen Filmes auf Glasoberflächen orientiert man sich an der UV-induzierten Graftpolymerisation von Poly(ethylenglykol)-methacrylaten (PEGMA) auf zuvor silanisierten und anschließend ozonisierten Oberflächen. Die beiden letzten Schritte sind notwendig, um auf der relativ inerten SiO_2 -Oberfläche einerseits genügend kovalent gebundenes Reaktionsmaterial anzubieten und andererseits darauf photosensitive Gruppen als Ausgangspunkte für die gewünschte Polymerisation zu erzeugen. Sämtliche Schritte müssen hinsichtlich Versuchsdurchführung, Filmdicke und Funktionalitätsdichte optimiert werden. Die endständigen Hydroxygruppen des grafted PEG-Filmes erlauben die Einführung notwendiger Aminofunktionalitäten für die Peptidsynthese.

Ein weiterer wichtiger Aufgabenteil besteht in der Erzeugung und Verbesserung von **Aminosäuretonern**. Dabei stehen zunächst die Zusammensetzung und die schonende Herstellung dieser Toner im Vordergrund. Diese müssen darüber hinaus auf die Anforderungen des Laserdruckprozesses abgestimmt werden, was Größenverteilung und Ladungseigenschaften betrifft.

Als ein Zusatzaspekt sollen die entwickelten Oberflächenmodifikationen und die angesprochenen Aminosäure-Tonerpartikel auf das Format eines **Computerchips** mit sogenannten Synthesepixeln übertragen werden. Das dabei zugrundegelegte Transferprinzip der einzelnen Synthesebausteine gleicht dem beim Laserdrucker angewandten Prinzip. Durch Erzeugen von latenten Ladungsmustern auf der Chipoberfläche, die gleichsinnig geladenen Aminosäure-Tonerpartikeln präsentiert werden, werden die Monomerbausteine adressiert auf den Pixeln abgelagert und bei Erwärmen zur Reaktion mit der derivatisierten Oberfläche gebracht. Die Detektion erfolgreicher Peptid-Protein-Bindungsereignissen soll in der Zukunft über eingebaute optische oder elektrische Sensoren erfolgen. Mit dieser miniaturisierten Version wäre man in der Lage, auf kleinstem Raum gleichzeitig kombinatorische (Peptid)-Synthese und markierungsfreie Auslese der entstandenen Molekülbibliotheken zu verwirklichen.

Es müssen außerdem großflächige Beispielsynthesen auf den Glaträgeroberflächen durchgeführt werden, die einen Vergleich zwischen Synthesen aus Lösung und Synthesen mit Aminosäuretonern hinsichtlich durchschnittlicher Kopplungsausbeute und gewünschter Peptidsequenz zulassen. Zudem muß gezeigt werden, daß durch Aminosäure-Toner erzeugte Peptidsequenzen (Epitope) spezifisch von entsprechenden (Primär-)Antikörpern erkannt werden (Antikörper-Bindungsstudien). Zur Detektion dieser Erkennung mit einem Fluoreszenzscanner eignet sich dabei die Verwendung von farbstoffmarkierten Sekundärantikörpern.

Bei der Anpassung der Computerchips zu deren Einsatz als Peptidsyntheseträger sind im Vorfeld einige Design-Veränderung zu tätigen sowie Schutzvorkehrungen gegenüber aggressiven Lösungsmitteln und mechanischen Beanspruchungen zu treffen. Außerdem muß für eine Zwischenlösung bis zur Implementierung der Sensoren bei der Chipauslese gesorgt werden, bei der zunächst fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet werden. Eine Detektion von Bindungsereignissen ließe sich so mit einem Fluoreszenzmikroskop verwirklichen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Peptidsynthese an fester Phase

Der über 100 Jahre alte Traum Emil Fischers von der Möglichkeit, ganze Proteine zu synthetisieren, ist heute längst Realität geworden. Viele Hürden mußten seitdem überwunden werden, um die Natur nachzuahmen. Heute kann nahezu jedes beliebige Peptid mit 20 bis 30 Aminosäuren im Labor mit Hilfe chemischer Methoden hergestellt werden³. Einen enormen Fortschritt auf diesem Gebiet brachte die Entwicklung von MERRIFIELD⁴ im Jahre 1963, als er seine Idee einer Festphasensynthese von Peptiden vorstellte. Mit den Verbesserungen der verwendeten Syntheseharze, Kopplungsreagenzien und Schutzgruppen stehen derzeit dem Peptidchemiker vielfältige, optimierte Werkzeuge zur Verfügung, um Reinheit der Peptide und Kopplungsausbeute seiner Synthesen zu maximieren.

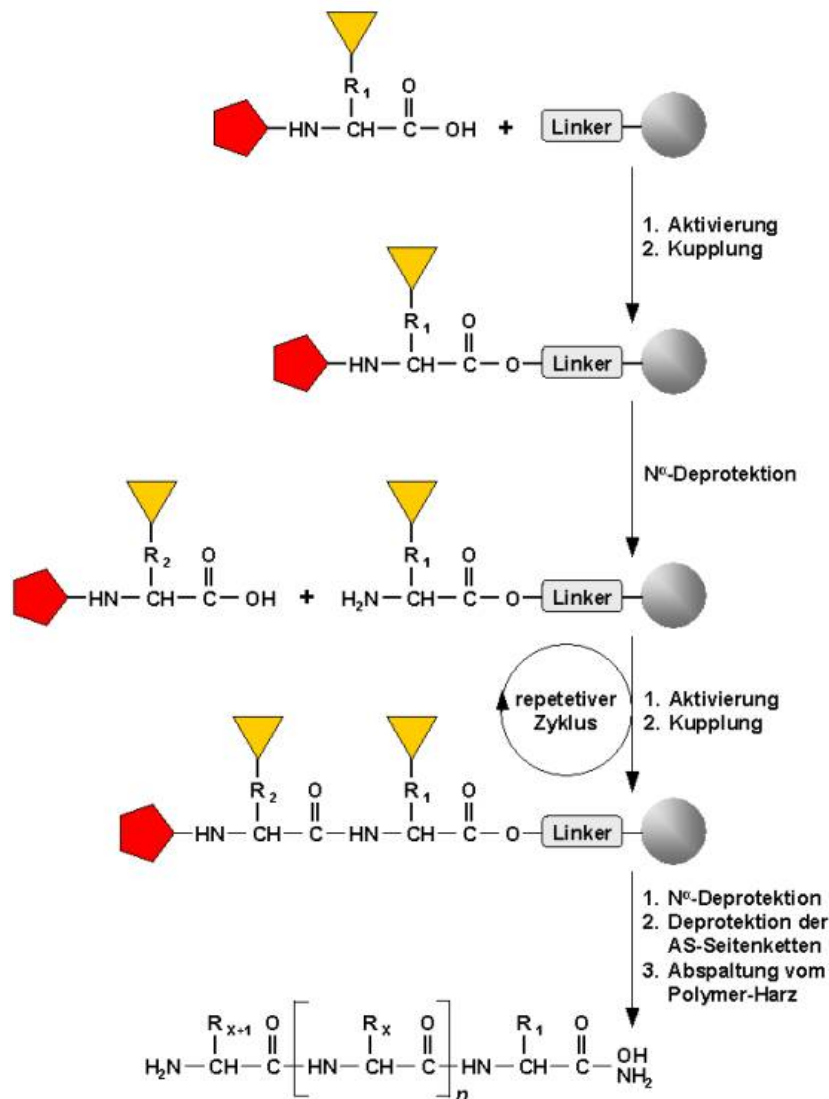


Abb. T1 Schema der Peptidsynthese an fester Phase nach Merrifield

2.1.1 Schematischer Ablauf der Peptidsynthese an festen Phasen

2.1.1.1 Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen

Abbildung T1 zeigt den Ablauf der Festphasensynthese eines Peptids in schematischer Form^a. Gewöhnlich werden dabei die Peptide vom C- zum N-Terminus schrittweise aufgebaut. Zu Beginn wird die erste N-terminal (rot) und seitengruppengeschützte (gelb) Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids an ihrer Carboxygruppe über eine Ankergruppierung (Linker) mit dem polymeren Träger (Harz) verbunden und am N-Terminus wieder entschützt. Der Linker ermöglicht später nach beendeter Synthese die Abspaltung des Peptids vom Harz (grau) unter spezifischen Bedingungen. Die nächste, in der Sequenz folgende N-terminal geschützte Aminosäure wird am Carboxyterminus mittels Kopplungsreagenzien aktiviert (z.B. als Ester) und dann an das freie Aminoende der entstandenen Peptidkette gekoppelt.

Nach der Abspaltung der Aminoschutzgruppe (rot) folgt die Kopplung der nächsten N-terminal geschützten Aminosäure. Dieser Zyklus von Kopplung und Abspaltung wird solange wiederholt, bis das Peptid die gewünschte Länge erreicht hat. Nachdem sämtliche Kopplungen durchgeführt wurden, wird das Peptid vom Harz abgespalten, d.h. die kovalente Bindung zwischen C-terminaler Aminosäure und der Ankergruppierung des polymeren Trägers wird getrennt, wobei je nach Linker das Peptid als Säure oder als Amid entsteht. Dabei werden zu meist die Seitenkettenschutzgruppen (gelb) direkt mit abgespalten.

Mit der Einführung der 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc-Gruppe) durch Carpino⁵ hat die Fmoc-Schutzgruppenstrategie in der Peptid-Synthese eine große Bedeutung erlangt. Man bezeichnet sie auch als Strategie der orthogonalen Schutzgruppen, da die basenlabile Fmoc-Gruppe den N-Terminus schützt und am Ende jedes Zyklus mit einem sekundären Amin (z.B. Piperidin) abgespalten wird, während die säurelabilen Schutzgruppen die funktionellen Gruppen der Seitenketten schützen und erst am Ende der Synthese, oft mit Trifluoressigsäure (TFA), entfernt werden. Als säurelabile Seitenschutzgruppen kommen beispielsweise die tert-Butyloxycarbonyl- (Boc), die tert-Butyl- (tBu) oder die Trityl-Gruppe (Trt) zur Anwendung (Abb. T2).

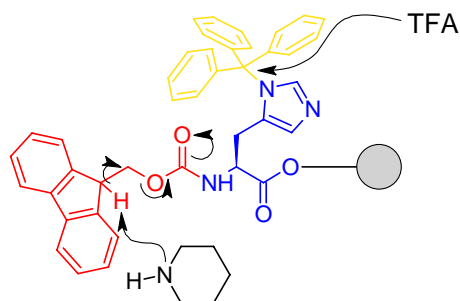


Abb. T2 Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen am Beispiel von L-Histidin(Trt) (blau); die basenlabile Fmoc-Gruppe (rot) wird durch Piperidin (schwarz), die säurelabile Tritylgruppe (gelb) durch TFA abgespalten

^a aus: <http://www.uni-duesseldorf.de/www/bmfz>

Der Vorteil in der Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe besteht ferner darin, daß das beim Abspalten mit Piperidin entstandene sogenannte Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (PDFA) UV-spektroskopisch detektierbar ist (Abb. T3). Der bei 301 nm bestimmte Extinktionskoeffizient erlaubt die Quantifizierung des Abspaltproduktes und somit eine quantitative Aussage über den Erfolg der Abspaltung nach jedem Kopplungszyklus während der Synthese.

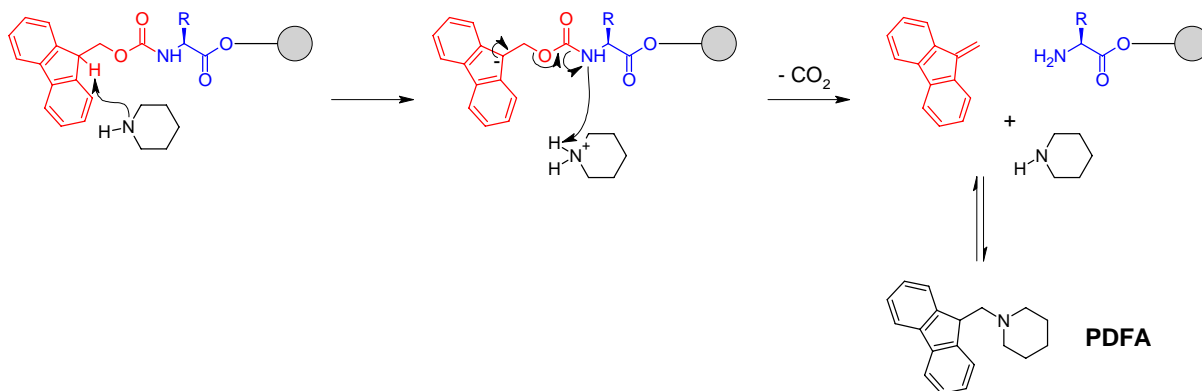


Abb. T3 Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch Piperidin und Erzeugung des Piperidin-Dibenzofulven-Addukts

Als säurelabiler Linker eignet sich beispielsweise der sogenannte RINK-Linker⁶, der parallel zum Abspalten der Seitenschutzgruppen mit TFA das synthetisierte Peptid vom Trägerharz als Amid freigibt (Abb. T4).

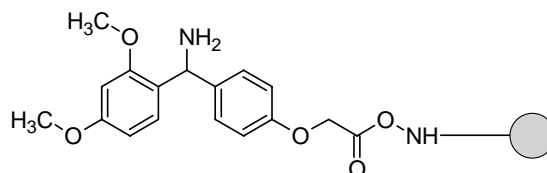


Abb. T4 Rink-Linker an fester Phase

Die Synthese eines Peptids an einem festen Träger weist einige Vorteile auf. So können Reagenzienüberschüsse oder Nebenprodukte durch einfaches Filtrieren oder Waschen des Trägers entfernt werden. Die sich wiederholenden Arbeitsschritte können leicht automatisiert werden und durch den großen Eduktüberschuß wird ein fast vollständiger Reaktionsumsatz sichergestellt. Allerdings birgt das Konzept auch Nachteile, da die Kontrolle über die einzelnen Kopplungsreaktionen aufwendig und nur indirekt möglich ist. Auch lassen sich Peptidfehlsequenzen nach unvollständiger Umsetzung nicht gänzlich vermeiden, aber durch den Einbau eines Capping-Schrittes mit Essigsäureanhydrid kurz nach der Aminosäurekopplung minimieren. Dabei werden nicht umgesetzte freie Aminogruppen irreversibel acetyliert und verhindern dadurch während des anschließenden Kopplungsschrittes den Angriff der in der Sequenz folgenden Aminosäure.

2.1.1.2 Aktivierungsmethoden in der Peptidsynthese

Für eine schnelle und möglichst quantitative Anknüpfung der Aminosäure an einen entschützten *N*-Terminus bedarf es einer effizienten Aktivierung der Carbonsäure-Funktionalität. Dabei müssen Nebenreaktionen ausgeschlossen werden und die chirale Aminosäure vor Racemisierung geschützt sein. Im Standardverfahren erfolgt die Aktivierung *in situ*. Traditionell erfolgt dieser Schritt durch den Einsatz von Carbodiimiden, welche die Aminosäure in einen

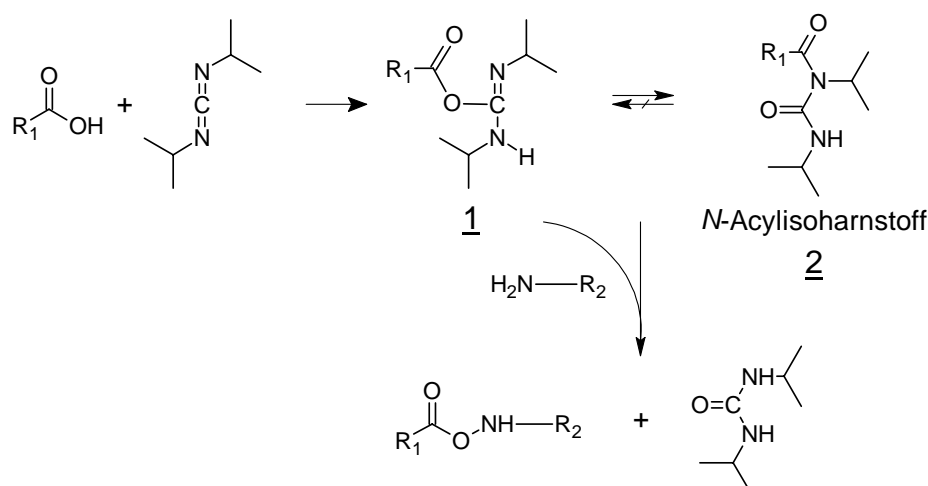


Abb. T5 *in-situ*-Aktivierung eines Carbon-/Aminosäure-Derivats mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und dessen mögliche irreversible Umlagerung zum *N*-Acylisourea

O-Acylisourea (**1**) überführen. Dieser ist sehr reaktiv, führt aber oft durch eine irreversible Umlagerung zu unreaktiven Endprodukten (**2**) und gefährdet außerdem die chirale Integrität der betreffenden *L*-Aminosäure (Abb. T5).

Um dies zu vermeiden, sind diverse alternative Aktivierungsreagenzien entwickelt worden und haben ihren berechtigten Platz in der Peptidchemie eingenommen. Eine Gruppe dieser Reagenzien bilden Aktivester auf der Basis der Hydroxylamine. Als weit verbreitete seien hier das HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) und das HODhbt (3-Hydrox-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin) erwähnt, deren Ester zwar weniger reaktiv als die *O*-Acylisourea sind, dafür aber als stabiler und weniger anfällig für Racemisierungen gelten⁷. Für anspruchsvollere Kopplungen entwickelte Carpino das HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol), die Aza-Variante des HOBt. Dieses ist zwar in der Verwendung teurer, aber mit besseren Kopplungsausbeuten verbunden.⁸ Die Weiterentwicklung des HODhbt zur Azaverbindung HODhat (3-Hydrox-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzotriazin) führte nochmals zu einer Reaktivitätssteigerung verglichen mit allen anderen Azatriazol-Estern.⁹

Aktivester lassen sich aber auch mit Aminium- (HATU, HBTU, HCTU), Uronium- (HDTU, HDATU) oder Phosphoniumsalzen (PyAOP, PyBOP) in Anwesenheit einer Base erzeugen.^b Kopplungen mit den Aminium-/Uroniumhexafluorosphatsalzen und deren Tetrafluoroborat-Analoga haben sich als effizienter erwiesen als entsprechende Reaktionen mit den Phosphoniumsalzen. Letztere (z.B. PyAOP) werden bevorzugt bei Zyklisierungen von fest-

^b Der Übersichtlichkeit halber sind nur die Abkürzungen aufgeführt. Die kompletten Substanznamen sind im Abkürzungsverzeichnis auf Seite X zu finden.

Die Verwendung der Aminosäurechloride wird allerdings weniger empfohlen, da sie trotz ihrer hohen Reaktivität zu Instabilität neigen und sich nicht über längere Zeiträume lagern lassen.¹⁶ Nicht so die Fluoride, die gegenüber Hydrolyse weitaus stabiler als die Chloride sind und gern für die Synthese von Peptidsequenzen verwendet werden, in die sterisch sehr anspruchsvolle, nicht-natürliche Aminosäuren eingebaut werden sollen.¹⁷

Eine gesonderte Stellung nehmen die Aktivester des Pentafluorphenols (Pfp) (**6**) ein. Sie kommen bei der Kopplung der Aminosäure an den NH₂-Terminus ohne weitere Zusätze aus und sind in kristalliner Form stabil. Anhand des Cysteins wurde gezeigt, daß hohe Reaktionsausbeuten in kurzer Zeit mit ihnen erzielt werden können.¹⁸ Sie sind kommerziell erhältlich und fast unbegrenzt lagerfähig. Sie lassen sich auch *in situ* mit Carbodiimiden erzeugen (Abb. T7).¹⁹

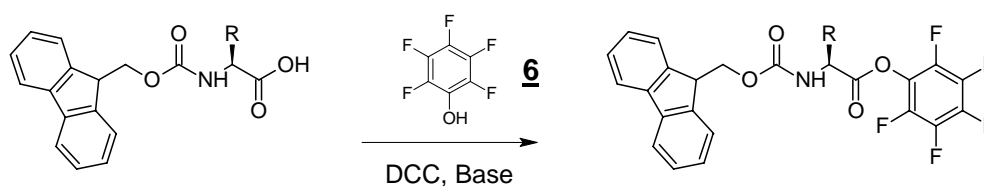


Abb. T7 *in situ*-Erzeugung eines Pentafluorphenylesters (OPfp) mit Pentafluorphenol **6** und DCC

Die hier aufgeführten Aktivierungsmethoden hegen keinen Anspruch auf Vollständigkeit, geben aber einen guten Überblick über die vielfältigen Möglichkeiten, über deren jeweiliger Einsatz letzten Endes anwendungsbezogen entschieden werden muß. Für routinemäßig durchgeführte, automatisierte Peptidsynthesen mit Syntheserobotern einigt man sich aus Kostengründen meist auf ein Standardverfahren und greift bei schwierigeren Peptidsequenzen oft auf bessere, aber mitunter teurere Aktivierungsmethoden zurück.

2.1.2 Ortsaufgelöste Peptidsynthese – die Peptid-SPOT-Synthese

2.1.2.1 Prinzip der SPOT-Synthese²⁰

Das Konzept der Peptidsynthese an Cellulosemembranen wurde erstmalig von R. FRANK und später von J. EICHLER beschrieben.²¹ Die Weiterentwicklung in ein hoch parallelisiertes Verfahren bestand darin, nebeneinander lokal begrenzte, kreisförmige Reaktionsräume (SPOTs) auf der Cellulosemembran durch tropfenweises Aufbringen der Reaktionslösungen zu definieren.²² Prinzipiell geht es darum, kleinste Volumina aktivierter Monomerbausteine (z.B. Aminosäuren) auf eine zusammenhängende, homogene Membran adressiert zu übertragen. Die Monomere reagieren dann mit den oberflächengebundenen funktionellen Gruppen und initiieren eine konventionelle (Peptid-)synthese. Das eingesetzte Volumen, die physikalischen Eigenschaften der Membranoberfläche sowie das verwendete Lösungsmittel bestimmen letztendlich Spotgröße bzw. Spotabstand und somit die praktisch mögliche Spotdichte pro Flächeninhalt auf dem Trägermaterial. Die zur Synthese notwendigen Entschützungs- und

Waschschritte erfolgen danach parallel und betreffen die gesamte Membran bzw. den gesamten Träger in gleicher Weise. Der Unterschied zur Synthese an Harzkügelchen besteht darin, daß die erzeugten Peptide nach der Synthese auf dem Trägermaterial immobilisiert und räumlich voneinander getrennt zurückbleiben. Die Vorteile eines so hergestellten Peptidarrays sind zum einen die mögliche parallele Synthese vieler verschiedener Einzelverbindungen (kombinatorische Synthese von Molekülbibliotheken) (Tab. 1) und zum anderen die parallele Detektion von Bindungsereignissen bei der Erkennung der Peptidsequenzen. Diese Erkennung kann z.B. durch Proteine, Antikörper (Abb. T8) oder DNA erfolgen. Anhand der Position einer erfolgten Bindung läßt sich dabei sofort die Sequenz des bindenden Peptids zuordnen.

Tab. 1 Anzahl möglicher Permutationen in einer Peptidbibliothek aus zwanzig Aminosäuren

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

Zum Aufbringen der aktivierten Aminosäuren stehen unterschiedliche Techniken zur Verfügung, bei denen jeweils Lösungen der Monomerbausteine verwendet werden. Für einfache Tests im Labormaßstab lassen sich mit handelsüblichen Pipetten auf Cellulosemembranen kleine Spots erzeugen und Arrays mit Spotzahlen von bis zu 200 pro Objektträger (76 x 26 mm) erzielen. Dafür sind bereits Baukästen (Kits) mit vorgefertigten Membranen, Reaktionsgefäßen, Aminosäuren, Pipettierprotokollen und dergleichen kommerziell erhältlich

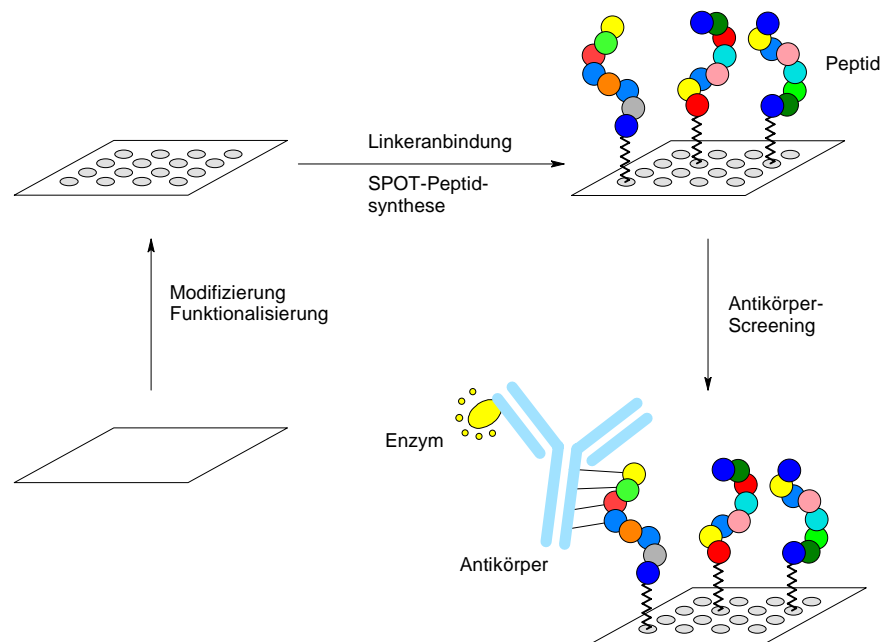


Abb. T8 Schritte zu Generierung eines Peptidarrays und direktes Screening mit einem Enzym-markierten Antikörper

(Sigma Genosys; www.genosys.com). Für größere Genauigkeiten und automatisierte Synthesen stehen klassische Pipettierroboter (z.B. von Abimed oder Gilson) zur Verfügung, die kleinste Volumina im nL-Bereich dosieren und auftragen können.

Einen anderen Weg beschreiten Techniken, die über Licht die Orte definieren, an denen die Synthese der Peptide auf dem Träger stattfinden soll (Photolithographie). Zum einen werden dabei photolabile Schutzgruppen und Photomasken verwendet, um durch gezieltes, ortsaufgelöstes Abspalten der *N*-terminalen Schutzgruppen eine kombinatorische Synthese zu ermöglichen.²³ Dieser vielversprechende Ansatz zur Generierung hochdichter Peptidarrays hat aber einige Nachteile. Die Produktion der Photomasken ist durch die Notwendigkeit eines Reinraumes teuer und auch zeitaufwendig. Die Effizienz der Abspaltung der photolabilen Gruppen ist zudem geringer als bei herkömmlichen Fmoc- oder Boc-Schutzgruppen.²⁴ Die Probleme lassen sich allerdings minimieren, indem durch das eingesetzte Licht sogenannte Photosäuren generiert werden, die an den Orten ihrer Entstehung gezielt säurelabile Boc-Schutzgruppen abspalten. Über eine projiziertes, computergeneriertes Lichtmuster lassen sich so einige Tausend Peptidsequenzen pro Quadratzentimeter auf einem Chip synthetisieren.²⁵ Ein entscheidender Nachteil beider Methoden ist jedoch die hohe Anzahl von Kopplungszyklen pro Syntheseschritt, da die Aminosäuren nur nacheinander auf dem Träger zur Reaktion gebracht werden können.

2.1.2.2 Anwendungen von durch SPOT-Synthesen hergestellten Peptidarrays

Die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten von Peptidarrays ist immens. Sie finden ihren Einsatz in der Molekularbiologie, in der Immunologie oder in der Wirkstoffforschung, um nur einige Themenfelder zu nennen. Die verschiedenen Möglichkeiten lassen sich dabei in einige wichtige Gebiete einteilen (Tab. 2).

Tab. 2 Beispiele für Anwendungsmöglichkeiten von Peptidarrays

Verfahren	Anwendungsbeispiele
Peptid/Protein-Protein-Wechselwirkungen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen ▪ Analyse von Bindungsstellen (Rezeptoren, Chaperone, Zellskelett-Proteine, Signalmoleküle, etc.)
Identifizierung von Enzymaktivitäten	Kinase- und Protease-Aktivitäten
Identifizierung bindender Peptide	Bindung an Metallionen, DNA
Zell-Bindungsstudien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ T-Zell-Epitope ▪ Antibiotische Peptide

In der Literatur finden sich umfangreiche Beispiele und Übersichten²⁶, in denen erfolgreich Peptidarrays z.B. zur Identifizierung von Antikörper-Bindungsstellen (Epitop-Mapping) oder bei der Suche nach Enzym-hemmenden Peptiden eingesetzt wurden. Dabei werden nicht nur die auf der Oberfläche synthetisierten und immobilisierten Peptide untersucht, sondern auch die nach der Abspaltung vom Träger erhaltenen Peptidsequenzen in Lösung weiter verwendet.

Die Technik der Festphasensynthese von Peptiden und deren parallele Analyse lassen sich auf andere Monomerbausteine (beispielsweise Peptoidbibliotheken) übertragen.²⁷

2.2 Oberflächenmodifikationen zur SPOT-Peptidsynthese

Die bei der Peptidsynthese verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel sind mitunter sehr aggressiv (z.B. TFA). Außerdem wiederholen sich viele Wasch- und Kopplungsschritte mit zunehmender Sequenzlänge der Peptide, so daß die verwendeten Trägermaterialien diese Bedingungen unter allen Umständen tolerieren müssen. Zudem müssen sie genügend funktionelle Gruppen auf ihren Oberflächen bereitstellen, an denen die Oligopeptide später aufgebaut werden können, bzw. müssen so modifizierbar sein, daß sich nachträglich Anknüpfungspunkte für reaktive Gruppen einbauen lassen. Im Hinblick auf den Einsatz eines Laserdruckes zum Verdrucken von Aminosäuretoner werden mögliche Derivatisierung von Laserdruckerfolien (PET-Folien) diskutiert.

2.2.1 Modifizierung von Cellulose

2.2.1.1 Struktur der Cellulose

Cellulosemoleküle sind wasserunlösliche, langkettige, relativ starre Kondensationspolymere aus β -Glucoseeinheiten, die miteinander 1,4- β -glykosidisch verknüpft sind. Da jedes zweite Glucosemolekül entlang einer Kette um 180 °C gedreht ist, ist das eigentlich wiederkehrende Strukturelement die Cellubioseeinheit (Abb. T9).

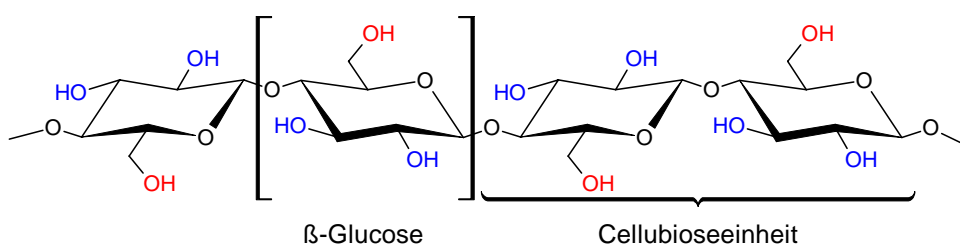


Abb. T9 Strukturformel der Cellulose; primäre und sekundäre OH-Gruppen

Die linearen Cellulosemoleküle sind sehr dicht gepackt und bilden inter- und intramolekular Wasserstoffbrückenbindungen aus, was letztlich der daraus resultierenden Faser große Stabilität verleiht. In die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen sind vorzugsweise die primären Hydroxygruppen (rot) involviert, was die weniger reaktiven sekundären OH-Gruppen (blau) für weitere chemische Modifikationen zugänglich macht (Abb. T17).

2.2.1.2 Oberflächenmodifikationen von Cellulose

Eine einfache Möglichkeit zur Einführung reaktiver Gruppen in das Cellulose-Netzwerk besteht in einer einfachen Veresterung der OH-Gruppen mit Fmoc- β -Alanin und anschließender Entschützung (Abb. T10).

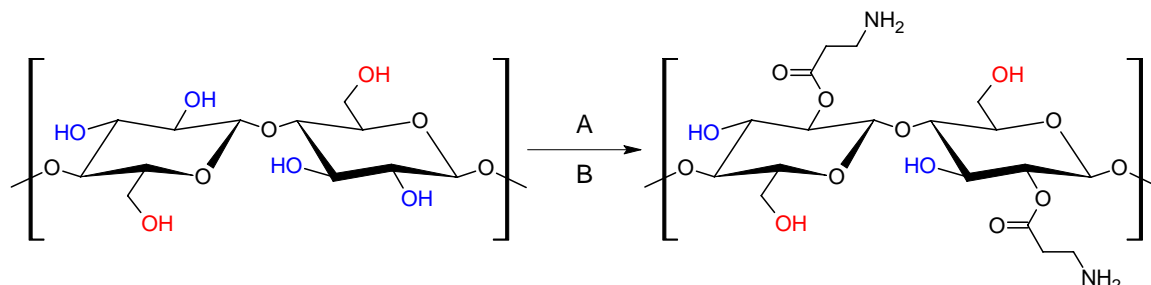


Abb. T10 Veresterung von Cellulose mit β -Alanin
(A: Fmoc- β -Ala-OH/DCC/NMI; B: 20 % Piperidin/DMF)

Das daraus resultierende aminoterminierte Polymer besitzt beste Voraussetzungen für eine Festphasensynthese von Peptiden. Es ist stabil gegenüber Lösungsmitteln und Reagenzien (z.B. DMF, MeOH, DCM, Piperidin, TFA) und es lässt sich leicht in jede gewünschte Form bringen. Die Esterbindungen werden lediglich bei der Verwendung von Ammoniak angegriffen, was man sich am Syntheseende zur Abspaltung der Peptide zunutze machen kann.^{28, 20 (b)}

Eine esterfreie Derivatisierung lässt sich durch eine Zinkchlorid-katalysierte Alkylierung mit Epoxiden erreichen (Abb. T11).²⁹ Hierbei sind Derivatisierungsgrade von 50 bis 100 nmol/cm² möglich.

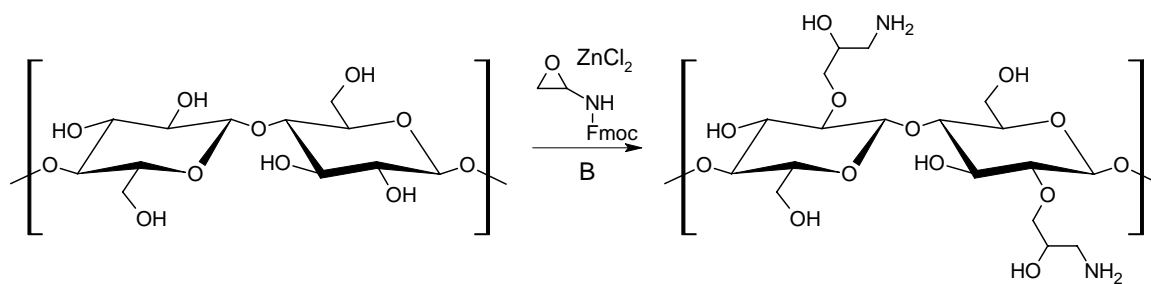


Abb. T11 Esterfreie Derivatisierung von Cellulose mit ZnCl_2 und Epoxid
(B: 20 % Piperidin/DMF)

2.2.2 Modifizierung von PET-Folien

2.2.2.1 Struktur und Eigenschaften von Polyethylterephthalat (PET)

PET-Polymere lassen sich zum Beispiel durch Polykondensation von Terephthalsäure (1,4-Benzoldicarbonsäure) oder 1,4-Dimethylterephthalat mit Ethylenglykol (1,2-Dihydroxyethan) herstellen (Abb. T12).

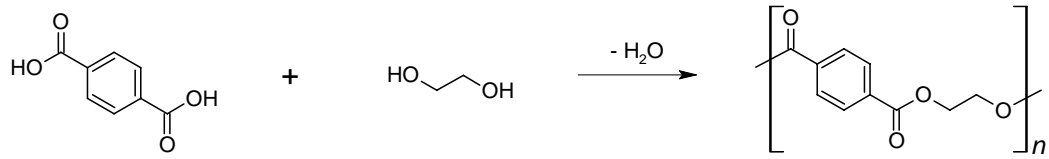


Abb. T12 Reaktionsschema der Polykondensation von PET

Der daraus erhaltene Kunststoff ist von thermoplastischer Natur und gehört zur Familie der Polyester. Das PET-Polymer beinhaltet zahlreiche polare Gruppen, wodurch sich starke zwischenmolekulare Kräfte ausbilden. Das Makromolekül ist zudem linear aufgebaut und bildet keine weiteren Vernetzungen aus. Diese Eigenschaften sind Voraussetzungen für teilkristalline Bereiche und Fasern. Durch diese Bereiche ergeben sich auch eine hohe Schlagzähigkeit, Bruchfestigkeit und Formbeständigkeit. Als Textilfaser („Polyester“) wird PET auch wegen weiterer nützlicher Eigenschaften eingesetzt. Es ist knitterfrei, reißfest, witterungsbeständig und nimmt nur sehr wenig Wasser auf. Wegen seiner guten Gewebeverträglichkeit wird PET auch als Werkstoff für Blutgefäßprothesen eingesetzt. Die Glasübergangstemperatur T_m liegt bei etwa $75\text{ }^\circ\text{C}$, der Schmelzpunkt bei ca. $240\text{ }^\circ\text{C}$. Dadurch, und aufgrund der bereits erwähnten Zugfestigkeit von $48 - 72\text{ MPa}$ (vergleiche PP: $31-41\text{ MPa}$, Teflon: $21 - 34\text{ MPa}$)³⁰, lassen sich thermisch stark beanspruchbare (Laserdrucker-) Folien aus PET fertigen, die vollkommen transparent sind.

2.2.2.2 Oberflächenmodifikationen von PET

Das Aufbringen von Aminogruppen auf PET-Oberflächen ist über eine einfache Aminolyse möglich (z.B. mit Ethylendiamin, Abb. T21). Die polymeren Ketten werden dabei an diesen Stellen gespalten.³¹ Für die Herstellung proteinresistenter PET-Oberflächen zur Verringerung einer unspezifischen Proteinadsorption eignen sich besonders gut hydrophile Polymere, allen voran die Poly(ethylenglykole), kurz PEG (siehe Kapitel 2.4.3). Eine Möglichkeit zur kovalenten Anbindung dieser Substanzklasse ist über die eingeführten Aminogruppen möglich. Anschließend wird mit Cyanurchlorid vorher aktiviertes Poly(ethylenglykol) über eine Reaktion mit den primären Aminogruppen kovalent angeknüpft (Abb. T13).³²

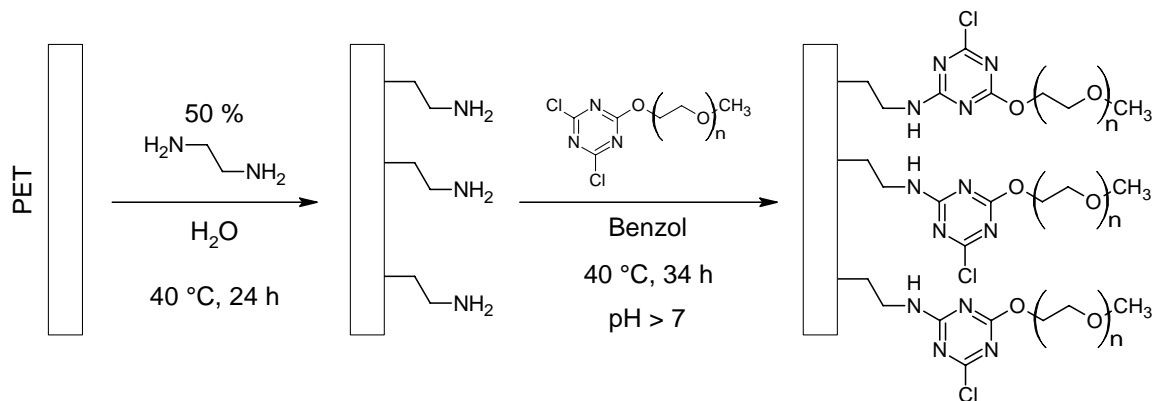


Abb. T13 Aminolyse des PET-Polymers mit Ethylendiamin und anschließende Reaktion mit Cyanurchlorid-aktiviertem Poly(ethylenglykol)

Bei einem Einsatz von OH-terminierten PEGs ließen sich nach einer Veresterung mit β -Alanin PET-Folien zur Peptidsynthese im Arrayformat erzeugen, die darüber hinaus resistent gegenüber unspezifischer Proteinadsorption wären.

Eine weitere Möglichkeit zur Oberflächenmodifikation von PET besteht in der sogenannten Graftpolymerisation. Dabei werden Monomere (z.B. Acrylsäure, Acrylsäureester, Acrylamid oder Poly(acrylsäure)) auf die Oberfläche quasi aufgepfropft. Den Start der meist UV-induzierten Polymerisation bilden dabei oberflächengebundene Polymerisationsinitiatoren, die entweder über eine Plasmaentladung³³, eine UV-Bestrahlung³⁴ oder über eine Kombination von UV-Bestrahlung und Ozonisierung³⁵ generiert werden können.

Die aus der Oberflächenmodifikation von verschiedenen Polymersorten resultierenden veränderten Eigenschaften wie beispielsweise Kontaktwinkel, Proteinresistenz, Adsorptionsfähigkeit von kleinen Molekülen, Fähigkeit zur Proteinimmobilisierung sind intensiv untersucht und beschrieben worden.³⁶

2.3 Laserdruckprozeß

2.3.1 Xerographie oder Elektrophotographie

Der Ausdruck Xerographie stammt aus dem Griechischen und bedeutet „trocken schreiben“. Die Xerographie steht damit im Gegensatz zu „nassen“ Schreibverfahren, wie Offset-, Tintenstrahldruck und dergleichen. Das Verfahren des Fotokopierens wurde 1938 von CARLSON erfunden und später auch patentiert.³⁷ 1947 ging die Lizenz an die Firma Haloid, die 14 Jahre später in Xerox umbenannt wurde. Parallel zu den Fotokopierern entwickelten sich, wenngleich zeitlich etwas verschoben, die Laserdrucker basierend auf derselben Technik. Prinzipiell wird bei dieser Methode ein vorher aufgeladener, photoleitender Träger (eine Platte oder eine beschichtete Walze) durch auftreffendes Licht an den belichteten Stellen entladen, so daß sich an diese wiederum elektrisch gegensinnig geladene Farbpartikel anlagern können. Das so entstandene Bild wird auf das zu bedruckende Material ebenfalls durch Ladungskräfte übertragen und anschließend fixiert. Während die ersten Kopierer bzw. Laserdrucker lediglich monochrom arbeiteten, sind seit Anfang der 1990er Jahre auch mehrfarbige Kopien oder Ausdrücke auf Xerographie-Basis möglich.

2.3.2 Aufbau und Funktionsweise eines Monochrom-Laser- bzw. LED-Druckers

Die zentrale Einheit eines Laserdruckers ist die sogenannte OPC-Walze („organic photo conductor drum“), die auch als Belichtungs- oder Bildtrommel bezeichnet wird. Auf ihr befindet sich eine dünne Schicht eines photoleitenden Polymers, welches früher über einen Koronadraht (Punkt 1, Abb. T14), heute über eine primäre Ladungswalze^c (PCR) elektrisch auf ihrer

^c primary charge roller: Der Wechsel hin zu den Ladungswalzen Mitte der 1990er Jahre war notwendig, da sich bei den Koronadrähten durch die hohe Spannung (5-15 kV) beim Aufladen der Bildtrommel Ozon bildete.

gesamten Breite aufgeladen wird. Diese Ladung bleibt solange erhalten, bis sie durch den Einfall von Licht (Laser oder LED) (Punkt 2) durch einen Ladungstransport innerhalb des Polymers gelöscht wird. Dies geschieht lediglich auf den belichteten Stellen der Trommel; es entsteht also ein elektrostatisches, lateral begrenztes Abbild des gewünschten Druckbildes auf

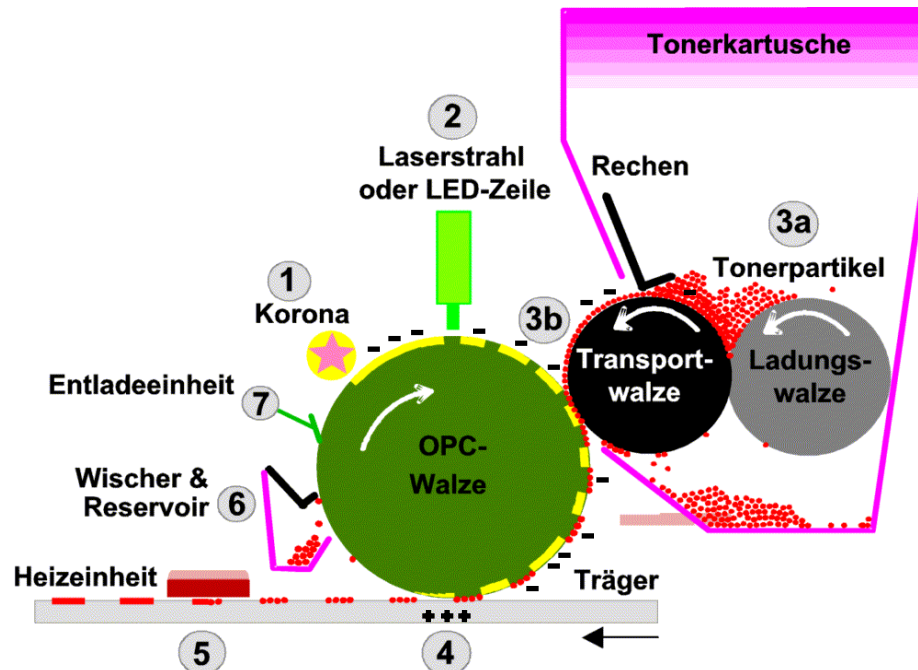


Abb. T14 Schematischer Aufbau eines Laser-/LED-Druckers

der Trommeloberfläche. Die in der Tonerkartusche befindlichen Tonerpartikel (Punkt 3a) werden durch Gegeneinanderreiben der Schaumstoff-beschichteten Ladungs- und Transportwalzen triboelektrisch^d aufgeladen. Sie erhalten dabei eine gleichsinnige Ladung, wie sie am Anfang die OPC-Walze erfahren hat. Ein Rechen sorgt dafür, daß sich eine gleichmäßige Partikelschicht auf der Transportwalze absetzen kann. Die noch geladenen Tonerpartikel werden beim Vorbeistreichen an der Bildtrommel auf die entladenen Stellen transportiert (Punkt 3b). Es entsteht dabei ein sichtbares Druckbild aus Tonerpartikeln auf der Bildtrommel. Die Tonerpartikel werden durch Anlegen einer entgegengesetzten Ladung von der Bildtrommel auf den gewünschten Träger (Papier, Folie, etc.) übertragen (Punkt 4) und mittels Hitze endgültig fixiert (Punkt 5). Überschüssige Tonerpartikel werden von der Bildtrommel entfernt (Punkt 6) und die photoleitende Schicht vollständig entladen (Punkt 7). Mit dem erneuten, kompletten Aufladen der Bildtrommel kann der Druckzyklus wieder von vorn beginnen.

2.3.3 Aufbau und Funktionsweise eines Farb-Laser- bzw. LED-Druckers

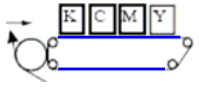
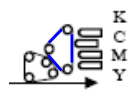
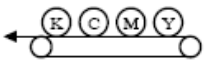

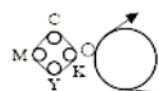
Für den farbigen Ausdruck von Dokumenten müssen die vier Farben Schwarz, Cyan, Magenta und Gelb (KCMY^e) getrennt voneinander auf das zu bedruckende Material gebracht

^d tribos [grch.]: „reiben“

^e KCMY für black, cyan, magenta und yellow

werden. Dies kann derart geschehen, daß zunächst das Bild mit den einzelnen Tonerfarben auf einem Transportband zusammengestellt und anschließend in einem Schritt auf das Papier oder die Folie übertragen wird (Transportzwischenband-, Zweibändermethode). Eine alternative Methode verfolgt das Ziel, durch **direkten** Druck der einzelnen Farbtonerkartuschen auf das Druckmaterial das farbige Bild ohne Zwischenablage auf dem Papier oder auf der Folie zu generieren (Tandem-, Stapel- oder Revolvermethode). Dabei erfolgt die Farbmischung für das Gesamtbild auf dem bedruckten Material. Diverse Methoden, wie sie in kommerziell erhältlichen Farbdruckern zum Einsatz kommen, zeigt Tabelle 3. Für den angestrebten Peptidlaserdrucker, d.h. einen Laserdrucker, der in der Lage sein soll, Aminosäure-Toner zu verdrucken, muß gewährleistet sein, daß er mehr als nur vier Druckwerke, nämlich zwanzig (entsprechend den zwanzig proteinogenen Aminosäuren) für den Druckprozeß aufnehmen und ansteuern kann. Infolgedessen bietet die Tandem- oder Inline-Methode den Konstruktionsaufbau der Wahl, da hier das Hinzufügen von weiteren 16 Druckwerken technisch am einfachsten zu realisieren scheint. Außerdem bietet der angelegte lineare Transportweg des zu bedruckenden Materials weniger restriktive Anforderungen an Flexibilität oder Materialdicke als bei einer Revolver- oder Zweibandkonstruktion. Somit wäre man durchaus in der Lage, durch technische Modifikation auch starre Medien, wie z.B. Glas zu bedrucken.

Tab. 3 Vergleich von elektrofotographischen Farbdrucksystemen ³⁸

Schema	Methode	Druckgeschwindigkeit	Charakteristika
	Transportzwischenband-	2-3 Seiten/Minute	hoher Tonerverbrauch durch Mehrfachdurchläufe
	Zweibänder-	3,5 Seiten/Minute	schwierige Farbmischung, zu langsamer Druck
	Tandem- oder Inline-	8 Seiten/Minute	Papierband muß gerade laufen, Entwicklereinheiten müssen exakt positioniert werden
	Stapel-	2 Seiten/Minute	nicht auf mehr Druckwerke erweiterbar; kein Transferband nötig; geringer Platzbedarf
	Revolver-	3 Seiten/Minute	nicht auf mehr Druckwerke erweiterbar

Das Tandemprinzip findet sich u.a. bei den Farblaserdruckern der Baureihe C7200 von OKI wieder. Genauer genommen sind diese Druckertypen LED-Drucker, da die einzelnen optischen Laserschreibereinheiten durch platzsparende LED-Zeilen ersetzt wurden (Abb. T15). Dadurch erreicht der Drucker trotz der linearen Anordnung seiner Druckwerke wieder kompakte Abmessungen.

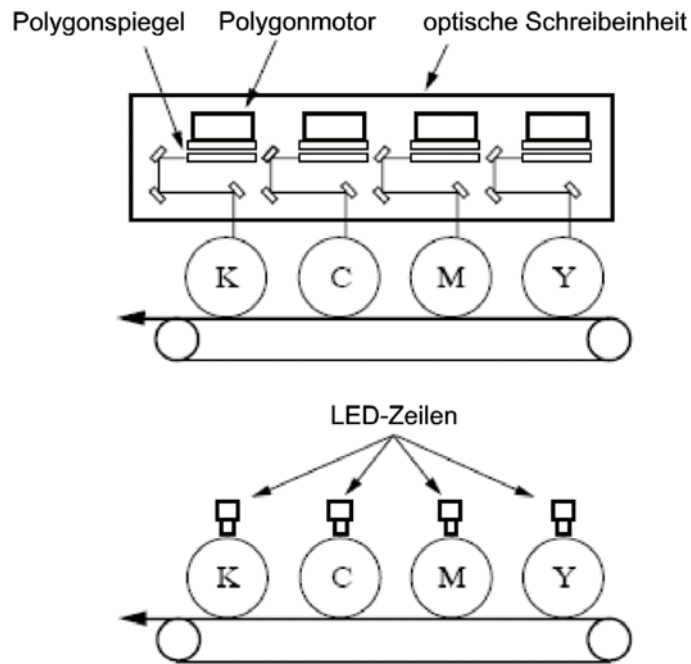


Abb. T15 Vergleich zwischen klassischen Laserdruckwerken und platzsparenden LED-Zeilen als Schreibeinheiten beim Tandemprinzip

Abbildung T16 zeigt einen Vergleich zwischen den beiden angesprochenen Belichtungssystemen. Beim Lasersystem (links) wird der erzeugte Laserstrahl durch ein Spiegelsystem fokussiert und gelenkt. Der Spiegel rotiert dabei sehr schnell und läßt den Laser auf der rotierenden Bildtrommel das latente Ladungsmuster erzeugen. Beim LED-Verfahren (rechts) sind die Lichtquellen kleine, hintereinander angeordnete LEDs („light emitting diodes“), die in einem schmalen Streifen über die gesamte Bildtrommel verteilt Licht zum Beschreiben der Walze aussenden. Die LED-Zeile ist dabei senkrecht zur Laufrichtung der Walze angeordnet. Da bei diesem System keine sich bewegenden Teile notwendig sind, ist ein präzises Drucken auf kleinstem Raum gewährleistet.

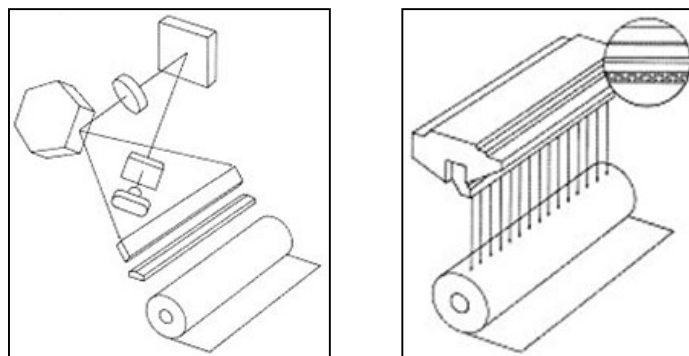


Abb. T16 Belichtungsprinzipien im Detail: Laser mit Polygonspiegeln (links), LED-Zeilen (rechts)

2.3.4 Der Toner - die „elektronische Tinte“ des Laserdruckers

2.3.4.1 Zusammensetzung

Die für die Xerographie bzw. Elektrophotographie notwendige Matrix zum Verdrucken des gewünschten Bildes wird als Toner bzw. Pulvertoner bezeichnet. Im Grunde ist dieser ein durch Reibung oder durch Zusatz von Magnetit aufladbares, bei Temperaturen um die 70 °C schmelzendes, farbgebendes Gemisch aus trockenen Partikeln, die sich in der Größenordnung von nur wenigen Mikrometern (5 – 30 µm) bewegen. Er besteht zum Großteil aus einem Harz (am häufigsten verwendet werden Polystyrol-*n*-Butylacrylat-Copolymere, gefolgt von Polyester- und Epoxyharzen). Dieses schmilzt in der Heizeinheit und fixiert die Tonerpartikel dicht nebeneinander auf dem zu bedruckenden Material. Es ergibt sich dadurch ein einheitliches Druckbild. Des weiteren enthalten Toner die notwendigen Farbpigmente (Ruß z.B. für die Farbe Schwarz), Oberflächenadditive zur Kontrolle der Fließ- und Reinigungseigenschaften, sowie Ladungskontrollreagenzien (CCA: charge control agents) auf der Basis organischer Azokomplexe (teilweise verlackt mit Metallen wie z.B. Al, Cu, Co oder Fe) oder anderer polycyclischer Verbindungen. Zugesezte Ladungsstabilisierungsreagenzien („charge stabilizer“) können sowohl eine negative als auch eine positive Ladung der Tonermischung aufrechterhalten.³⁹ Oft werden den Tonern auch Wachse beigemischt, um sie während und nach dem Fixieren auf dem Papier besser von der Heizwalze ablösen zu können. Sie werden prinzipiell in **Zwei-** und **Einkomponententoner** untergliedert, die im folgenden kurz charakterisiert werden.

Zweikomponententoner

Sie bestehen im Grunde aus dem eigentlichen Toner (mit all seinen erwähnten Bestandteilen) und einem zusätzlichen Transporter oder Träger (carrier), der dem Toner zugemischt werden muß. Der Transporter ist notwendig, um zum einen die notwendige Ladung zu erzeugen und zum anderen den Toner durch das Kartuschensystem zu befördern. Beim Aneinanderreiben von Toner und Transporter entstehen gegensinnige Ladungen, was dem Toner ermöglicht, sich über elektrostatische Kräfte an die Transporter-Kügelchen zu heften. Diese Toner-beladenen Transporter lassen sich nun mit eingebauten, rotierenden Magneten kontrolliert von Transport- zu OPC-Walze und letzten Endes auf das zu bedruckende Material befördern. Je nachdem, mit welchem Polymer der Transporter umhüllt ist, verleiht er dem Toner dabei eine negative (Methacrylat-Polymere) oder positive Ladung (Fluorpolymere).⁴⁰

Einkomponententoner

Auch der Einkomponententoner besteht aus den erwähnten Harzen, Ladungskontrollreagenzien, Pigmenten und Wachsen allerdings **ohne** zusätzlich beigemischten Transporter. Es gibt somit einige Punkte, in denen er seinem Zweikomponenten-Pendant überlegen ist. Zunächst wäre da das zusätzliche Volumen, das ein Transporter-Reservoir in der Tonerkartusche einnimmt. Mögliche Trends hin zu kompakteren Druckern oder Kopierern lassen sich dadurch schwieriger realisieren. Auf der anderen Seite wird das Ladungsniveau des Toners durch den Gehalt an Transporter definiert. Bedingt dadurch, muß die Zumischung des Transporters ständig kontrolliert und wenn nötig angepaßt werden. Eine zusätzlich eingebaute Sensorik und

Logik erhöhen die Kosten und den Aufwand. Um eine Ladung ohne Transporter-Kügelchen zu generieren, läßt man den Einkomponententoner an gegenläufigen Kunststoffrollen reiben. Je nach seiner chemischen Zusammensetzung lädt sich der Toner nun positiv oder negativ auf.

2.3.4.2 Ladungseigenschaften

Je nach Geräte- und Verfahrenstyp werden entweder solche Toner benötigt, die sich elektrostatisch positiv oder solche, die sich elektrostatisch negativ aufladen. Die bereits erwähnten Ladungsreagenzien als wichtige Tonerbestandteile sind dabei für Vorzeichen, Stärke und Stabilität der Aufladung verantwortlich. Wird ein Toner elektrostatisch aufgeladen, so gelten prinzipiell die Gesetzmäßigkeiten der Reibungselektrizität (Triboelektrik).⁴¹ Es lassen sich sogenannte triboelektrische Spannungsreihen aufstellen, die Auskunft darüber geben, wie sich zwei Reibungspartner bei Kontakt gegenseitig aufladen (Tab. 4). Der in der Spannungsreihe weiter oben stehende Reibungspartner lädt sich gegenüber seinem weiter unten stehenden negativ auf. So lädt sich beispielsweise Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) gegenüber Polystyrol (PS) elektrisch negativ aus, wobei Polystyrol dementsprechend positiv aufgeladen wird. Grundsätzlich ließe sich damit auch eine Tonermatrix durch Reiben an einem anderen Kunststoff aufladen. Allerdings würden die Ladungen schnell wieder abfließen. Für die Druckbarkeit eines Toners ist besonders wichtig, daß die Ladung mit dem gewünschten Vorzeichen möglichst rasch erzeugt und über längere Zeit aufrecht erhalten werden kann.

Tab. 4 Ausschnitt aus der triboelektrischen Spannungsreihe⁴²

	Polarität	Material
negativ	↑	PTFE, Teflon
		Silikon
		PVC (Polyvinylchlorid)
		PP (Polypropylen)
positiv		PU (Polyurethan)
		PS (Polystyrol)
		Polyester

Die zu diesem Zweck in die Tonerharze eingearbeiteten Ladungskontrollreagenzien haben einen großen Einfluß auf die Ladungseigenschaften und die Ladungsstabilität des Toners, obwohl sie nur einen geringen Anteil (5 %) im Toner repräsentieren. Beispielsweise haben Nigrosine, Triphenylmethane oder quartäre Ammoniumsalze den Effekt, den Toner insgesamt positiv aufzuladen, während Azopigmente oder verlackte Azopigmente (Abb. T17) zu einer negativen Aufladung führen.⁴³ Bei Variation der Substituenten, wie am Beispiel eines Triphenylmethans **7** (Triarylaminotriphenylmethan) untersucht wurde, verändern sich mitunter die Vorzeichen der Polarität.⁴⁴ Nach Ersetzen der drei Sulfonylgruppen durch Wasserstoff im Pigment kehrt sich

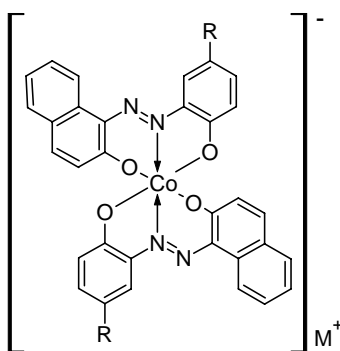


Abb. T17 Verlackter Kobalt-Azokomplex

die Polarität eines damit aufgebauten Toners von negativ nach positiv um (Abb. T18). Da es

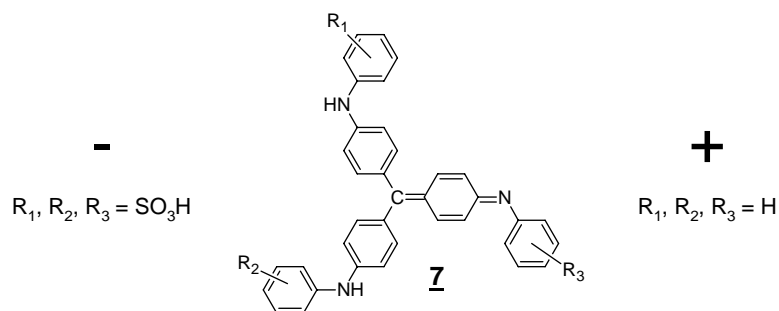


Abb. T18 Substituententausch bei einem Triphenylmethan-Pigment und resultierende Polaritätsumkehr des Toners

auf dem Markt auch Fotokopierer und Laserdrucker gibt, die positiv geladenen Toner verdrucken können, läßt sich durch die Wahl des CCA der benötigte Toner während der Produktion leicht anpassen. Charakterisiert werden die Toner durch die Bestimmung des Verhältnisses aus Ladung und Masse (Q/m) in Einheiten von $\mu\text{C/g}$. Der Wert wird berechnet, indem eine bestimmte Menge Toner abgewogen, triboelektrisch aufgeladen und die Gesamtladung in einer isolierten Faraday-Zelle mit einem Elektrometer gemessen wird.⁴⁵

2.3.4.3 Tonerherstellung⁴⁶

Die klassische Herstellung von Toner beruht auf einem einfachen Verfahren. Zunächst werden Polymer, Farbpigment und CCA in einem Extruder (sog. Schneckenpresse; siehe Abb. T19^f) vermischt und kräftig geknetet. Dies geschieht bei einer Temperatur, bei der das Polymer eine hohe Viskosität aufweist (150-200 °C). Höhere Temperaturen, bei denen das Polymer bessere Fließeigenschaften besitzt, führen nicht zu einer besseren Dispersion der Tonerbestandteile. Niedrigere Temperaturen wiederum erfordern zuviel Kraft, um das Gemisch zu mischen und zu kneten.

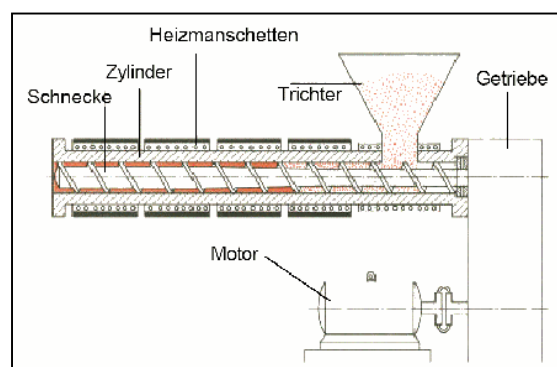


Abb. T19 Querschnitt durch eine Schneckenpresse

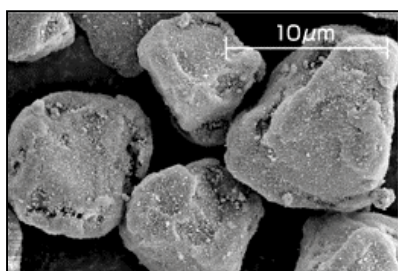


Abb. T20 Konventionell hergestellte Tonerpartikel in einer SEM-Aufnahme

Das Gemisch läßt man abkühlen und pulverisiert es in einer Mühle. Die einzelnen Fraktionen, die sich in ihrer Partikelgröße unterscheiden, lassen sich anschließend durch Sieben voneinander trennen und charakterisieren. Am Ende werden dem fertigen Tonerpulver bei Bedarf Zusätze wie Oberflächenadditive (Silicapartikel) oder Wachse hinzugemischt. Dies geschieht beispielsweise, indem man die Additive in einen Luftstrom injiziert, der das Tonerpulver transportiert und kontinuierlich verwirbelt. Die so erhaltenen, unregelmäßig geformten Tonerpartikel in Größenordnungen

^f aus: <http://www.mischer.com/aktuell/extruder.htm>

von etwa 10 µm Durchmesser (Abb. T20[§]) genügen den Anforderungen an übliche Kopierer bzw. Laserdrucker.

Für zukünftige Anwendungen ist man bestrebt, die Partikelgröße weiter zu reduzieren und dabei gleichzeitig eine möglichst enge Größenverteilung sicherzustellen, da diese Partikeleigenschaften maßgeblich die Auflösung des Druckbildes bestimmen. Zu diesem Zweck entwickelte man neue Methoden, die unter den Begriffen „chemisch produzierter Toner“ (CPT) bzw. „Polymerisationstoner“ zusammengefaßt werden. Eine Technik davon, die sogenannte **Emulsionsaggregations-Polymerisation (EA)**, generiert Submikropartikel aus Monomeren (z.B. Styrole, Acrylate) mit Hilfe ionischer sowie nicht-ionischer Emulgatoren und einem wasserlöslichen Initiator in einer wäßrigen Lösung. Anschließend aggregieren die Submikro- zu Mikropartikeln. Die ersten Toner auf EA-Basis wurden von Fuji Xerox und Konica Minolta entwickelt.

Eine zweite Möglichkeit besteht in der **Mikrosuspensions-Polymerisation (MSP)**, bei der, ähnlich der EA-Polymerisation, ebenfalls Monomere in Wasser polymerisiert werden, allerdings ohne vorheriges Aggregieren direkt zu Partikeln im Mikrometerbereich. Die Kontrolle der einzelnen Parameter (Hitze, Menge an Emulgator, Polymerisationsgrad) kompliziert den Produktionsprozeß, liefert allerdings eine enge Größenverteilung. Toner auf MSP-Basis werden hauptsächlich von Nippon Zeon, Canon und Ricoh hergestellt. Beide Verfahren erzeugen Tonerpartikel mit einer einheitlichen, nahezu kugelförmigen Gestalt in der Größenordnung von bis zu 5 µm Durchmesser (Abb. T21[§]).

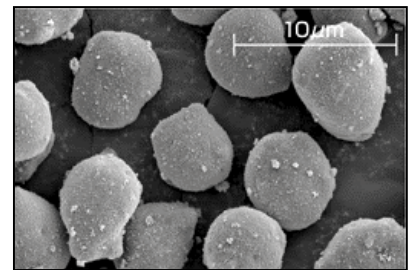


Abb. T21 SEM-Aufnahme eines Polymerisationstoners

2.4 Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen

2.4.1 Nachteile unspezifischer Proteinadsorption

Die Adsorption von Biomolekülen oder Zellen bzw. Zellbestandteilen auf Oberflächen ist nicht in jedem Falle erwünscht. In bestimmten Situationen ist es von enormer Wichtigkeit, diese Art der Wechselwirkung zu verhindern. So verursachen beispielsweise große Ansammlungen von Muscheln, Seepocken oder Algen an Schiffsrümpfen erheblichen zusätzlichen Widerstand während der Fahrt durch das Wasser und führen dabei zu einem erhöhten Treibstoffverbrauch und längeren Reisezeiten. Man verhindert diesen oftmals zentimeterdicken Befall herkömmlich mit sogenannten Antifouling-Anstrichen. Die in diesen Farbanstrichen enthaltenen bioziden Substanzen, wie z.B. Kupferverbindungen oder organische Zinnkomplexe (z.B. Tributylzinn [TBT]), halten zwar den Schiffsrumpf sauber, lösen sich jedoch im Fahr-

[§] aus: http://www.konicaminolta.com/yourcolours/how_colour_copiers_work/h_c_copiers_work004.html

wasser auf und sind eine Belastung für das gesamte Ökosystem. Die Giftstoffe, die nachweislich das Immunsystem schwächen und in das Hormonsystem eingreifen, finden sich mittlerweile in fast allen Speisefischen und gelangen über die Nahrungskette letztendlich auch in den menschlichen Körper. Nach alternativen Beschichtungsmethoden wird intensiv geforscht und erste Anwendungen befinden sich in der Erprobung.⁴⁷

Aber auch die Oberflächen von medizinischen Implantaten, Prothesen oder Kathetern sind einer unerwünschten Proteinadsorption ausgesetzt. Die entstehenden Ablagerungen biologischen Materials werden vom lebenden Organismus als Fremdkörper erkannt und das künstliche Implantat in der Endkonsequenz abgestoßen.⁴⁸ Diese „Bioinkompatibilität“ ist ein ernsthaftes Problem bei der Entwicklung von Medizinprodukten. Auch bei Biodiagnostika oder in der Bioanalytik versucht man, die unspezifische Proteinadsorption als störenden Hintergrundfaktor zu minimieren, um möglichst hohe Signal-Rausch-Verhältnisse zu erhalten.

Tab. 5 Wesentliche Einflußfaktoren der Proteine, des Materials und des Mediums auf die Proteinadsorption

Einflußfaktoren auf die Proteinadsorption durch		
Protein	Material	Medium
– Proteinkonzentration	– chemische Oberflächenbeschaffenheit	– pH-Wert
– Größe des Proteins	– Oberflächentopologie	– Ionenstärke
– Molekulargewicht	– freie Oberflächenenergie	– Viskosität
– dreidimensionale Struktur in Lösung	– Stabilität im entsprechenden Medium	– Temperatur
– Aminosäuresequenz	– Oberflächenladung	– Strömungsphänomene
– Nettoladung und Ladungsverteilung	– Grenzflächendynamik	– Druck
– Dichte und Verteilung hydrophober bzw. hydrophiler Bereiche	– Quellbarkeit	– niedermolekulare Bestandteile
– isoelektrischer Punkt	– Anordnung hydrophober bzw. hydrophiler Bereiche	

Bei Immunoassays beispielsweise erreicht man dies standardmäßig, indem man auf die zu untersuchenden Probenträger vor der Inkubation mit Antikörpern oder Proteinen gepufferte Lösungen von BSA (bovine serum albumine), Gelatine, Myoglobin oder Milchpulver gibt, um noch zugängliche Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im Falle des BSA kann - abhängig vom betrachteten System - die unspezifische Adsorption nicht gänzlich verhindert werden (15 %).⁴⁹

Die Proteinadsorption auf Oberflächen ist ein komplexes Phänomen und als solches von verschiedenen Faktoren abhängig, wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist.⁵⁰

2.4.2 Möglichkeiten der Verringerung unspezifischer Proteinadsorption durch gezielte Oberflächenmodifikationen

Phänomenologisch kann für die meisten hydrophoben Oberflächen eine hohe Proteinadsorptionsfähigkeit festgestellt werden. Dabei werden Tendenzen zu konformativen Änderungen des Proteins bis hin zu dessen Denaturierung beobachtet. Hydrophile Oberflächen hingegen lassen weniger Proteinadsorption zu.⁵¹ Zugleich läßt sich bei der Analyse räumlicher Strukturen von Proteinen in wäßrigen Lösungen feststellen, daß die unpolaren Regionen globulär ausgebildeter Proteine eher im Inneren des Makromoleküls zu finden sind. Die geladenen oder stark polaren Bereiche hingegen befinden sich auf der dem Medium zugewandten Peripherie und sind von einer Hülle aus Wassermolekülen umgeben. Bei der Annäherung eines Proteins an eine Materialoberfläche durch Diffusion treten die hydrophoben Regionen des Proteins mit einer ebenso hydrophoben Oberfläche in Wechselwirkung (Abb. T22). Überwiegen dabei die attraktiven Kräfte, führt dies zu einer Adsorption. Die dabei auftretende Verdrängung der Hydrathüllen von Protein und Oberfläche hat einen Entropiegewinn zur Folge. Bei einer weiteren Verweildauer auf dem Substrat werden die Peptidketten mehr und mehr deformiert und bilden weitere Bindungen zur Substratoberfläche aus. Die strukturelle Integrität des Proteins und eventueller reaktiver Zentren oder Bindungstaschen werden dadurch zerstört. Die Oberflächenmodifizierung auf der Basis hydrophiler Polymere ist daher ein möglicher Ansatzpunkt zur Unterdrückung der unerwünschten Proteinablagerung bzw. Zelladhäsion. Dazu werden u.a. Polysaccharide (z.B. Agarose, **8**), Phospholipide, präadsorbierte Proteine, Poly(hydroxymethylmethacrylat) (als polymeres Hydrogel, **9**) oder Oligo- bzw. Poly(ethylenglykole) (PEG, **10**) unterschiedlicher Kettenlänge verwendet (Abb. T23).

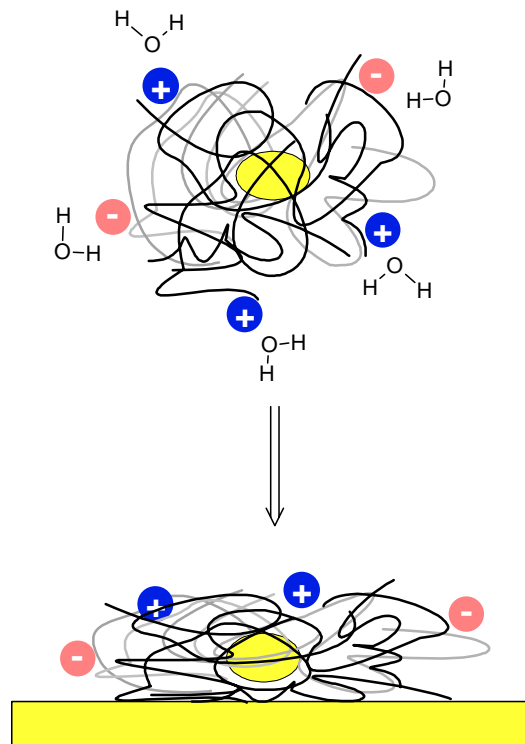


Abb. T22 Adsorption eines Proteins in wäßrigem Medium auf eine Substratoberfläche

Der Einsatz von Poly(ethylenglykolen) ist derzeit die effektivste Methode, unerwünschte Proteinadsorptionen oder Zelladhäsionen zu verhindern.⁵²

2.4.3 Verwendung von Poly- (PEG) bzw. Oligo(ethylenglykolen) (OEG) zur Verringerung unspezifischer Proteinadsorption auf Oberflächen

Poly(ethylenglykol) (PEG) ist je nach Kettenlänge ein flüssiges oder festes, chemisch inertes, wasserlösliches und untoxisches Polymer mit Molekulargewichten bis zu mehreren Millionen g/mol. Chemisch handelt es sich um einen Polyether des Glykols (Ethandiol). PEGs sind fast unbegrenzt in Wasser mischbar. Selbst bei einem Molekulargewicht von 3500 g/mol sind noch 50 %ige wäßrige Lösungen herstellbar. Die gute Wasserlöslichkeit ist auf die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Ether-Sauerstoffen zurückzuführen. Die Polyethylenglykole weisen außergewöhnlich niedrige Toxizitätswerte auf (akute und chronische orale Toxizität, Embryotoxizität, Hautverträglichkeit). Sie werden daher seit Jahrzehnten in Kosmetika, Nahrungsmitteln und pharmazeutischen Zubereitungen verwendet.

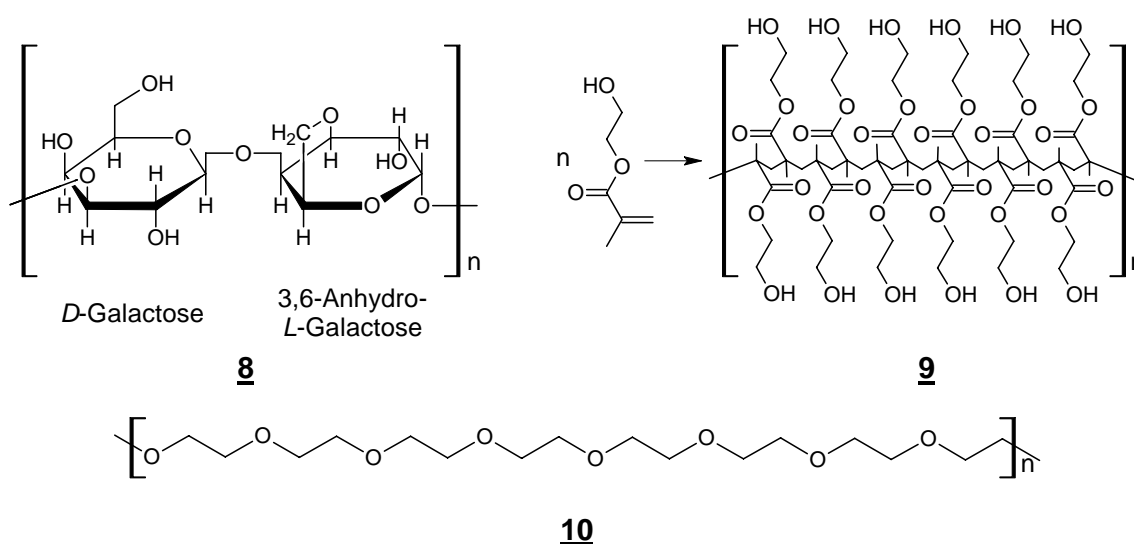


Abb. T23 Beispiele hydrophiler Polymere zur Modifikation proteinresistenter Oberflächen

In letzteren aber auch, um eine optimierte Wirkstoffkonjugation bzw. -freisetzung sicherzustellen.⁵³

Zur Oberflächenmodifizierung steht eine Reihe von Techniken zur Verfügung. An dieser Stelle sei nur eine kleine Auswahl angeführt. **Chemisch direkt** angebunden werden können beispielsweise:

- silanierte PEG-Einheiten auf oxidischen Oberflächen (z.B. Glas),⁵⁴
- PEGs mit zum Aldehyd oxidierten OH-Gruppen auf chlorierten Si(111)-Oberflächen,⁵⁵
- PEGs auf aminoterminiertem Polystyrol (PS), auf das vorher Poly(ethylenimin) (PEI) adsorbiert wurde,⁵⁶

- PEG-Glykolate (Na-PEG) mit halogenierten Oberflächen von Polypropylen (PP) und Polyethylenterephthalat (PET) über eine WILLIAMSONSche Ethersynthese⁵⁷

oder aber durch eine **Graftpolymerisation** (auch **Pfropfpolymerisation**) auf Oberflächen aufgebracht werden:

- Poly(ethylenglykol)monomethacrylat (PEGMA) auf Si(100);⁵⁸
- Poly(ethylenglykol)acrylat auf PMMA-Oberflächen (Plexiglas);⁵⁹
- UV-induzierte Graftpolymerisation von Methoxy-Poly(ethylenglykol)monomethacrylat (MeO-PEGMA) auf mit Plasma vorbehandelten Teflonfilmen (PTFE)⁶⁰ oder auf Naturgummi.⁶¹

Bei selbstorganisierenden Monoschichten aus Alkanthiol-terminierten Oligo(ethylenglykolen)^h (OEG) auf Gold sind die entstandenen Filme ebenfalls resistent gegenüber einer kinetisch irreversiblen Adsorption von Proteinen (z.B. Fibrinogen), obwohl nur wenige EG-Einheiten notwendig sind (ab $n = 2$).⁶² Die Fähigkeit zur Proteinresistenz verbessert sich dabei mit zunehmender Länge der Ethylenglykol-Ketten. An Filmen mit $n = 3$ auf Silber und Gold mit einer terminalen Methoxygruppe konnte gezeigt werden, daß die Konformation der OEG-Einheiten (helikal oder all-trans) Einfluß auf die Proteinresistenz der Monoschicht hat.⁶³ Die Konformation dieser OEG-Einheiten sind packungsbedingt auf Silber helikaler Natur und führen zu einem Verlust der Proteinresistenz, während sie auf Goldoberflächen durch eine all-trans-Anordnung der OEG-Einheiten erhalten bleibt.

Die gewonnenen Erkenntnisse flossen bereits in zahlreiche biotechnologische und medizinische Entwicklungen und in die daraus resultierenden Anwendungen ein. Als Beispiele zu nennen sind Substrate für Zellkulturen⁶⁴, Beschichtungen für Kontaktlinsen⁶⁵ oder Verbesserungen für Biosensoren.⁶⁶

^h HS-(CH₂)₁₁-(OEG)_{*n*}-OR

3. Ergebnisse

3.1 Oberflächenmodifikationen

3.1.1 Modifizierung von Cellulose

Für erste Tests zum Drucken und Koppeln von Aminosäuretoner (siehe Kapitel **3.5**) eignete sich besonders gut Cellulose in Form von handelsüblichem Whatmanpapier, welches durch Veresterung mit Fmoc- β -Alanin und anschließende Entschützung aminoterminiert wurde.⁶⁷ Das Carbodiimid (DIC) wurde dabei zunächst in 1,2-fachem, das Methylimidazol (NMI) in zweifachem Überschuß zur Aminosäure in trockenem DMF eingesetzt. Durch Erhöhung der Konzentration der einzelnen Komponenten unter Beibehaltung der relativen Verhältnisse zueinander lassen sich verschiedene Dichten an Aminogruppen pro Flächeninhalt generieren (Abb. E1 rechts). Für einen rein qualitativen Test des verdruckten Toners ist dies allerdings unerheblich, da für eine Blaufärbung mit Bromphenolblau Dichten von > 1 nmol/cm² ausreichend sind, wie eigene Beobachtungen gezeigt haben.

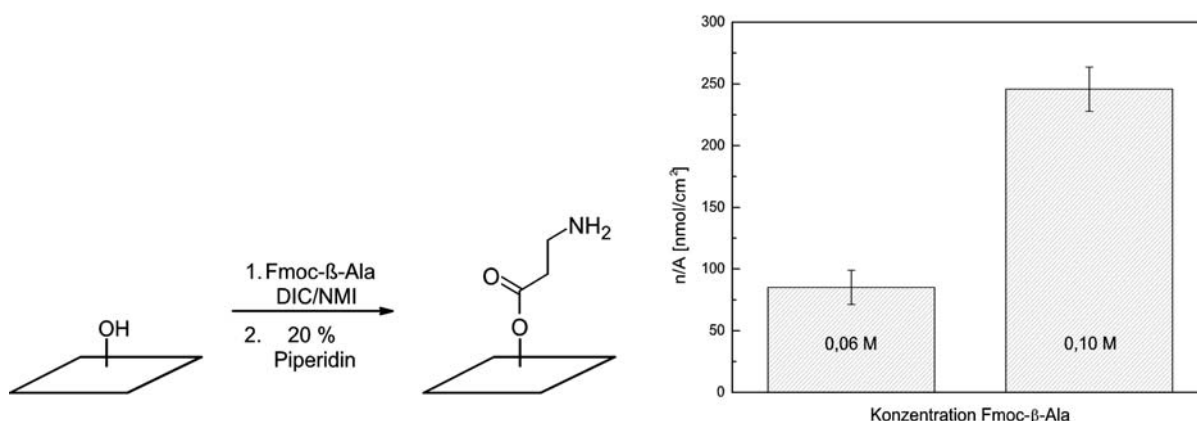


Abb. E1 Reaktionsschema zum Einführen von Aminogruppen auf Cellulose und Belegungsdichten bei unterschiedlichen Aminosäurekonzentrationen

Nach dem Ausdruck eines vorgegebenen Druckmusters mit Aminosäuretoner auf das derivatisierte Whatmanpapier wird dieses unter mechanischem Druck auf eine Temperatur zwischen 100 °C und 150 °C erhitzt und dadurch die Kopplung der voraktivierten Aminosäure gestartet.

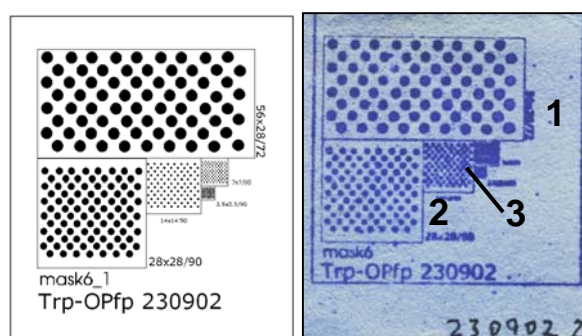


Abb. E2 Druckmuster (links) und mit Tryptophan-Toner bedruckte, modifizierte Cellulosemembran nach Anfärben der freien Aminogruppen mit Bromphenolblau (rechts)

Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Essigsäureanhydrid acetyliert und die Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin abgespalten. Nach Anfärben der Membran mit Bromphenolblau erhält man ein Bild wie in Abbildung E2 rechts dargestellt.

Die dunkelblau erscheinenden Spots, aber auch sämtliche Buchstaben und Linien stammen von gekoppelten und entschützten Aminogruppen des verdruckten Tryptophan-Toners. Die gesamte Membran erscheint ebenfalls leicht bläulich. Dies läßt sich auf Reste von Bromphenolblau zurückführen, die sich in die Cellulosefasern der Membran eingelagert haben. Deutlich erkennbar sind die Punktraster 1 (ca. 18 pro cm²) und 2 (ca. 45 pro cm²). Überlappungen der Punkte treten bereits bei Raster 3 (ca. 184 pro cm²), bedingt durch die Grobfaserigkeit der Cellulose, auf. Kleinere Strukturen sind mit bloßem Auge nicht mehr zu erkennen.

3.1.2 Modifizierung von Laserdruckerfolien aus PET

Es konnte gezeigt werden, daß es prinzipiell möglich ist, PET-Folien (Abb. E3 links) für einen Einsatz als Peptidsyntheseträger umzuwandeln. Sie sind gegenüber den für Peptidsynthesen gängigen Lösungsmitteln und Reagenzien wie DMF, Piperidin und Methanol resistent und sie sind hitzestabil (Schmp. 240-250 °C⁶⁸), was sie für Laserdruckeranwendungen prädestiniert. Ein Stabilitätsproblem besteht gegenüber Trifluoressigsäure (TFA). Diese wird am Ende der Peptidsynthese verwendet, um die Seitenschutzgruppen der Aminosäuren abzuspalten. Die hydrolyseempfindlichen (Poly-) Estergruppen werden von TFA angegriffen und die Folien lösen sich binnen Minuten in 91 %iger TFA in Dichlormethan komplett auf. Der Vollständigkeit halber werden die Ergebnisse mit aufgeführt.

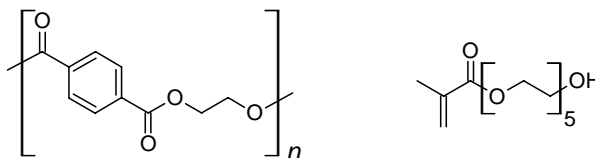


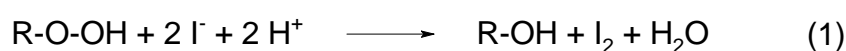
Abb. E3 Polyethylenterephthalat (PET) links; Poly(ethylenglykol)-methacrylat (PEGMA₅) rechts

Es war geplant, die Oberfläche der PET-Folie mit Poly(ethylenglykol)-Einheiten (PEG-Einheiten) zu versehen, um die unspezifische Proteinadsorption zu minimieren (siehe Kapitel 3.2). Die guten Quelleigenschaften einer solchen PEG-Schicht sollten es den aktivierten Aminosäure-Derivaten erlauben, gut an die gewünschten Syntheseorte vordringen zu können und dadurch die Effizienz der einzelnen Kopplungsschritte zu maximieren. Ferner sollten genügend funktionelle Gruppen auf der Oberfläche zugänglich sein, um später eine große Anzahl an synthetisierten Peptiden pro Flächeninhalt zu gewährleisten. All diese Anforderungen würden gegriftete („aufgepfropfte“) PEG-terminierte Polyacrylatpolymere erfüllen, deren Grundeinheit, das Poly(ethylenglykol)-methacrylat (PEGMA₅), in Abbildung E3 rechts zu sehen ist. Mit Hilfe von UV-Licht lassen sich beispielsweise derartige Polymere kovalent auf voraktivierte Oberflächen mit photosensiblen Gruppen aufbringen.

Die einzelnen Schritte zur Herstellung eines PEG-grafteten PET-Polymers wären daher:

1. die Einführung reaktiver Hydroperoxidgruppen,
2. die UV-induzierte Graftpolymerisation mit PEGMA₅ und
3. die Derivatisierung der endständigen OH-Gruppen mit β -Alanin

zu 1.: Da zu Beginn des Projektes noch kein Ozonisator zur Verfügung stand, erfolgte die Einführung der Hydroperoxidgruppen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und UV-Licht⁶⁹. Probleme traten dahingehend auf, daß die einzelnen Folienproben durch kleine Gasbläschen Auftrieb erfuhren und somit direktem UV-Licht ausgesetzt waren, was zu einer Gelbfärbung führte. Durch Befestigung der Folien am Boden des entsprechenden Glasgefäßes mittels Klebstoff ließ sich dies größtenteils vermeiden. Die erzeugten Peroxide reagieren mit einer gesättigten Iodidlösung zu elementarem Iod (1), welches seinerseits mit den überschüssigen



Iodidionen zum Triiodid-Anion I_3^- weiterreagiert (2). Das Reaktionsprodukt ist UV-aktiv und durch dessen photometrische Bestimmung bei 360 nm läßt sich indirekt die Menge an Hydroperoxidgruppen quantifizieren. In Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer ergibt sich folgendes Bild (Abb. E4):

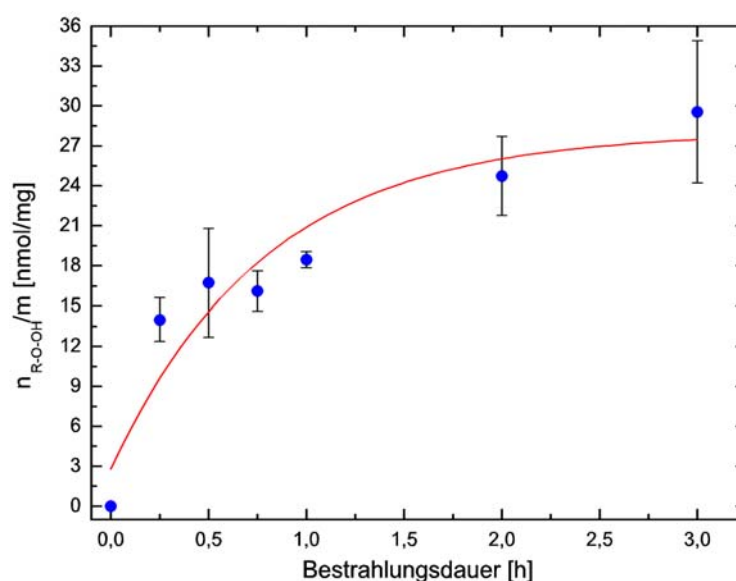
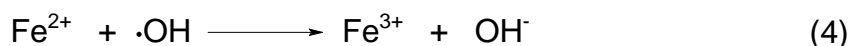
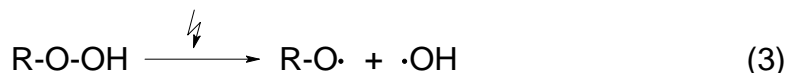


Abb. E4 Iodometrische Bestimmung des Gehaltes an R-O-OH auf bestrahlter PET-Folie

Man erkennt eine zahlenmäßige Zunahme der Peroxogruppen, bis nach ca. 2,5 Stunden eine Sättigung von ungefähr 27 nmol/mg erreicht ist. Mit erfaßt werden auch eventuell in die Unterseite der Membran diffundierte Wasserstoffperoxid-Anteile, da diese mit eindringendem Iodid genauso reagieren würden.

zu 2.: Die peroxidierten Folien wurden anschließend in einer wäßrigen Lösung von 5 v% PEGMA₅ und 2 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6 H₂O unter Stickstoff eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Die Lösung erwärmte sich aufgrund der Nähe zur UV-Quelle (10 cm) auf ca. 45 °C und enthielt am Ende der Bestrahlung gelbliche Ausflockungen. Dieser Niederschlag ist ausgefallenes Eisen(III)-hydroxid (5), das sich bei der



Reaktion der Hydroxy-Radikale mit Fe²⁺ bildet. Die bei der photolytischen Spaltung der polymergebundenen Hydroperoxidgruppen entstehenden Hydroxy-Radikale (3) würden ihrerseits in gleicher Weise die Polymerisation von PEGMA₅ starten, was allerdings zur verstärkten Ausbildung eines nicht mehr oberflächengebundenen Polymers führen würde (Homopolymer). Die zugesetzten Eisen(II)-ionen minimieren diese Nebenreaktion. Mögliche Homopolymer-Reste können durch eine Extraktion in heißem Wasser entfernt werden.

Beim Vergleich der aufgenommenen C1s-XP-Detailspektren (Abb. E5) und insbesondere der berechneten Peakverhältnisse (Tab. 6) fällt auf, daß im Falle der PEG-gegrafteten Folien die Verhältnisse der unterschiedlichen Kohlenstoffspezies nicht mit den theoretischen Werten übereinstimmen. Es kann daher angenommen werden, daß die erreichte Filmdicke des Polymers noch nicht ausreicht, um die emittierten Elektronen aus dem PET-Substrat vollständig abzuschwächen. Somit werden die Elektronen der Benzenkohlenstoffe aus dem PET gemeinsam mit den Alkylkohlenstoffen des Acrylatpolymers erfaßt (C-C, C=C). Ebenso muß man bei den Signalen für C-O und C=O davon ausgehen, daß sie sich aus PET-Substrat und PEG-Graftpolymer zusammensetzen.

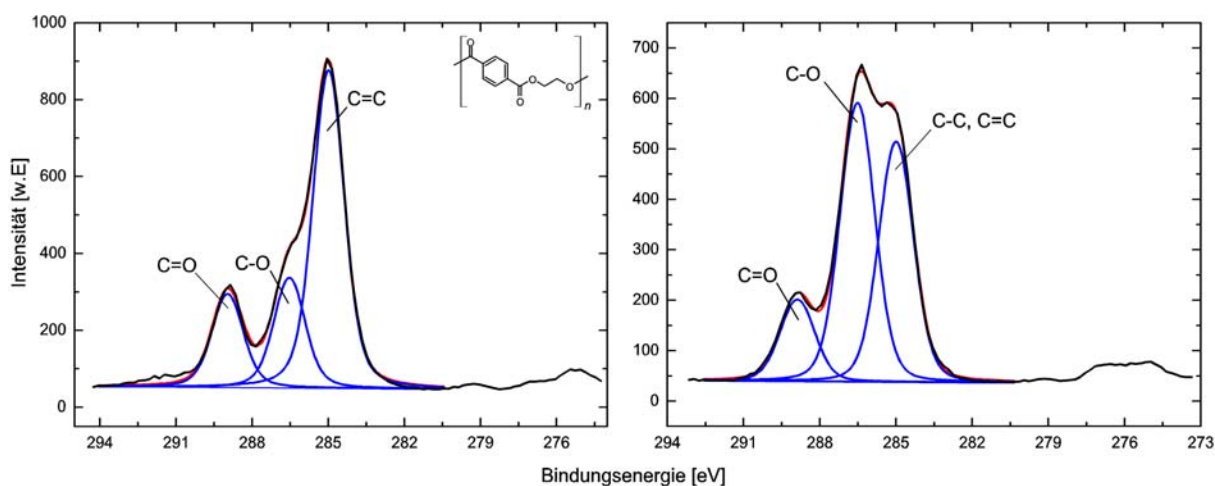


Abb. E5 C1s-XP-Detailspektren von unbehandelter PET-Folie (links) und von PET-Folie nach UV-Bestrahlung in H₂O₂ und Grafting mit PEGMA₅ (rechts)

Tab. 6 Berechnete und experimentelle C1s-Peakverhältnisse von unbehandelter (links) und PEG-gegrafteter PET-Folie (rechts)

	C=O	C-O	C=C		C=O	C-O	C-C
ber.	2	2	6		1	10	3
exp.	1,7	2,0	5,9		1,0	3,5	3,0

Dasselbe trifft für die Verhältnisse der Sauerstoffspezies zu (Abb. E6). Auch hier wird das theoretische Verhältnis zwischen Carboxyl- und PEG-Sauerstoff von 1 : 6 nicht erreicht. Das gemessene Verhältnis von 1,0 : 2,8 deutet allerdings darauf hin, daß ein Zuwachs an PEG-Einheiten zu verzeichnen ist (Tab. 7).

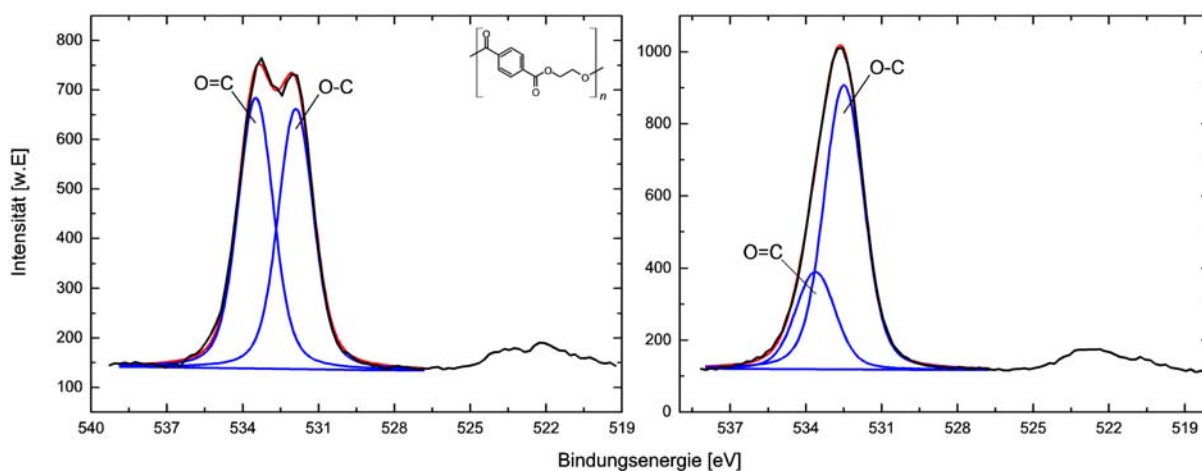


Abb. E6 O1s-XP-Detaillspektren von unbehandelter PET-Folie (links) und von PET-Folie nach UV-Bestrahlung in H₂O₂ und Grafting mit PEGMA₅ (rechts)

Tab. 7 O1s-Peakverhältnisse von PET-Folien (unbehandelt: links; ge-graftet: rechts)

	O=C	O-C		O=C	O-C
ber.	2	2		1	6
exp.	2,0	1,9		1,0	2,8

zu 3.: Die Einführung von Aminogruppen (Abb. E7) gelang mit einer einfachen Veresterung der endständigen Hydroxygruppen mit Fmoc-β-Alanin nach der Carbodiimid-Methode und

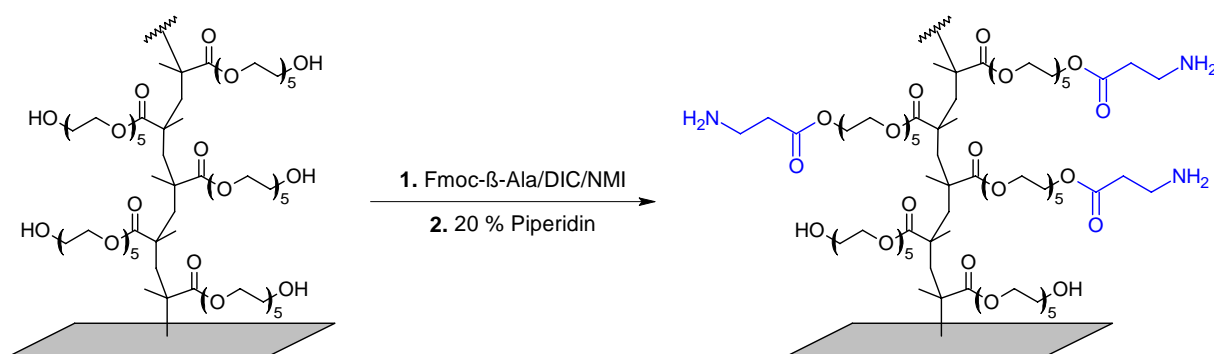


Abb. E7 Schema zur Derivatisierung PEG-gegrafteter Oberflächen mit β-Alanin und DIC/NMI

anschließendem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin. Die erreichte Aminogruppendichte nach einer Reaktionszeit von drei Stunden betrug bei einer PEG-gegrafteten Folie ca. 35 nmol/cm^2 .

Für einen einfachen qualitativen Test wurde ein Druckmuster mit einem Fmoc-Asparaginsäure-Toner direkt auf die derivatisierte Folie gedruckt und bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ für 45 Minuten gekoppelt. Nach Blockieren der verbliebenen Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid und Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurden die daraus resultierenden Aminogruppen mit Bromphenolblau angefärbt.



Abb. E8 Druckmuster mit Aminosäuretoner auf Papier (links) und derivatisierte PET-Folie nach Kopplung, Waschen und Anfärben mit Bromphenolblau

In Abbildung E8 rechts erkennt man die groben Strukturen des Punktrasters 1 mit 72 Spots (ca. 18 pro cm^2), sowie das benachbarte Raster 2 mit 90 Spots (ca. 45 pro cm^2). Schlechter zu erkennen sind die höher aufgelösten Felder (Raster 3). Außerdem verliert die Folie nach der Graftpolymerisation ihre Transparenz und die glatte Oberfläche.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es möglich ist, peroxidierte PET-Laserdruckerfolien mit Poly(ethylenglykol)-methacrylat zu graften und zu funktionalisieren. Außerdem gelingt das Aufdrucken von Aminosäuretoner und die anschließende Kopplung bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Folien werden bei der Bestrahlung mechanisch und chemisch stark beansprucht, erkennbar an der Eintrübung und Ausbildung kreisrunder Flecken auf der Oberfläche. Es lassen sich mit bloßem Auge Strukturen von ca. 45 Spots/cm^2 erkennen. Unter Zuhilfenahme einer Lupe mit zehnfacher Vergrößerung läßt sich das Muster mit 184 einzeln angeordneten Spots pro cm^2 ansatzweise erkennen (Raster 3 in Abb. E8). Aufgrund der Instabilität gegenüber TFA ist eine Verwendung als Peptidsyntheseträger jedoch ausgeschlossen. Die PEG-beschichteten Folien besitzen vermutlich ähnlich gute proteinresistente Eigenschaften, wie sich später auf ähnlich modifizierten Glasoberflächen zeigte (siehe Kapitel 3.2). Sie wären daher durch den Einbau diverser Funktionalitäten für Protein-, Peptid- oder DNA-Fragment-Immobilisierungen verwendbar.

Die Entscheidung für die Glasträger beruht im Grunde auf vier markanten Eigenschaften bzw. Tatsachen: Sie sind a) gegenüber erhöhten Temperaturen formstabil, besitzen b) weniger Eigenfluoreszenz als vergleichbare Kunststoffe, sind c) chemisch weitgehend resistent und sie lassen sich d) mit Hilfe eines Laserdruckers bedrucken.

3.1.3 Modifizierung von Glasoberflächen

Um auf handelsüblichem Glas in Form von Objektträgern oder größeren Scheiben chemische Reaktionen, Immobilisierungen von Biomolekülen oder gar Festphasensynthesen durchführen zu können, bedarf es verschiedener Oberflächenmodifikationen. Diese müssen zum einen reaktive Gruppen (Ankergruppen) als Angriffspunkte für Reagenzien bereitstellen und zum anderen die Eigenschaften der „neuen“ Oberfläche so gestalten, daß die physikalisch-chemischen Parameter anwendungsbezogen variiert werden können. Ähnlich wie bei den modifizierten PET-Folien sollen auch auf Glas PEG-Einheiten über eine UV-induzierte Graftpolymerisation aufgebracht und anschließend weiter funktionalisiert werden. Zuvor muß allerdings auf dem Glas eine Silanmonoschicht aufgebracht werden, auf der dann für eine Graftpolymerisation notwendige photosensitive Gruppen erzeugt werden können. Die vier Schritte zur Modifizierung von Glas sind daher im folgenden: **I.** die *Silanisierung*, **II.** das *Einführen photosensitiver Hydroperoxidgruppen*, **III.** die *radikalische Graftpolymerisation mit PEG-methacrylat (PEGMA₅)* und **IV.** die *Funktionalisierung mit Aminogruppen*.

3.1.3.1 Silanisierung

Für die Silanisierung von Glasoberflächen gibt es verschiedene Vorgehensweisen.^{70a} Sie unterscheiden sich darin, wie die Glasoberfläche vor der eigentlichen Reaktion gereinigt bzw. aktiviert wird, welche Reaktivität und Konzentration das eingesetzte Silan besitzt und welches Lösungsmittel dazu verwendet wird (Tab. 8). Ebenso variieren Reaktionszeit und Temperatur. Ziel war es, homogene selbstorganisierende Schichten von Alkylsilanen aufzubauen.

Tab. 8 Ausgewählte Silanisierungsmethoden

Methode	Lit.
1 mM Octadecyltrichlorosilan (18-TCS) in Bicyclohexyl für 24 h	70b
0,1 M Octadecyltrimethoxysilan (18-TMS) in Bicyclohexyl für 24 h	70b
0,2 v% 18-TMS in Dichlormethan für 16 h	70c

Die begrenzte Durchlässigkeit des eingesetzten Glases limitiert den Wellenzahlenbereich für die IR-Analytik auf 4000 bis ca. 2000 cm^{-1} . Die charakteristischen und interessanten CH-Schwingungsbanden um 2900 cm^{-1} werden aber erfaßt und gestatten über deren Signalbreite und -lage eine Aussage über die Ordnung der einzelnen Alkylsilanketten und somit des gesamten Filmes.

Erste Versuche zeigten, daß diejenigen Filme auf Glas, die mit sehr reaktiven Trichlorsilanen in geringer Konzentration hergestellt wurden (1 mM), im Infraroten scharfe Absorptionen der CH-Streckschwingungen hervorrufen, d.h. gut geordnete Monoschichten bilden. Die Absorptionen lassen sich dabei in asymmetrische (d^- ; ca. 2920 cm^{-1}) und symmetrische (d^+ ; ca. 2850 cm^{-1}) Streckschwingungen der Methylengruppen aufteilen. Die auftretende Schulter bei ca. 2960 cm^{-1} kann der endständigen Methylgruppe in 18-TCS zugeordnet werden (Abb. E9).

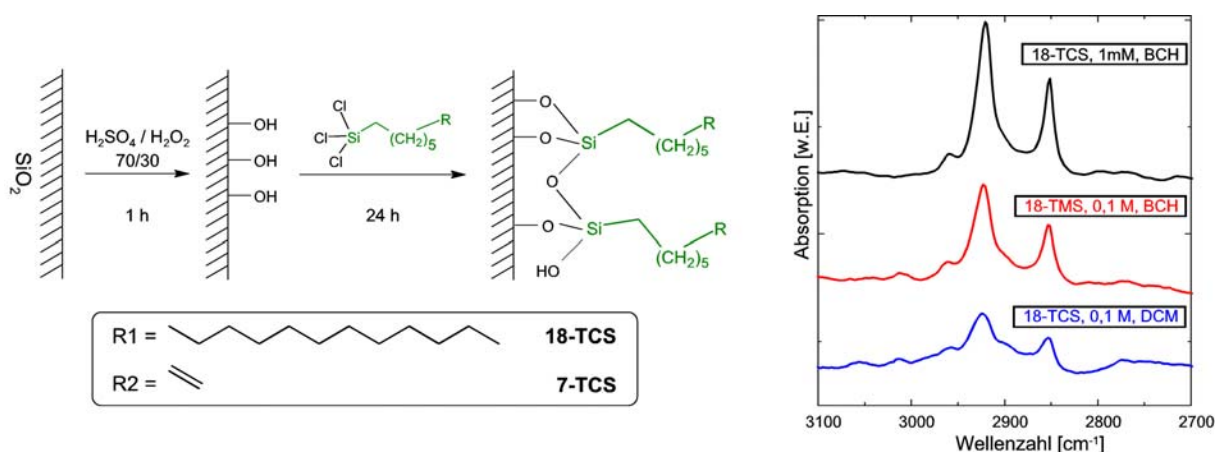


Abb. E9 Schema der Silanisierung mit Trichlorsilanen (links) und IR-Spektren verschiedener Silanisierungsprozeduren (rechts) [TCS: Trichlorsilan; TMS: Trimethoxysilan; BCH: Bicyclohexyl; DCM: Dichlormethan]

Teils drastische Unterschiede sind erkennbar, wenn man bei einem gewählten Trichlorsilan das Lösungsmittel variiert. Es fällt auf, daß bei zunehmender Polarität des Lösungsmittels die Ordnung der entstehenden Silanmonoschicht abnimmt (Abb. E10 links). Vergleicht man selbige Proben im XPS (Abb. E10 rechts), stellt man fest, daß auch hier die Filmqualität – beurteilt anhand der Menge an Kohlenstoff - in unpolaren Medien besser ist.

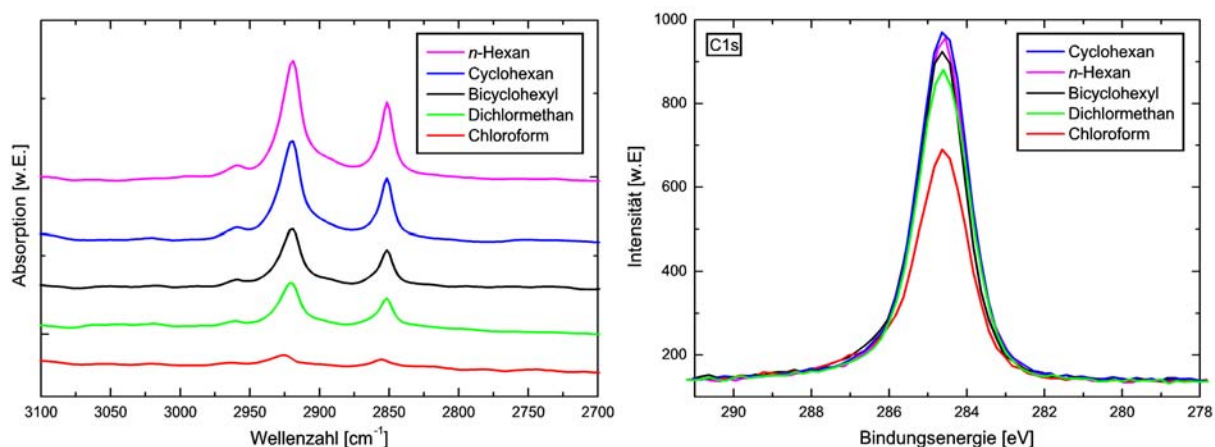


Abb. E10 IR-Spektren (links) und C1s-XP-Detailspektren (rechts) von Filmen aus 18-Octadecyltrichlorsilan auf Glas, erzeugt in verschiedenen Lösungsmitteln

Dieser Einfluß des Lösungsmittels auf die Monoschichtenbildung läßt sich teilweise durch Betrachten ähnlicher Systeme erklären. Die Abhängigkeit der Filmbildung vom Lösungsmittel (z.B. bei *n*-Alkanthiol-Monoschichten auf Gold) wird üblicherweise mit der Langmuir-Kinetik beschrieben.⁷¹ Die Geschwindigkeit der Adsorption ist hierbei abhängig von der Verdrängung der oberflächengebundenen Lösungsmittelmoleküle. Im Falle einer, nach Behandlung mit Caroscher Säure, hydroxylierten und damit stark **hydrophilen** SiO₂-Oberfläche erwartet man, daß die Geschwindigkeit der Lösungsmittelverdrängung und somit die der Silanadsorption bei **hydrophoben** Lösungsmitteln mit kleinerem ϵ_r eher zunimmt. Andere Modellvorstellungen gehen davon aus, daß die Reorganisation der Schichtmoleküle dadurch beeinflusst wird, daß die Molekülendgruppen mit dem Lösungsmittel interagieren.^{71a} Auch hier könnte man schlußfolgern, daß unpolare Lösungsmittel besser mit den alkylichen Endgrup-

pen der Silane wechselwirken und somit ein schnelleres Ordnen der hydrophoben Ketten auf der Oberfläche erlauben, was mit den Ergebnissen aus den IR-Spektren übereinstimmt.

Tab. 9 Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel (bei 20°C) und CH₂-Schwingungsmoden des 18-TC-Silanfilms

Lösungsmittel	ϵ_r	Wellenzahl [cm ⁻¹]
<i>n</i> -Hexan	1,88 ⁷²	2919,4 (d-), 2851,3 (d+)
Bicyclohexyl	1,98 ⁷³	2919,8 (d-), 2851,5 (d+)
Cyclohexan	2,05	2919,8 (d-), 2851,6 (d+)
Chloroform	4,89 ⁷⁴	2925,6 (d-), 2855,3 (d+)
Dichlormethan	9,02	2920,2 (d-), 2851,9 (d+)

Aus Tabelle 9 läßt sich ablesen, daß sich mit zunehmendem ϵ_r die Absorptionsmaxima der CH₂-Streckschwingungen im Silanfilm hin zu größeren Wellenzahlen verschieben. Eine starke Abweichung von diesem Trend zeigt die Chloroform-Probe. Dies ist vermutlich auf Fehler während der Messung zurückzuführen. Unter Berücksichtigung der erhaltenen XPS-Daten ist davon auszugehen, daß die Reaktion des Trichlorsilans in polaren Lösungsmitteln zu unvollständig geordneten Monoschichten führt. Die Unterschiede von Filmen hergestellt aus *n*-Hexan oder Cyclohexan sind minimal. Vorteile bietet der etwas höhere Siedepunkt des Cyclohexans (80,7 °C) gegenüber *n*-Hexan (69,0 °C), da die Silanisierung über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt wird und bei Cyclohexan weniger Verdunstungsverluste durch eventuelle Undichtigkeiten in einem Glasgefäß oder einer Reaktionskammer auftreten.

Abbildung E11 zeigt gemessene XP-Übersichts- und Detailspektren eines 18-TCS-Films auf Glas unter Verwendung von *n*-Hexan als Lösungsmittel. Die Signale der Elektronen aus O1s (532,5 eV), Si2s (154,2 eV) und Si2p (103,3 eV) entstammen dem Glassubstrat; das Signal bei 284,6 eV (C1s) wird dem Alkylsilan zugeordnet. Die Tatsache, daß Elektronen aus dem Glas detektiert werden können, zeigt, daß der Silanfilm für eine komplette Abschirmung dieser Elektronen zu dünn ist. Geringe Mengen an unvermeidlichen Verunreinigungen auf der Probe oder teilweise luftoxidierten Silanmolekülen führen zu C1s- bzw. O1s-Signalen, die sich aus zwei oder mehreren Teilsignalen der unterschiedlichen Elementspezies zusammensetzen.

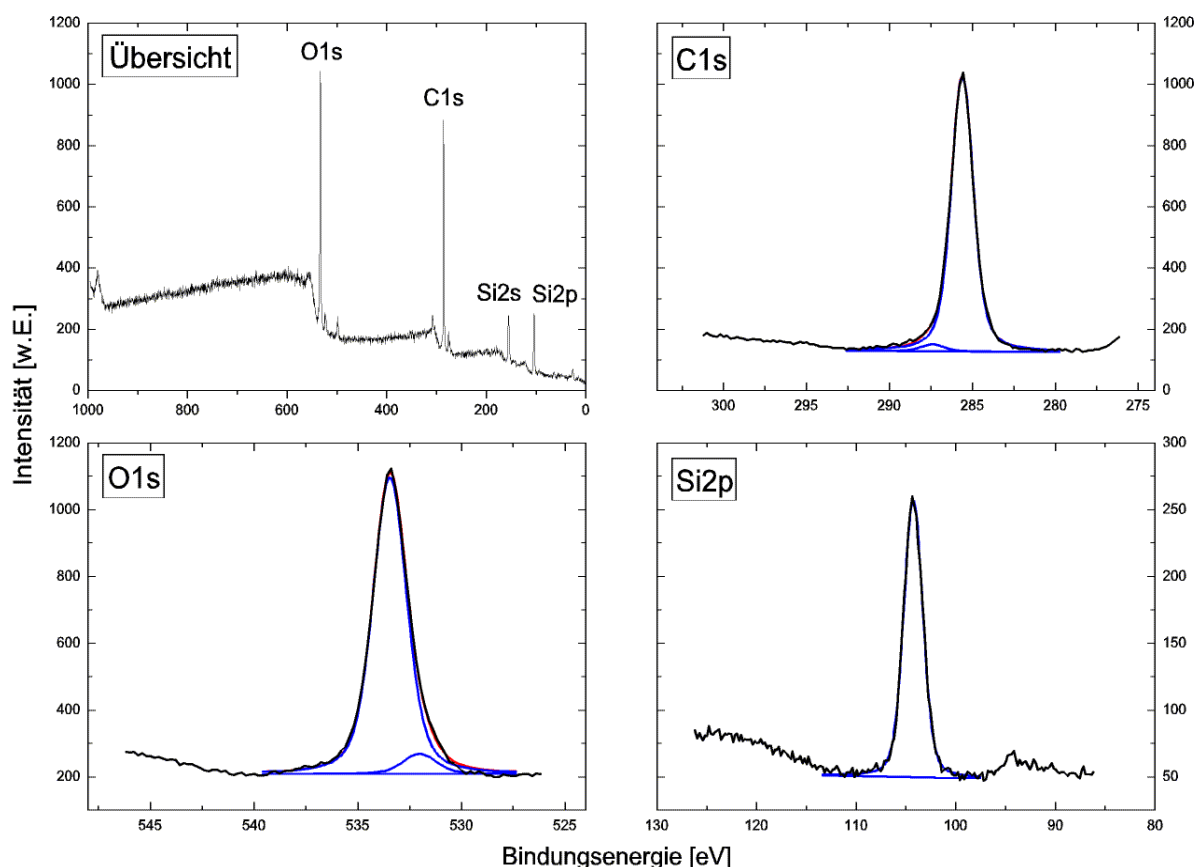


Abb. E11 XP-Übersichts- und Detailspektren von 18-TCS-Filmen aus *n*-Hexan

Eine geplante Behandlung mit Ozon zur Einführung reaktiver Gruppen sollte begünstigt ablaufen, wenn das eingesetzte Silan eine endständige C=C-Doppelbindung aufweist, die mit Ozon über eine 1,3-dipolare Addition reagieren kann. Aus diesem Grund wurden auch Silanmonoschichten mit 7-Octenyltrichlorosilan (7-TCS) erzeugt und charakterisiert. Abbildung E12 zeigt XP-Übersichts- und Detailspektren eines 7-TCS-Films hergestellt in *n*-Hexan. Wie zu erwarten, werden die vier Signale für O1s, C1s, Si2s und Si2p mit derselben Bindungsenergie wie im Falle des 18-TCS detektiert.

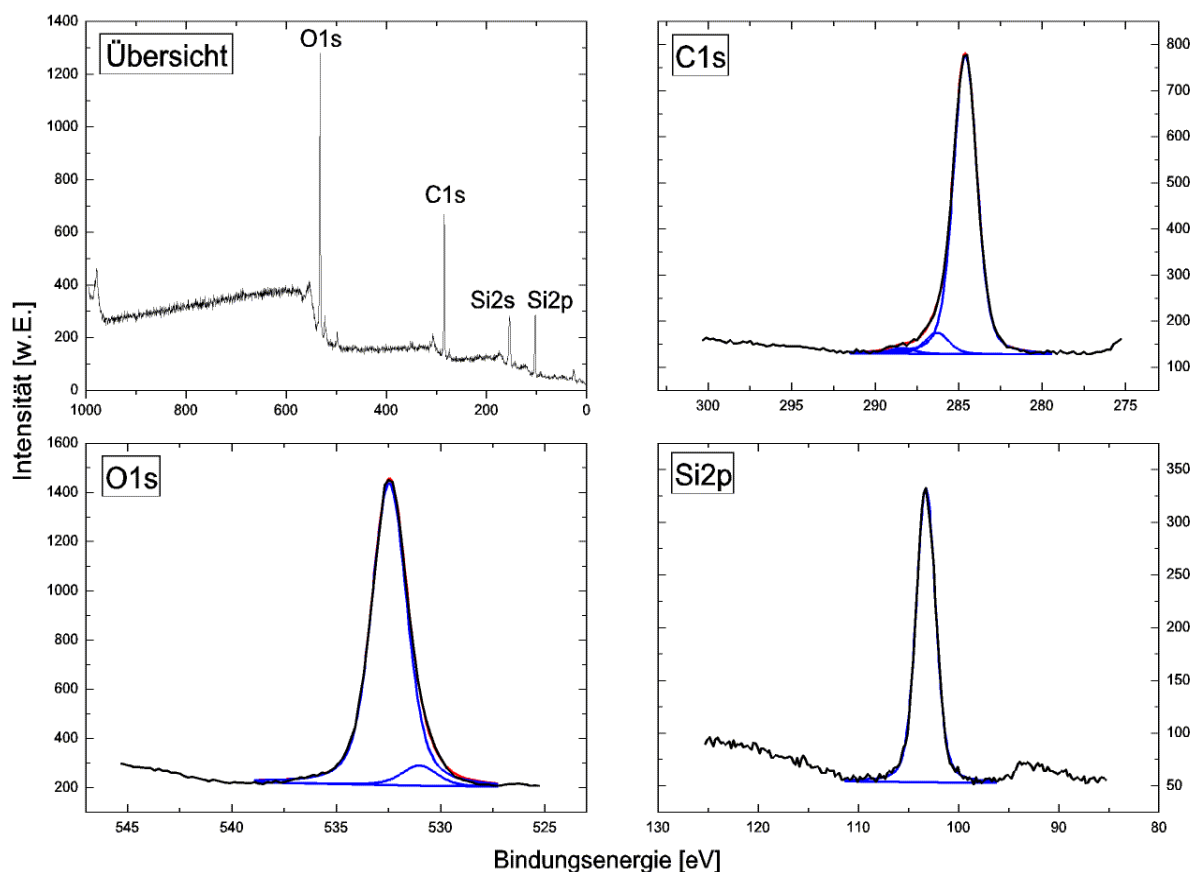


Abb. E12 XP-Übersichts- und Detailspektren von 7-TCS-Filmen aus *n*-Hexan

Abbildung E13 zeigt noch einmal die IR- und XP-Detailspektren der beiden verwendeten Silanfilme nebeneinander. Die Absorptionsbanden in der Region der CH-Streckschwingungen liegen beim 18-TCS-Film bei 2919 cm^{-1} für die asymmetrische (ν_{as}) bzw. bei 2851 cm^{-1} für die symmetrische CH_2 -Schwingung (ν_{s}). Die Absorptionsbanden beim kurzkettingen 7-TCS-Film sind leicht zu höheren Wellenzahlen hin verschoben (2928 bzw. 2857 cm^{-1}), was für eine geringere Ordnung des Octenylsilanfilms spricht. Im Gegensatz zum Alkenylsilanfilm besitzt der Alkylsilanfilm eine zusätzliche Bande bei $\nu_{\text{as}} = 2959\text{ cm}^{-1}$, die der endständigen Methylgruppe ($-\text{CH}_3$) zugeordnet werden kann. Geringere Signalintensitäten bei 7-TCS sind auf die kürzeren Monomerketten im Vergleich zu 18-TCS zurückzuführen.

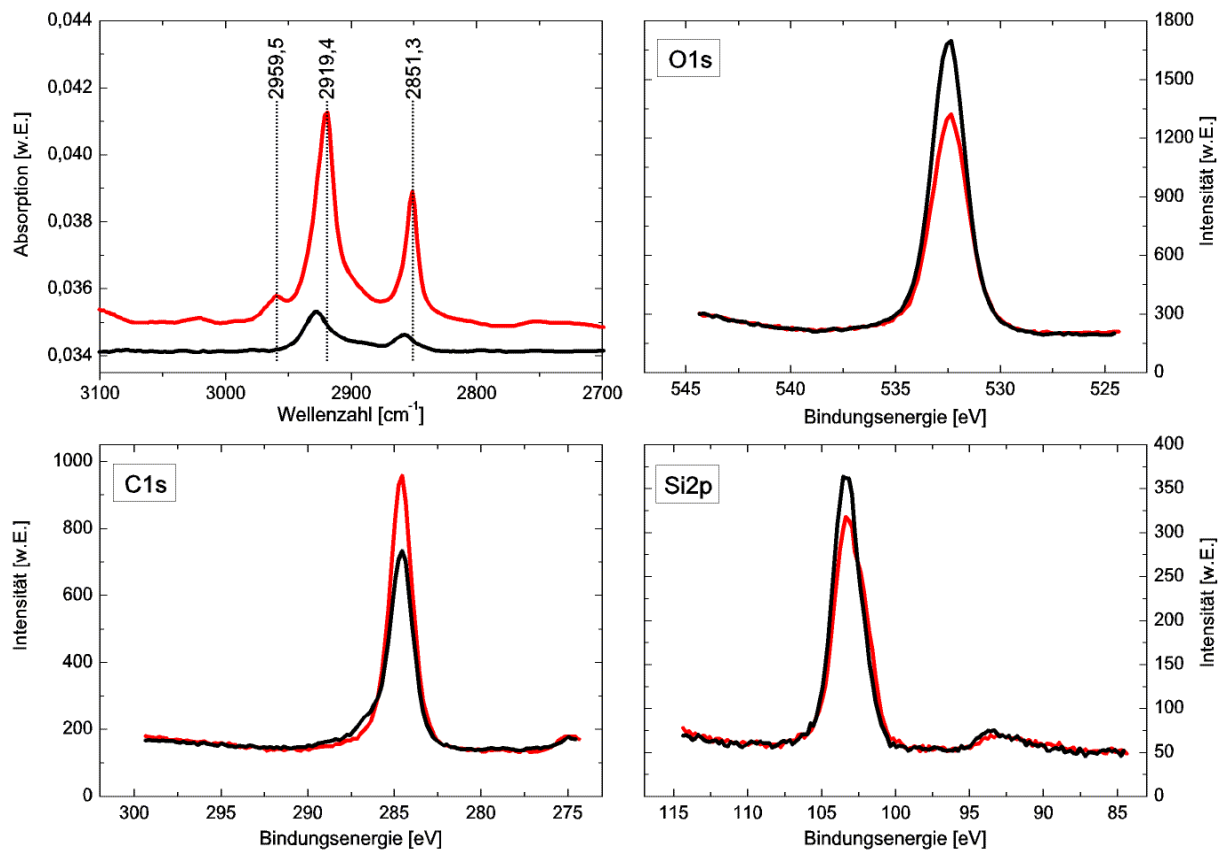


Abb. E13 IR-Spektren (oben links) und XP-Detailspektren von 18-TCS- (rot) und 7-TCS-Filmen (schwarz) auf Glas

Vergleicht man die XP-Spektren beider Spezies, fällt auf, daß die Lage der einzelnen Elementsignale, wie erwähnt, identisch ist, es allerdings zu Unterschieden in den gemessenen Intensitäten kommt. Die Si2p- bzw. O1s-Signale erscheinen im 7-TCS-Film (schwarz) intensiver als bei 18-TCS (rot). Umgekehrt erscheint das Signal für C1s in 7-TCS weniger intensiv als bei 18-TCS. Die Gründe dafür liegen in unterschiedlichen Filmdicken bedingt durch die unterschiedlichen Kettenlängen der eingesetzten Silanmonomere. Eine dickere Silanmonoschicht führt zum einen zu einer größeren Abschwächung der Substratsignale (O1s, Si2p/2s) und zum anderen zu einer Verstärkung der C1s-Signalintensität aufgrund des erhöhten Kohlenstoffanteils im Film.

3.1.3.2 Ozonisierung zur Einführung photosensitiver Gruppen

Für die Initiierung der angestrebten Graftpolymerisation auf der silanisierten Glasoberfläche bieten sich sogenannte Hydroperoxidgruppen (RO-OH) an, die sich mit UV-Licht in Oxy-(RO·) und Hydroxyradikale (·OH) aufspalten lassen. Die Oxyradikale wirken dabei als oberflächengebundene Radikalstarter.

Die Einführung dieser Gruppen gelingt mittels Ozonolyse. Die silanisierten Oberflächen werden für eine bestimmte Zeit mit trockenem Ozon begast. Für den Fall der alkenylsilanisierten Träger läßt sich eine 1,3-dipolare Cycloaddition des Ozons an die terminale C=C-Doppelbindung als ersten Schritt formulieren (Abb. E14).

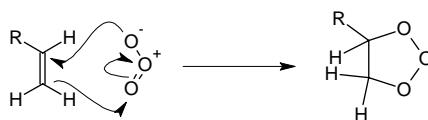


Abb. E14 1,3-dipolare Cycloaddition des Ozons an eine C=C-Doppelbindung

Dieser Schritt wird in der Literatur allgemein akzeptiert. Unterschiedliche Auffassungen existieren allerdings über den Fortgang der Reaktion, wenn alkenterminierte Monoschichten mit Ozon an der Phasengrenze Oberfläche-Gas reagieren. So beschreiben MORRIS et al. bei C=C-terminierten Alkanthiolmonoschichten auf Gold den Abbau des Primärozonids zu Alkanthiocarbonsäuren und Formaldehyd und weiter durch Kondensation zu intermolekularen Carbonsäureanhydriden.⁷⁵ Den Abbau genauer betrachtet hat die Gruppe um FINLAYSON-PITTS.⁷⁶ Sie postulieren dabei den möglichen Reaktionsweg von 7-Octenylsilanfilmen auf Glas mit Ozon folgendermaßen:

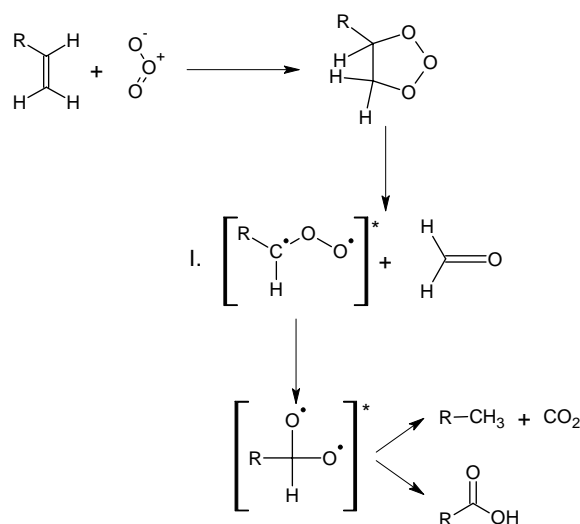


Abb. E15 Postulierte Reaktionsmechanismen der heterogenen Ozonolyse von Alkenen

Das im ersten Schritt entstandene Primärozonid zerfällt in Formaldehyd und in das sogenannte CRIEGEE-Intermediat (I.), welches hierbei als Oxodiradikal vorliegt. Das entstehende Formaldehyd läßt sich zweifelsfrei in der Gasphase nachweisen, ebenso die COOH-terminierte Oberfläche durch Reaktion mit NH_3 als Ammoniumsalz. Unterschiedliche Auffassungen gibt es hinsichtlich der These, daß die nach dem Zerfall des Primärozonids entstehenden Produkte ein oberflächengebundenes Aldehyd und Ameisensäure sind (HCOOH), wie bei Reaktionen von Alkenen mit Ozon in der Gasphase üblich.⁷⁷ Die Konzentration an HCOOC bei der Ozonisierung von oberflächengebundenen Alkenen ist allerdings sehr gering ($< 10\%$) und spricht für den Abbau nach Abbildung E15. Berichte über Ozonisierungen von gesättigten, organischen Monoschichten auf Silizium kommen zu dem Schluß, daß das Ozon die Alkylkette von der terminalen Methylgruppe her angreift und über mehrere Stufen in eine Carbonsäureeinheit umwandelt.⁷⁸ Dabei wird der Silanfilm stufenweise abgebaut. Ein eventuell erwartetes CRIEGEE-ähnliches Zwischenprodukt als Hydroperoxid-Analogon (RO-OH) wird nicht erwähnt.

Es mußte ein Weg gefunden werden, eine maximale Anzahl an Hydroperoxidgruppen als Polymerisationsinitiatoren auf dem Silanfilm zu erzeugen, ohne ihn dabei durch das Ozon komplett abzubauen. Die hohe Anzahl an diesen Gruppen sollte sicherstellen, daß sich im anschließenden Graftpolymerisationsschritt genügend dichte Polymerfilme erzeugen lassen, die ihrerseits wiederum genügend Raum für eine hohe Funktionalitätsdichte bieten. Dazu wurden die beiden Silanfilme (7-TCS und 18-TCS) unterschiedlich lange trockenem Ozon ausgesetzt, welches vorher direkt aus medizinischem Sauerstoff in einem Ozonisator durch eine „stille Entladung“ hergestellt wurde. Abbildung E16 zeigt aufgenommene C1s-XP-Detailspektren in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer.

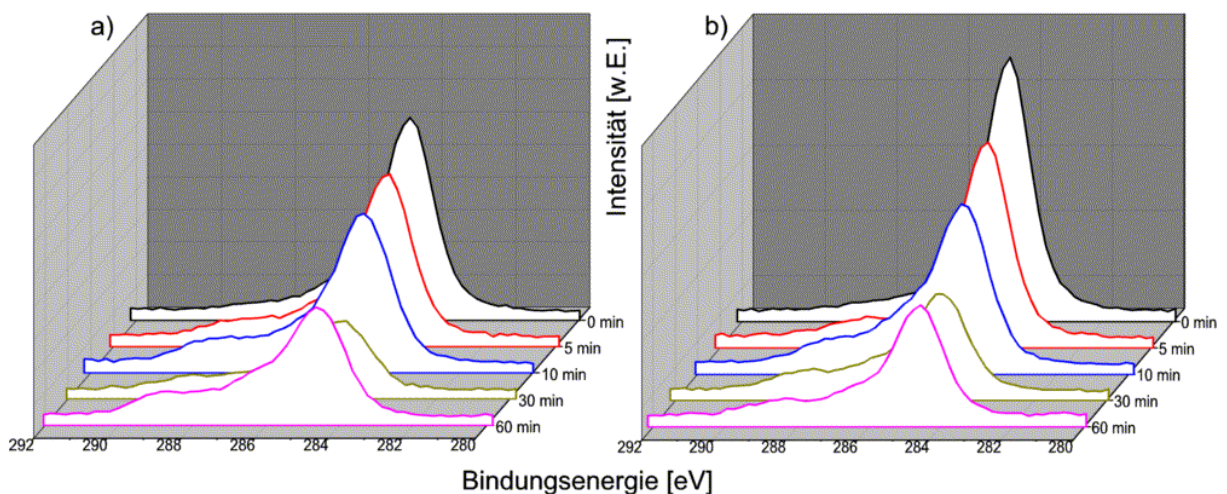


Abb. E16 C1s-XP-Detailspektren von 7-TCS (a) und 18-TCS (b) nach unterschiedlicher Ozonisierungsdauer

Die Signale verlieren in beiden Fällen mit zunehmender Ozonisierungsdauer an Intensität, werden breiter und erfahren eine leichte Verschiebung hin zu höheren Bindungsenergien. Auffällig ist die Zunahme der Signalintensität bei jeweils 60 Minuten, besonders beim 7-TCS-Film (Abb. E16, links). Betrachtet man die prozentuale Abnahme der alkyischen C1s-Signale für beide Silanfilme (Abb. E17), so fällt im Falle des kurzkettingen Alkenylsilans

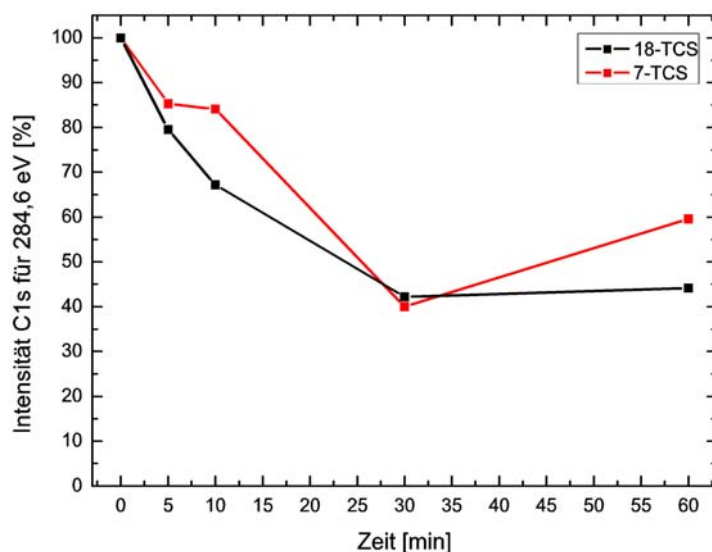


Abb. E17 Abnahme des alkyischen C1s-Signals (284,6 eV) in den XP-Detailspektren während der Ozonisierung

(7-TCS) auf, daß dessen Abbau über die Zeit unregelmäßiger verläuft als bei der entsprechenden Alkylsilan-Spezies (18-TCS). Die Zunahme des Signals bei 60 Minuten für 18-TCS fällt zudem geringer aus als bei 7-TCS. Ein Grund dafür könnte die höhere Ordnung des langkettigen Alkylsilanfilms sein, der durch die Reaktion mit dem Ozon gleichmäßiger abgebaut wird. Zudem ist das eingesetzte Monomer 7-TCS nur von technischer Qualität (96 % laut Hersteller; „internal olefin isomers:

10-15 %“). Es ist daher davon auszugehen, daß die Position der C=C-Doppelbindung in nur 85-90 % der Fälle am Ende des Trichlorsilans vorzufinden ist. Somit entstehen während der Silanisierung Filme mit einer variablen Position der Doppelbindung innerhalb der Kohlenstoffkette. Die Doppelbindung wird durch das Ozon nicht simultan angegriffen.

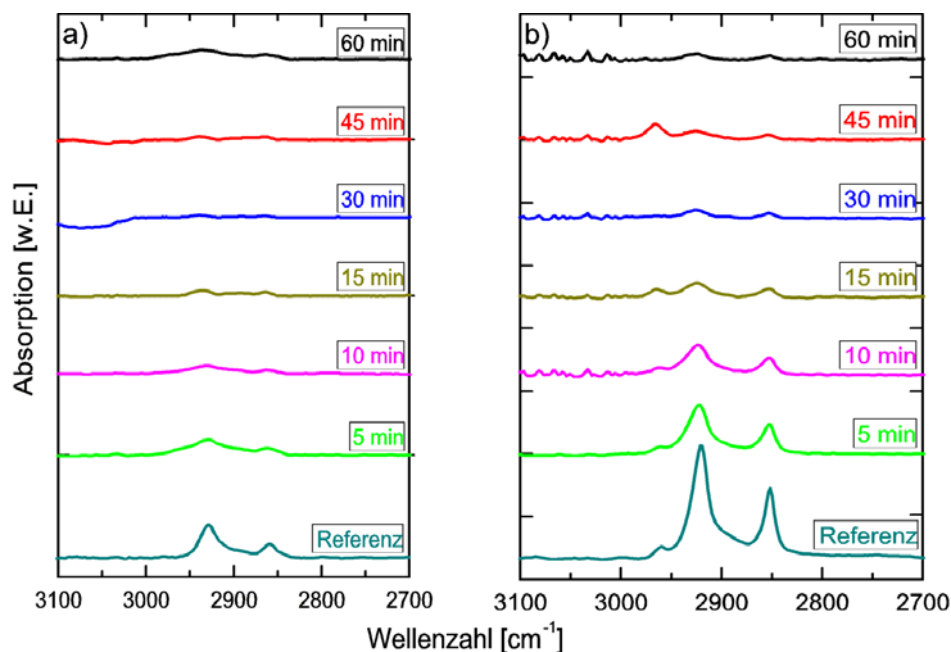


Abb. E18 IR-Spektren von 7-TCS- (a) und 18-TCS-Filmen (b) auf Glas nach Behandlung mit Ozon

Die IR-Spektren lassen auf den ersten Blick die Vermutung zu, daß der Abbau der 7-TCS-Filme etwas schneller verläuft als bei 18-TCS-Filmen, da nach ca. 30 Minuten kaum noch Absorptionsbanden zu erkennen sind (Abb. E18, links). Der Eindruck ist jedoch, daß dies in den unterschiedlichen Ausgangsintensitäten begründet liegt. Das zunehmende Verschwinden bis hin zum Verlust der charakteristischen CH-Schwingungsbanden ist eher ein Hinweis auf die Abnahme der Ordnung in den Silanfilmen und nicht auf eine vollständige Oxidation der Kohlenstoffketten, da man in den XP-Spektren nach einer Stunde Ozonisierung bei beiden

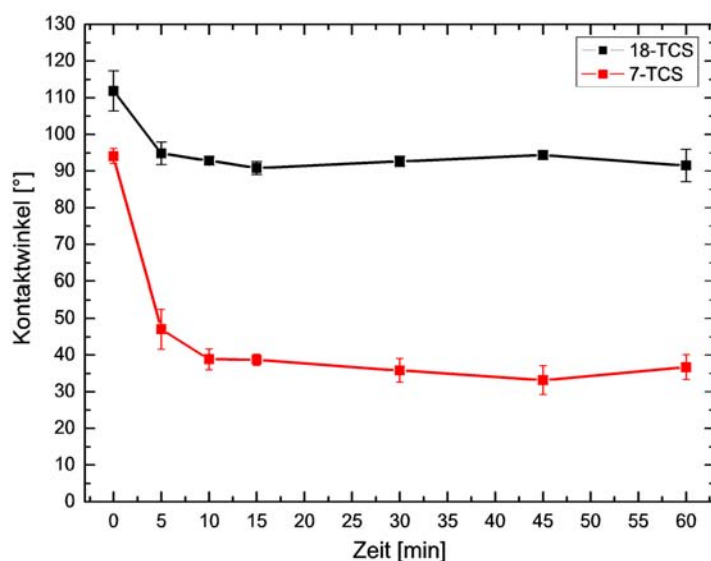


Abb. E19 Abnahme des Kontaktwinkels während der Ozonisierung

Silanfilmen noch C1s-Signale detektieren kann (60 % bei 7-TCS bzw. 45 % bei 18-TCS). Abbildung E19 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abnahme des Kontaktwinkels unter dem Einfluß von Ozon. Während im Falle des 18-gliedrigen Alkylsilans (18-TCS) mit höherer Filmordnung nur ein geringer Abfall des Kontaktwinkels auf ein Niveau von ungefähr 85 % des Ausgangswertes zu beobachten ist, fällt beim

kurzkettigeren 7-TCS auf, daß innerhalb der ersten zehn Minuten bereits ein Plateau von ca. 40 % des Startwertes erreicht wird. Insofern bestätigt dies die Beobachtungen, daß Ozon bevorzugt die (terminalen) Doppelbindungen im 7-TCS-Film angreift und den Abbau des Filmes initiiert. Die Ergebnisse aus den XPS-Messungen werden durch diese Verläufe bestätigt, da bei einem totalen Abbau des Filmes auf der Oberfläche ein Kontaktwinkel gegen Null erwartet werden würde, hervorgerufen durch die zurückbleibende, sehr hydrophile (SiO_2)-Glasoberfläche.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen für den Schritt der Ozonisierung folgende Schlußfolgerungen und Interpretationen zu: **1.** das Ozon oxidiert beide Silanmonoschichten unter Störung der jeweiligen Filmordnung und schrittweisem Abbau der Kohlenstoffketten; **2.** ein kompletter Abbau der Filme ist auch nach 60 Minuten Reaktionszeit noch nicht zu beobachten und **3.** durch die Präferenz des Ozons zur Addition an C-C-Mehrfachbindungen erfolgt im Falle des 7-TCS-Films eine effizientere, jedoch, bedingt durch die variable Position der C=C-Doppelbindung innerhalb der Kohlenstoffkette, ungleichmäßige Oxidation der Kohlenstoffkette.

Von größerem Interesse war jedoch, nach welcher Zeit sich eine maximale Anzahl reaktiver (Hydro-)peroxidgruppen auf der Oberfläche gebildet hat. Zu diesem Zweck wurden verschieden lang mit Ozon behandelte, silanierte Glasoberflächen einer iodometrischen Bestimmung unterworfen und der Peroxo-Gehalt in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer aufgetragen (Abb. E20). Man erkennt, daß bei beiden Filmarten eine maximale Belegungsdichte von ca. 45 nmol/g bzw. 5,4 nmol/cm² möglich ist. Dieser Wert wird allerdings im Falle des Octenylsilanfilms (**7-TCS**) bereits nach 30 Minuten nach einem relativ steilen Anstieg erreicht, beim Octadecylsilanfilm (18-TCS) hingegen 15 Minuten später. Auffällig ist ebenso die sofortige Zunahme des Peroxidgehalts und somit der spontane Reaktionsstart mit dem Ozon im Falle der Alken-Spezies (rot) im Vergleich zur gesättigten Silanvariante (schwarz), die eine gewisse Zeit der Oxidation standzuhalten scheint. Dies ist zum einen in der bereits erwähnten Additionspräferenz des Ozons an die Doppelbindung begründet, zum anderen ist davon auszugehen, daß, bedingt durch die höhere Ordnung des Silanfilms aus 18-TCS gegenüber Filmen aus 7-TCS, ein Eindringen des Ozons in die Monoschicht aus kürzeren 7-Octenylsilanketten begünstigt ist.

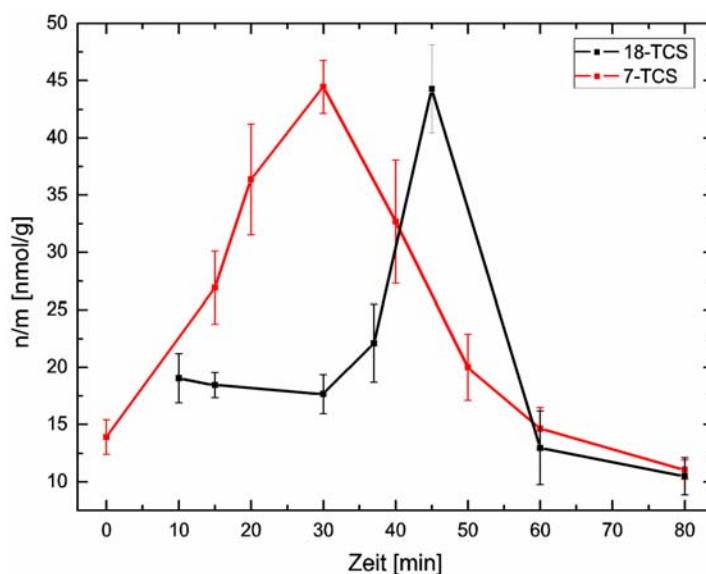


Abb. E20 Iodometrische Bestimmung der Hydroperoxid-Konzentration auf der ozonisierten Silanoberfläche

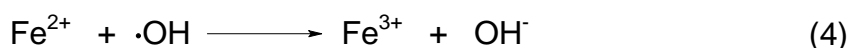
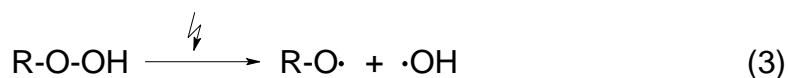
3.1.3.3 Graftpolymerisation mit Poly(ethylenglykol)-methacrylat, PEGMA₅

Das Bestrahlen frisch ozonisierter Silanmonoschichten mit UV-Licht führt zu einer homolytischen Spaltung der oberflächengebundenen Hydroperoxidgruppen in Oxy- (RO·) und Hydroxyradikale (·OH). Für eine Graftpolymerisation („Pfropfpolymerisation“) sind ausschließlich die Oxyradikale von Interesse, da sie die Anknüpfungspunkte des entstehenden Polymerisats auf der Oberfläche bilden. Die Optimierung des entstandenen PEG-Acrylats erfolgte hinsichtlich maximaler Filmdicke unter Variation der Parameter Bestrahlungszeit und Monomerkonzentration. Eine Gewichtsbestimmung des Filmes fiel aufgrund der geringen Massezunahme, die durch handelsübliche Mikrowaagen im 0,1 mg-Bereich nicht mehr meßbar war, aus. Ellipsometrische Schichtdickenbestimmungen auf Glas waren ebenso erfolglos, da der einfallende Meßstrahl auch an der Unterseite der Gläser gebrochen wird und somit fehlerhafte Werte lieferte. Dieses Problem ließ sich geringfügig durch Anrauen der Objektträgerunterseite mit einem Sandstrahlgebläse verringern. Der Hauptgrund für die zu hohe Fehlerbreite der Ellipsometriedaten liegt darin begründet, daß die Differenz des Brechungsindex der zu untersuchenden Polymerschicht zum Brechungsindex des verwendeten Glases zu gering ist. Daher wurden die Untersuchungen auf Siliziumoberflächen übertragen, da sie mit einer SiO₂-Oxidschicht ausgestattet sind und sich genauso wie eine Glasoberfläche derivatisieren lassen. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse der Arbeiten zur Optimierung der Graftfilmdicke diskutiert, bevor danach die beiden Oberflächenarten Glas und Silizium und deren erfolgreiche Graftpolymerisierung anhand von XPS-Daten miteinander verglichen werden.

Optimierung der Filmdicke

Aufgrund der besseren Reaktivität der terminalen C=C-Doppelbindung gegenüber Ozon im 7-TCS-Film und der somit schneller einzuführenden Maximalzahl an Peroxidgruppen auf der Oberfläche, wurden die folgenden Schritte ausschließlich auf Basis dieser Octenylsilan-Filme durchgeführt.

Wie bereits anhand der PET-Folien gezeigt, wurden die frisch ozonisierten Siliziumträger in einer wäßrigen Lösung von 5 v% PEGMA₅ und 2 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat unter Stickstoff für eine gewisse Zeit mit UV-Licht bestrahlt. Die Lösung enthielt auch hier am Ende der Bestrahlung gelbliche Ausflockungen. Dieser Niederschlag ist ausgefallenes Eisen(III)-hydroxid, das sich bei der Reaktion der Hydroxy-Radikalen mit Fe²⁺ bildet und einen indirekten Hinweis auf eine erfolgreiche Polymerisation liefert:



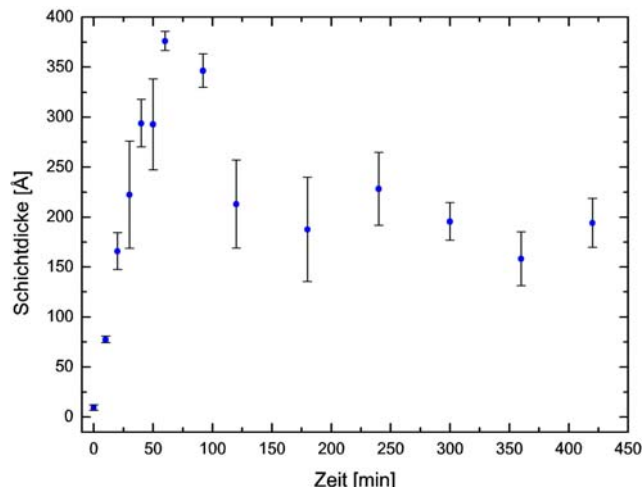


Abb. E21 Ellipsometrische Bestimmung der Dicke des Graftpolymerfilms auf Si-Oberflächen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer

Abbildung E21 zeigt den zeitlichen Verlauf der Graftpolymerisation bei einer konstanten Monomerkonzentration von 5 v%. Die maximale Filmdicke wird nach ca. 60 Minuten bei einem Wert von ca. 370 Å erreicht. Danach ist ein Rückgang der Dicke auf ca. 200 Å zu erkennen, die über weitere sechs Stunden relativ konstant bleibt. Der Verbrauch des Monomers während der Bestrahlung könnte dazu führen, daß sich das Gleichgewicht zwischen Photopolymerisation und Photodegradation zu letzterem Prozeß hin verschiebt.⁷⁹

Die Abhängigkeit der Schichtdicke von der Monomerkonzentration des PEG-Methacrylats verdeutlicht Abbildung E22. Zu beobachten ist ein nahezu linearer Anstieg der Filmdicke mit zunehmendem Gehalt an PEGMA₅ in der Lösung. Bereits bei Konzentrationen oberhalb von

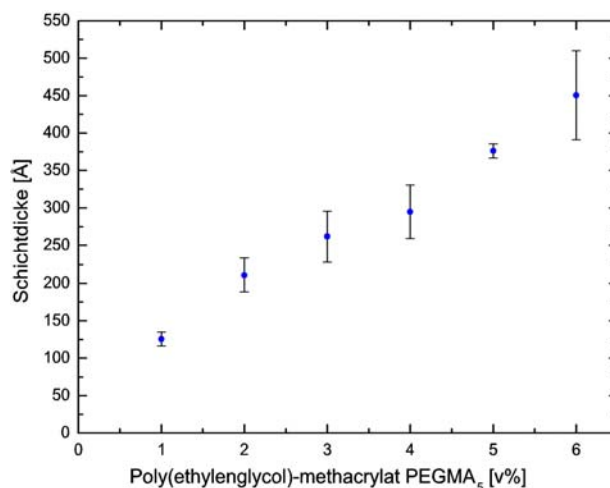


Abb. E22 Abhängigkeit der Filmdicke des Graftpolymers von der Konzentration des eingesetzten Monomers

5 v% bildet sich allerdings vermehrt das Homopolymer, erkennbar an einem schleimigen, klaren Niederschlag auf der bestrahlten Oberfläche, vermutlich aus der Reaktion der Hydroxyradikale mit dem überschüssigen Monomer. Ab 10 v% geliert die gesamte Lösung unter dem UV-Licht und erschwert die Bildung eines einheitlichen Films. Eine Konzentration von 5 v%

PEGMA₅ stellt somit einen guten Kompromiß zwischen ausreichender Filmdicke und praktischer Handhabbarkeit der Photopolymerisation dar.

Abbildung E23 zeigt XP-Übersichts- und Detailspektren einer PEG-gegrafteten Glasoberfläche, die unter optimierten Bedingungen (5 v% PEGMA₅; 1 h UV) hergestellt wurde. Aufgrund der erreichten Schichtdicke werden die emittierten Elektronen aus dem Glassubstrat (siehe Si2p) derart stark abgeschwächt, daß sie nicht mehr detektiert werden können. Der da-

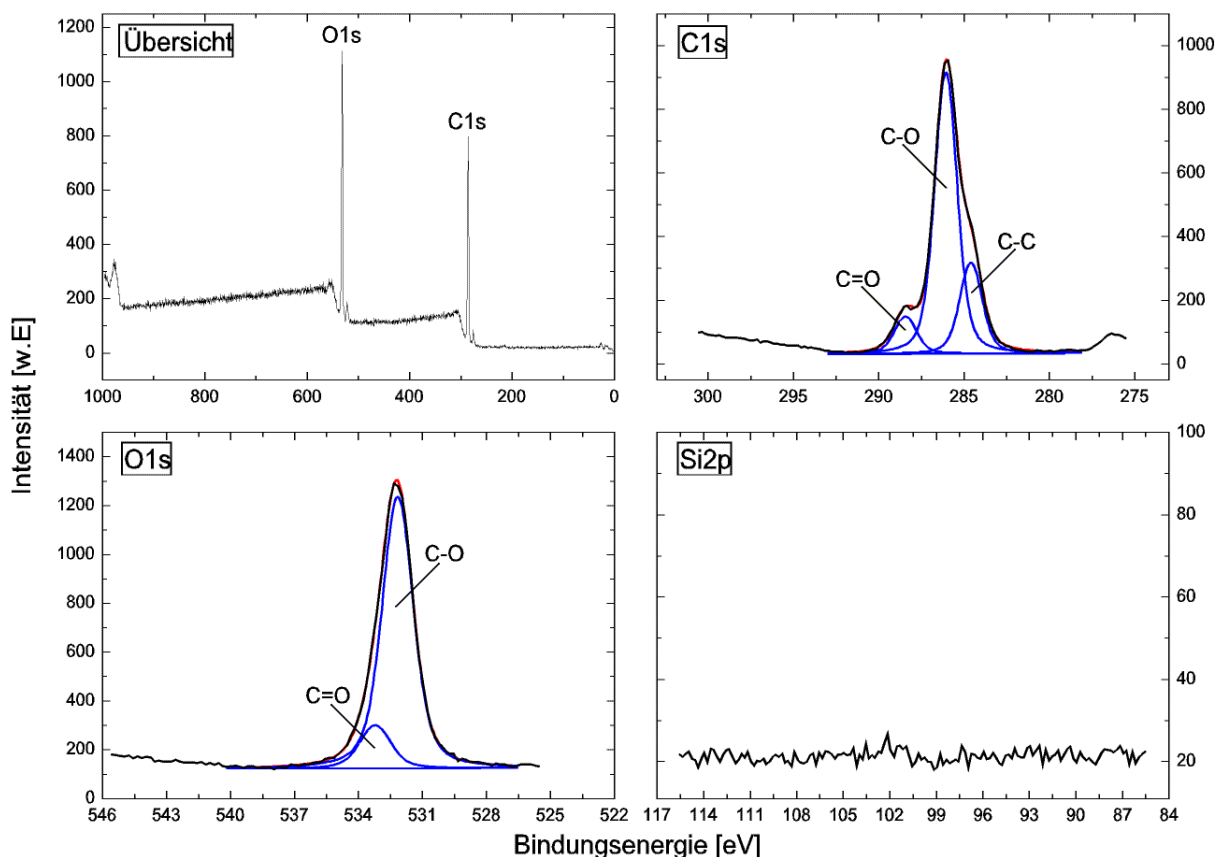


Abb. E23 XP-Übersichts- und Detailspektren eines PEG-Graftpolymers auf Glas

zugehörige Vergleich zwischen den berechneten und experimentellen Peakverhältnissen für die C1s- und O1s-Signale zeigt eine gute Übereinstimmung (Tab. 10). Ebenso vergleichbar sind die Peakverhältnisse von Filmen auf Glas und Silizium (Tab. 11).

Tab. 10 Berechnete und experimentelle C1s- (links) bzw. O1s-Peakverhältnisse (rechts) von PEG-graftpolymerisierten **Glasobjektträgern**

	C=O	C-O	C=C	C=O	C-O
ber.	1	10	3	1	6
exp.	1,3	9,3	3,0	1,2	6,0

Tab. 11 Berechnete und experimentelle C1s- (links) bzw. O1s-Peakverhältnisse (rechts) von PEG-graftpolymerisierten **Siliziumoberflächen**

	C=O	C-O	C=C	C=O	C-O
ber.	1	10	3	1	6
exp.	1,5	10,8	2,8	1,0	6,1

3.1.3.4 Funktionalisierung mit Aminogruppen

Die zur Kopplung einer Aminosäure an den derivatisierten Träger notwendigen Aminogruppen wurden über eine einfache Veresterung mit (Fmoc-amino)-alkancarbonsäure-Derivaten [Fmoc-NH-(CH₂)_n-COOH; *n* = 2, 3, 5, 10] unterschiedlicher Kettenlänge an die Hydroxyfunktionalität der PEG-Seitengruppen eingeführt. Die beste Methode dafür stellt eine *in situ*-Aktivierung der Carbonsäure mit einem Carbodiimid unter Anwesenheit von *N*-Methylimid-

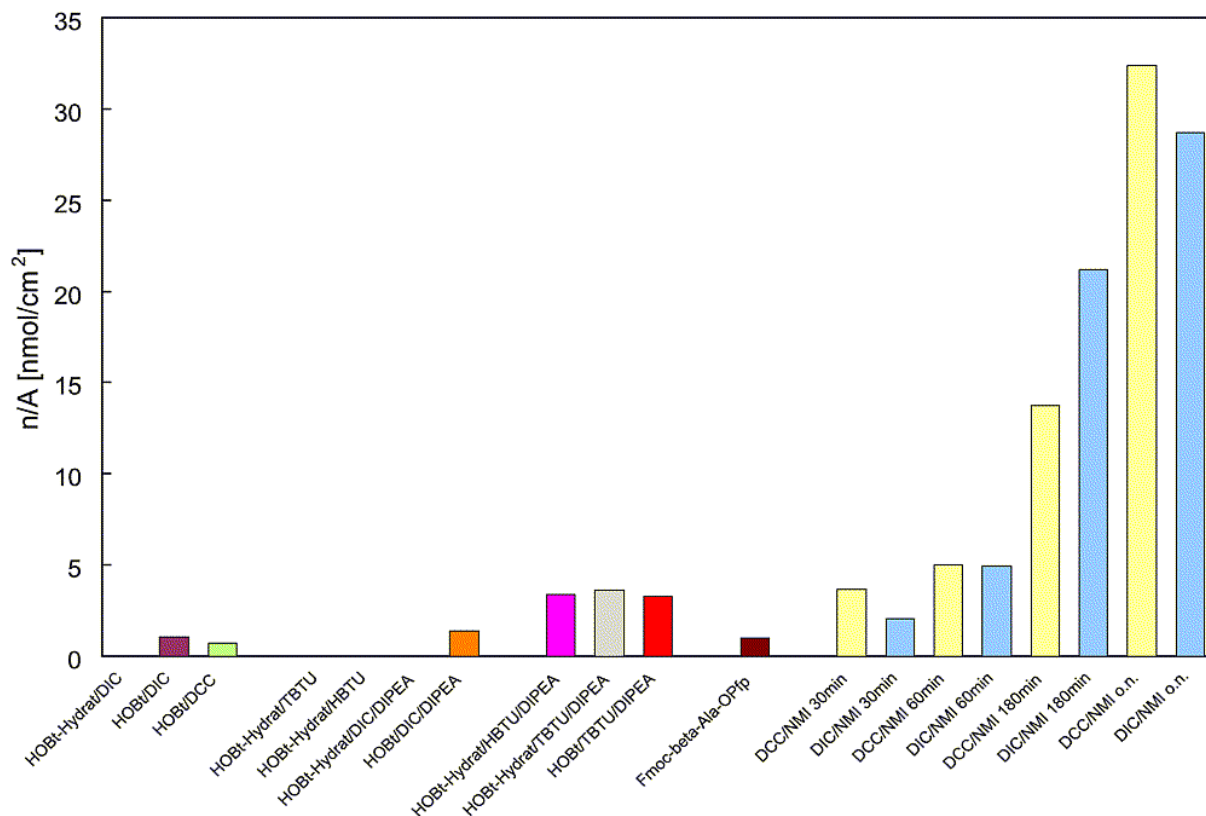


Abb. E24 Übersicht über Kopplungseffizienzen verschiedener Aktivierungsmethoden bei Fmoc- β -Alanin

azol dar. Anhand des Vergleichs von β -Alanin (*n* = 2) und verschiedenen Aktivierungsmethoden in Abbildung E24 wird ersichtlich, daß diese Art der Aktivierung eine hohe Aminogruppendichte sicherstelltⁱ. Die Kopplungsausbeuten als Verhältnisse von Stoffmenge zu Flächeninhalt [n/A] wurden durch Vermessen der Absorption des Piperidin-Dibenzofulven-Adduktes resultierend aus der Abspaltung der Fmoc-Gruppe bei 301 nm berechnet. Der untersuchte Fmoc- β -Alanin-OPfp-Ester als einziges, bereits voraktiviertes β -Alanin-Derivat koppelte vergleichsweise schlecht an die terminalen OH-Gruppen. Andere, in der Peptidsynthese übliche Aktivierungsreagenzien wie HOBt, TBTU oder HBTU und deren Kombinationen funktionierten teilweise überhaupt nicht, schlechter oder ähnlich gut wie die entsprechenden Carbodiimid-Ansätze. Aus Kostengründen sind allerdings Umsetzungen mit Carbodiimiden wie Dicyclohexyl- (DCC) oder Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Methylimidazol (NMI) vorzuziehen, wobei im längerfristigen Vergleich DCC gegenüber DIC höhere Ausbeuten erreichte (Abb. E24).

ⁱ bei fehlender Zeitangabe: 30 min Reaktionszeit; o.n. = over night (ca. 16 Stunden)

Für eine gezielte Steuerung der Aminogruppendichte pro Flächeninhalt bot sich an, die Reaktion von Fmoc- β -Alanin mit DCC/NMI zeitlich aufgelöst zu verfolgen (Abb. E25).

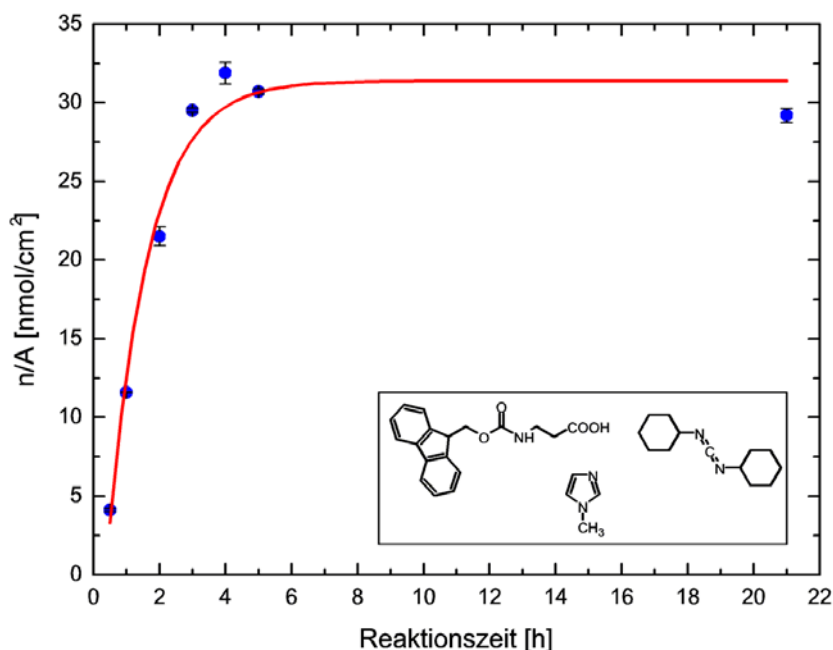


Abb. E25 Zeitlicher Verlauf der Veresterung von Fmoc- β -Ala mit DCC/NMI an PEG-OH-Oberflächen

Die Funktionalitätsdichte erreicht nach ca. fünf Stunden eine Sättigung von ca. 31 nmol/cm². Im Bereich von einer bis fünf Stunden lässt sich somit die Aminogruppendichte von etwa 4 bis 31 nmol/cm² je nach Anforderung an den Glsträger variieren. Eine andere Möglichkeit zur Einstellung der Funktionalitätsdichte besteht in der DCC-vermittelten Kopplung verschiedener Mischungen des Fmoc-geschützten β -Alanins mit *N*-acetyliertem β -Alanin (Abb. E26). Es ergibt sich nach einer Reaktionszeit von ca. 16 Stunden ein linearer Verlauf der Funktionalitätsdichte in Abhängigkeit vom Gehalt des Fmoc- β -Alanins.

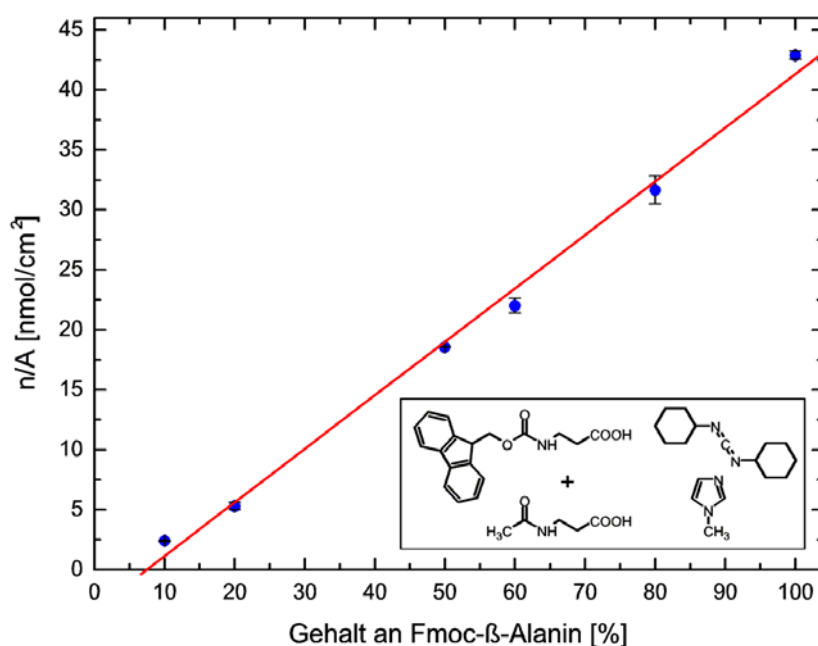


Abb. E26 Funktionalitätsdichte in Abhängigkeit vom Gehalt an Fmoc- β -Alanin und *N*-acetyl- β -Alanin

3.1.3.5 Untersuchung der PEG-Oberflächen auf deren Stabilität gegenüber TFA

Der finale Syntheseschritt der Festphasen-Peptidsynthese über die Fmoc-Schutzgruppenstrategie beinhaltet das Abspalten der säurelabilen Seitenschutzgruppen, standardmäßig mit Trifluoressigsäure (TFA) in Konzentrationen von bis zu 90 % über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde ($pK_A = 0,23$)⁸⁰. Es ist daher erforderlich, daß der derivatisierte Glasträger mit seinem aufgepfropften PEG-Methacrylat diesen extremen Bedingungen standhält, d.h. daß es unter keinen Umständen zu einer Zerstörung der PEG-Polymerschicht und damit zu einem Ablösen der trägergebundenen Peptide kommt.

Zwei einfache Tests und deren Ergebnisse gibt Abbildung E27 wieder. Das linke Diagramm zeigt die Änderung der Schichtdicke einer ellipsometrisch vermessenen Si-Oberfläche mit graftpolymerisiertem PEG-Methacrylat vor und nach der Behandlung mit 90 % TFA über ei-

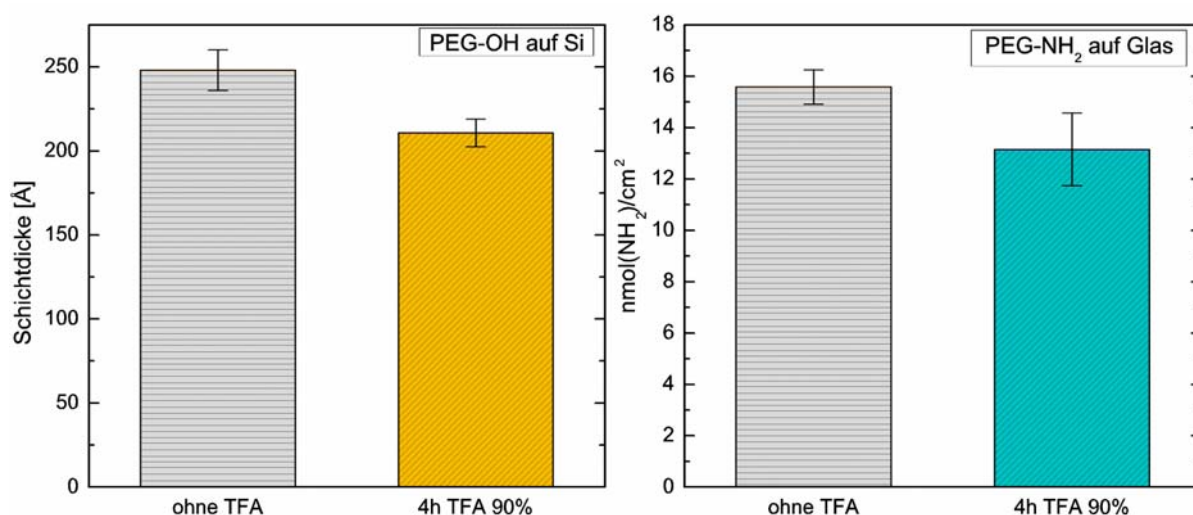


Abb. E27 Änderung der Dicke einer PEG-OH-Schicht auf Silizium (links) und Unterschied an Amingruppendichte auf PEG-β-Alanin auf Glas vor und nach TFA-Behandlung (rechts)

nen Zeitraum von vier Stunden. Die ursprüngliche Dicke nimmt um ca. 15 % ab. Dieser Rückgang ließe sich aber auch dadurch erklären, daß bei Kontakt der PEG-Schicht mit TFA dem quellfähigen Polymer weiteres Wasser entzogen wird und es somit schrumpft. Für die Grafik rechts wurde ein graftpolymerisierter Glasträger mit Fmoc-β-Alanin verestert und anschließend in zwei Teile zerteilt. Ein Teil wurde 90 %iger TFA für vier Stunden ausgesetzt. Danach wurden von beiden Glasträgern mit Piperidin die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten und das Verhältnis n/A [nmol/cm²] berechnet. Der mit TFA behandelte Träger besaß 15 % weniger Aminogruppen als der unbehandelte Träger. Auch hier ließe sich die Differenz durch Entziehen von Wasser aus dem PEG-Polymerfilm und dadurch dessen Schrumpfen erklären. Ein derart komprimierter Film würde es der Base Piperidin erschweren, dieselbe Anzahl an zugänglichen Fmoc-Gruppen abzuspalten.

Genauere Daten liefern XP-Spektren. In den Abbildungen E28 bis E30 sind die Detailspektren von C1s, O1s und N1s eines mit β-Alanin modifizierten PEG-OH-Filmes (PEG-NH₂) auf Glas vor und nach Behandlung mit 90 %iger TFA über einen Zeitraum von vier Stunden gegenübergestellt. Es sind auf den ersten Blick keine Unterschiede in der Lage und in der

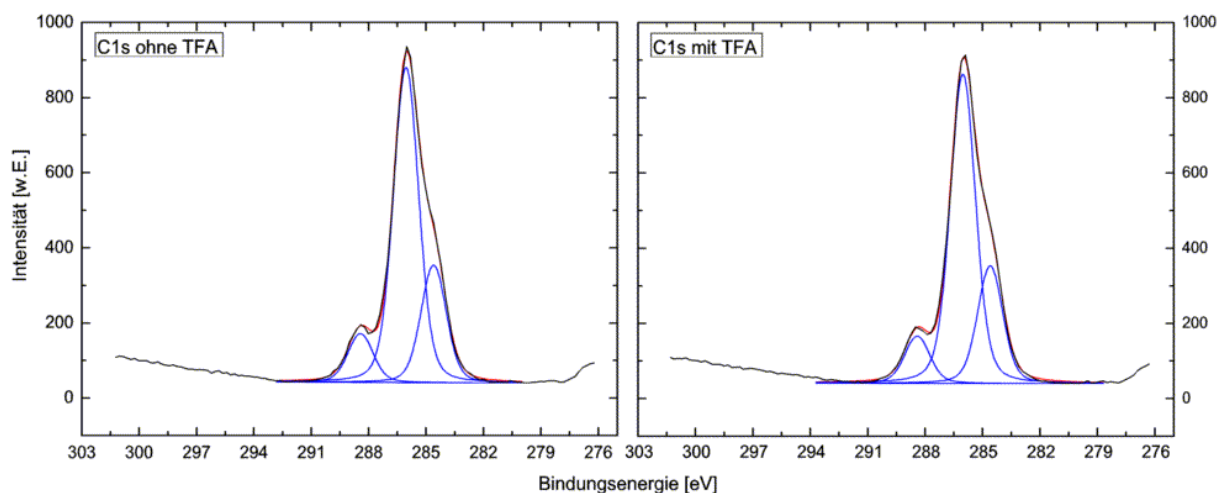


Abb. E28 C1s-XP-Detailspektren des PEG-Graftpolymers auf Glas vor (links) und nach (rechts) TFA-Behandlung

Zusammensetzung der einzelnen Signale auszumachen. Vergleicht man die Peakverhältnisse der einzelnen Elementspezies sowohl untereinander als auch mit berechneten Werten, stellt man fest, daß der Polymerfilm vollständig erhalten bleibt und auch die Esterbindung des β -Alanins mit dem PEG-Film durch TFA nicht hydrolysiert wird.

C1s	vor TFA			nach TFA		
	C=O	C-O	C-C	C=O	C-O	C-C
ber.	2	11	4	2	11	4
exp.	1,7	11,0	4,1	1,6	11,0	4,2

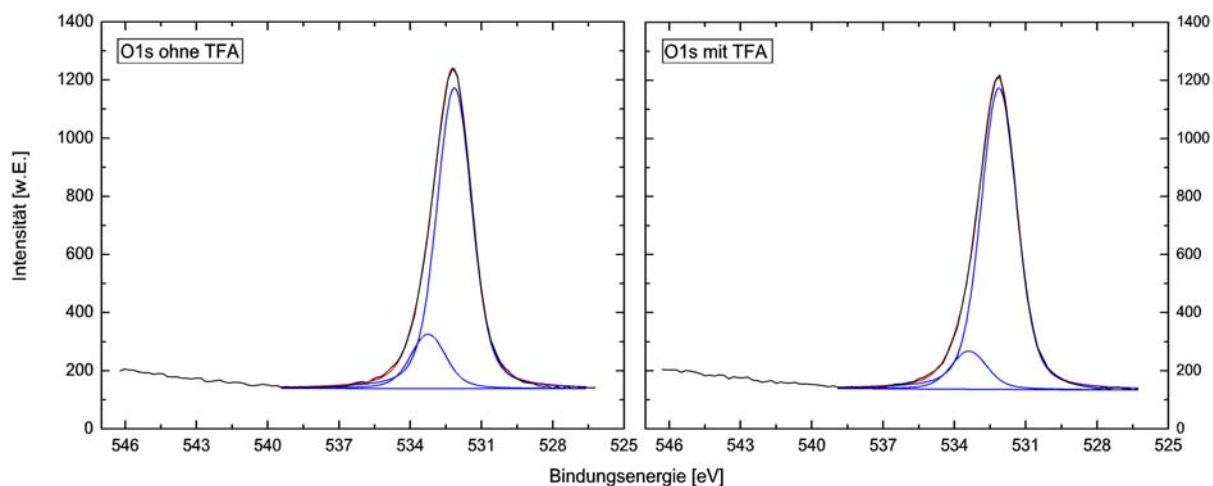


Abb. E29 O1s-XP-Detailspektren des PEG-Graftpolymers auf Glas vor (links) und nach (rechts) TFA-Behandlung

O1s	vor TFA		nach TFA	
	C=O	C-O	C=O	C-O
ber.	2	6	2	6
exp.	1,1	6,0	0,7	6,0

Der bereits beim Vergleich der C1s- und O1s-Signale auffallend geringere Anteil an Carbo-nylkohlenstoff (C=O) im Vergleich zum berechneten Wert läßt sich dadurch erklären, daß die Veresterung mit β -Alanin nicht quantitativ abläuft, d.h. es werden weit weniger terminale PEG-OH-Gruppen funktionalisiert als im gesamten Polymer vorhanden. Dies mag an der Kompaktheit des Polymerfilms liegen, die dazu führt, daß das sterisch anspruchsvolle DCC-aktivierte Fmoc- β -Alanin nicht in tiefere Schichten eindringen kann. Deutlich wird dies auch am Verhältnis N-C zu C=O. Aufgrund des insgesamt schwächeren N1s-Signals (Abb. E30) sind die berechneten Flächeninhalte der Signale mit größeren Fehlern behaftet und deswegen nur annähernd gleich (12,4 zu 13,5).

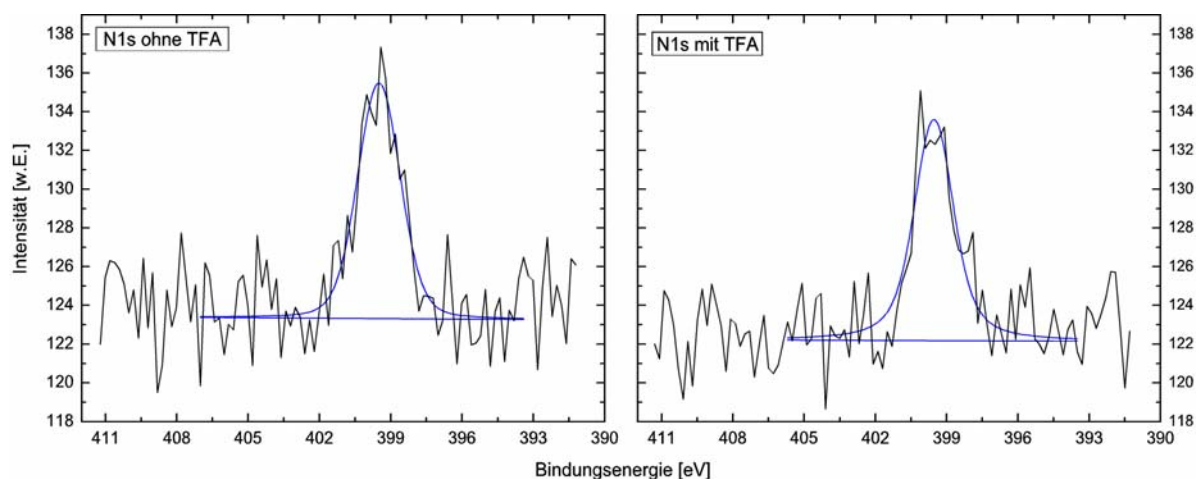


Abb. E30 N1s-XP-Detailspektren des PEG-Graftpolymers auf Glas vor (links) und nach (rechts) TFA-Behandlung

N1s	vor TFA		nach TFA	
	N-C	C=O	N-C	C=O
ber.	1	2	1	2
exp.	1,0	12,4	1,0	13,5

Zusammenfassend läßt sich schlußfolgern, daß die Behandlung mit TFA keinen signifikanten Einfluß sowohl auf das Graftpolymer und als auch auf kovalent gebundenes β -Alanin erkennen läßt. Einer Festphasensynthese auf diesem Träger steht somit nichts im Wege.

3.2 Proteinresistenz auf PEG-gegrafteten Glasoberflächen

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie an adsorbierten, FITC-gelabelten Proteinen

Für einen ersten Test und eine grobe Aussage, ob die hergestellten graftpolymerisierten Glasobjektträger proteinresistente Eigenschaften aufweisen, wurden vier verschiedene Proteine mit dem Fluorophor FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert (Abb. E31). Die Trennung der markierten Proteine von nicht umgesetztem FITC nach der Reaktion erfolgte über Sephadex[®]-Säulen. Sie weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgrößen und Sequenzen verschiedene Markierungsgrade *MG* auf:

Tab. 12 FITC-markierte Proteine; erhaltene Proteinkonzentrationen *P* und Markierungsgrade *MG*

Protein	<i>P</i> [mg/mL]	<i>MG</i> [mol _{FITC} /mol _{Protein}]
BSA	1,91	3,21
γ-Globulin	4,04	2,83
Lysozym	2,11	1,27
Fibrinogen	1,95	4,91

In Konzentrationen von ca. 2 mg FITC-Protein pro mL PBS-Lösung wurden die Proteine für eine Stunde unter Lichtausschluß auf die zu untersuchenden Oberflächen gegeben und nach anschließendem Waschen und Trocknen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In Tabelle 13 sind die Mikroskopiebilder zusammengefaßt.

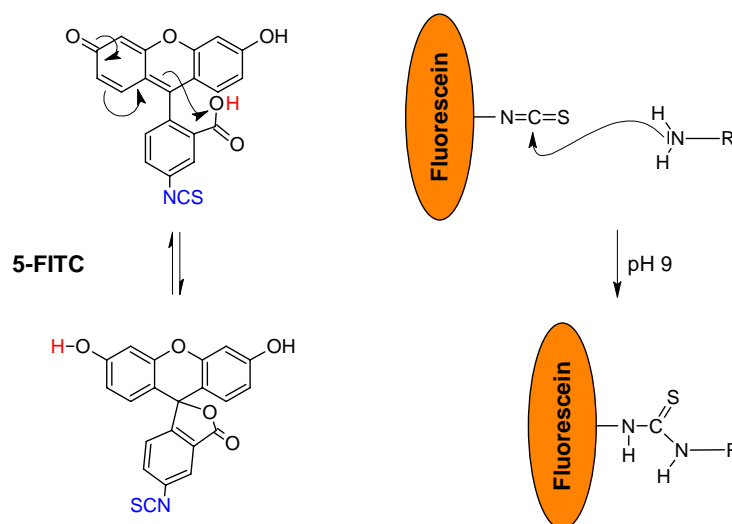









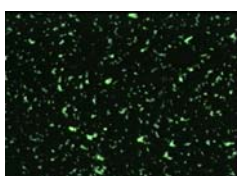
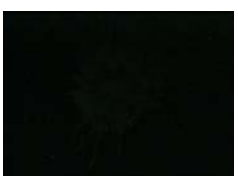



Abb. E31 Struktur des Isothiocyanats und Reaktionsschema mit einem primären Amin zum Thioharnstoff

Tab. 13 Fluoreszenzmikroskopaufnahmen FITC-markierter Proteine auf verschiedenen Glasoberflächen (200-fach)

	unbehandelt	PEG-OH	PEG-NH-ac
BSA			
γ -Globulin			
Lysozym			
Fibrinogen			

Bei den PEG-gegrafteten Trägern („PEG-OH“) ist bei keinem der FITC-markierten Proteine ein Fluoreszenzsignal zu erkennen. Eine (sichtbare) Adsorption von Proteinen hat in diesen Fällen folglich nicht stattgefunden. Ein geringer Teil an Protein adsorbiert allerdings unspezifisch auf unbehandeltem Glas in zufällig angeordneten, grün fluoreszierenden Punkten unterschiedlicher Größe, was in den hier gedruckten Mikroskopaufnahmen weniger zur Geltung kommt als in den Originalbilddateien an einem Bildschirm. Besonders deutlich ist die Adsorption im Falle des FITC-Fibrinogens zu erkennen, das eine Paraderolle im unspezifischen Binden an Oberflächen einnimmt. Man erkennt deutlich die grün fluoreszierenden, kleinen Einheiten. Für die Tatsache, daß die Proteine BSA, γ -Globulin und Lysozym auf unbehandeltem Glas scheinbar nur sehr wenig adsorbieren, kann es mehrere Gründe geben. Zum einen könnten diese markierten Proteine in homogenen dünnen Filmen und nicht in unregelmäßigen Anhäufungen wie das Fibrinogen adsorbieren, was auch die insgesamt höhere Helligkeit im Vergleich mit den PEG-OH-Aufnahmen erklärt. Zum anderen weisen die Proteine BSA, γ -Globulin und Lysozym geringere FITC-Markierungsgrade als das Fibrinogen auf (Tab. 12), was bei gleicher Empfindlichkeit des Fluoreszenzmikroskops zu unterschiedlichen Intensitäten führt.

Bei den PEG-terminierten Oberflächen erscheint die jeweilige Probe schwarz. Eine Adsorption scheint bei allen Proben, wie bereits erwähnt, nicht stattgefunden zu haben. Selbst die mit β -Alanin modifizierte und mit Essigsäureanhydrid/Diisopropylethylamin (1:2) acetylierte PEG-Oberfläche („PEG-NH-ac“) ist in der Lage, das Ablagern von Proteinen zu unterbinden. Der fluoreszierende Hintergrund der FITC-Lysozymprobe auf PEG-NH-ac lässt sich folgendermaßen erklären: Das Lysozym-FITC-Gemisch ließ sich nach der Markierungsreaktion nur sehr schlecht über die Sephadex[®]-Säule trennen. Somit könnte in der Proteinlösung überschüssiges FITC mit nicht vollständig acetylierten Aminogruppen der PEG- β -Alanin-Oberfläche wie in Abbildung E31 reagiert haben (R stünde dann für $-\beta$ -Ala]-PEG). Während der Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheint die Glasoberfläche dann als gleichmäßig grün.

Für einen exakteren Nachweis der Proteinresistenz, im Prinzip ein „Nichtvorhandensein“ von Proteinen auf Oberflächen, bietet sich die XP-Spektroskopie an.

3.2.2 XP-Spektroskopie von adsorbierten Proteinen auf Glasoberflächen

Es wurden hierzu die reinen, unmodifizierten Proteine in PBS-Lösungen zu 2 mg/mL für eine Stunde auf die zu untersuchenden Träger gegeben, gewaschen, getrocknet und analysiert. Als Referenz diente ein unbehandelter Träger, auf dessen Oberfläche Fibrinogen aus Lösung adsorbiert war. Als Anhaltspunkt dienten die jeweiligen N1s-Signale, die zweifelsfrei bei Anwesenheit eines adsorbierten Proteins hohe Intensitäten aufweisen. In Abbildung E32 sind die N1s-Detailspektren der einzelnen Proben zusammengefasst.

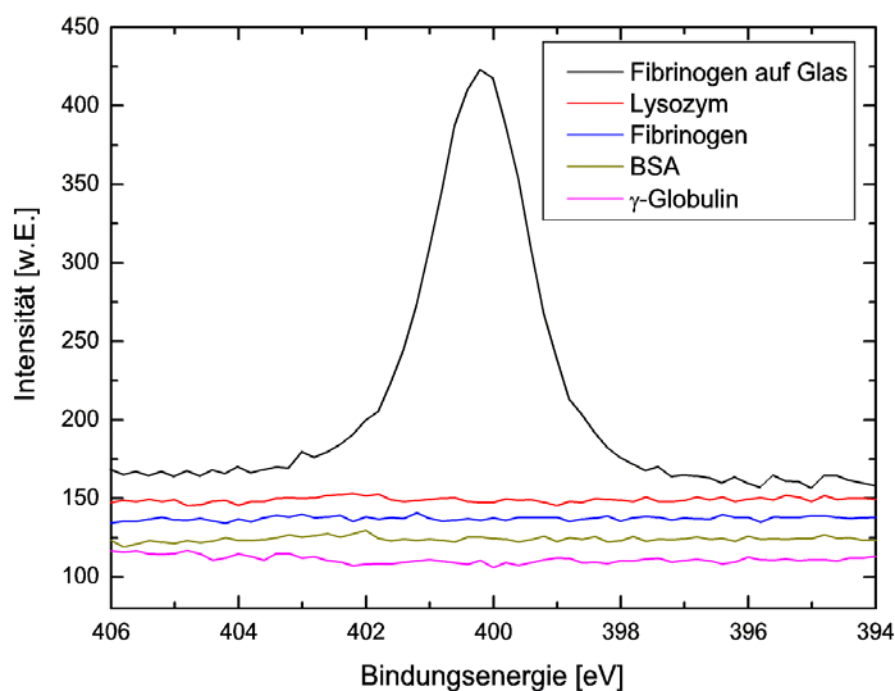


Abb. E32 N1s-XP-Detailspektren eines PEG-Graftpolymer auf Glas nach Inkubation mit unterschiedlichen Proteinen und einem Referenzspektrum (Fibrinogen auf Glas)

Wie zu erwarten, zeigt die Probe mit dem adsorbierten Fibrinogen auf unbehandeltem Glas die höchste Intensität bei ca. 400 eV für das N1s-Signal. Bei den PEG-OH-Glasträgern, die mit den Proteinlösungen inkubiert wurden, ist kein N1s-Signal zu erkennen, d.h. es hat keine Proteinadsorption auf der Oberfläche stattgefunden. Derselbe Versuch, also die Inkubation mit vier verschiedenen, unmarkierten Proteinen wurde auch für Glasträger durchgeführt, die ebenso graftpolymerisiert, aber zusätzlich mit einer β -Alanin-Funktionalität versehen waren, deren Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid und DIPEA (1:2) acetyliert wurden (PEG-NH-ac). Abbildung E33 zeigt die aufgenommenen N1s-XP-Detailspektren. Als Referenz diente wiederum die Probe des adsorbierten Fibrinogens auf unbehandeltem Glas.

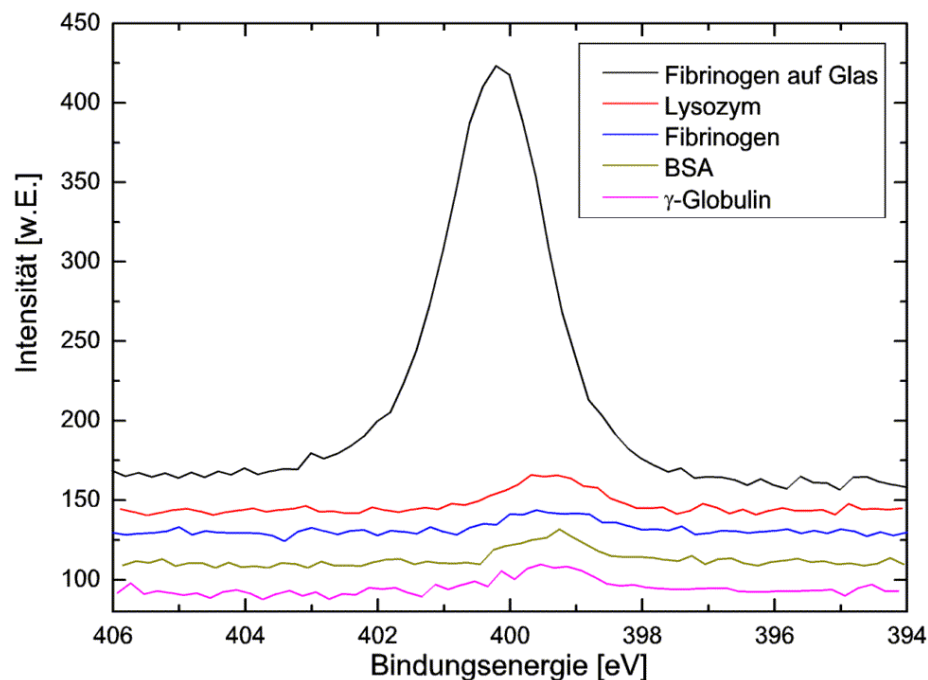


Abb. E33 N1s-XP-Detailspektren eines PEG-NH-ac-Glasträgers nach Inkubation mit unterschiedlichen Proteinen

Auch für diesen Fall ist keine Proteinadsorption auf den PEG-Trägern zu erkennen, da ein Signal ähnlich der Referenz (Fibrinogen auf Normalglas) nicht zu detektieren war. Das schwache Signal bei ca. 399 eV stammt eindeutig von der acetylierten β -Alanineinheit, wie ein Vergleich mit Abbildung E30 beweist.

3.3 Peptidepitop-Synthesen an modifizierten Glasobjektträgern

3.3.1 Peptidsynthesen aus Lösung

3.3.1.1 Anbindung des Rink-Linkers

Um das Peptid nach erfolgreicher Synthese massenspektrometrisch untersuchen zu können, muß vor Beginn ein Linker zwischen der Trägeroberfläche und der ersten Aminosäure eingebaut werden. Es wurde zu diesem Zweck der Rink-Linker gewählt, da dieser während des Entschützens der Seitenschutzgruppen am Ende der Synthese mit TFA das Peptid als Carbonsäureamid freigibt. Die Einführung des Fmoc-Rink-Linkers auf die PEG-gegraftete Glasoberfläche gelingt ähnlich wie eine Veresterung mit Fmoc- β -Alanin über seine Carbonsäure-Funktionalität mit Carbodiimid und Base (DCC/NMI) in DMF. Die maximale Belegungsdichte an Rink-Linker ist scheinbar unabhängig von der Reaktionszeit und betrug durchschnittlich $(16,97 \pm 0,30)$ nmol/cm² (Abb. E34). An die durch die Abspaltung der Fmoc-Gruppen freigewordenen Aminogruppen wurden sukzessive die Aminosäuren angekoppelt.

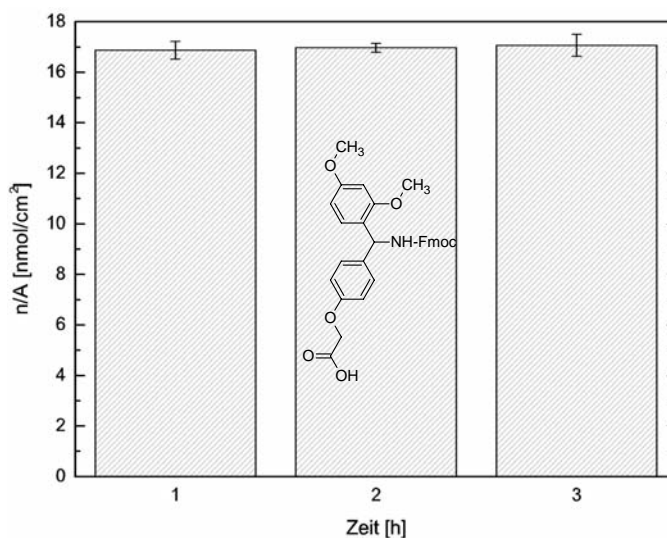


Abb. E34 Kopplungsausbeute des Rink-Linkers an PEG-OH-Glasoberflächen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

3.3.1.2 Auswahl der Peptidepitop-Sequenzen

Für die ersten Machbarkeitsstudien der Peptidsynthese wurden Epitop-Sequenzen ausgewählt, die zweifelsfrei von spezifischen Antikörpern erkannt werden und bereits genau untersucht sind. Die Wahl fiel dabei auf folgende Peptidsequenzen:

Tab. 14 Ausgewählte Epitop-Sequenzen und spezifische Antikörper

Bezeichnung	Sequenz	erkannt von
"Epitop 1"	DTYRYIDYA	AU1 ⁸¹
"Epitop 2"	YPYDVPDYA	anti-HA ⁸²
"Epitop 5"	DYKDDDDK	anti-FLAG ⁸³

Diese Epitope sollen später ebenfalls in einer Spotsynthese synthetisiert und mit ihnen erste Antikörper-Bindungsstudien auf dem modifizierten Glasträger durchgeführt werden.

3.3.1.3 Ergebnisse der Epitopsynthese aus Lösung

Um die Ergebnisse später mit Synthesen aus Aminosäuretonern vergleichen zu können, wurden für die Synthesen aus Lösung auch die voraktivierten Fmoc-*L*-Aminosäure-Pentafluorphenylester (Fmoc-AS-OPfp) ausgewählt und in Konzentrationen von jeweils 0,3 M in trockenem DMF eingesetzt. Der entsprechende Träger wurde vor jeder Kopplung für zehn Minuten in getrocknetem DMF vorgequollen. Die Kopplungszeit betrug jeweils eine Stunde. Nach jedem Kopplungszyklus wurden nicht umgesetzte Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid acetyliert und die Abspaltung der Fmoc-Gruppen mittels UV/Vis-Spektrometrie quantifiziert und relativ zum Oberflächeninhalt das Verhältnis n/A in $[\text{nmol}/\text{cm}^2]$ berechnet.

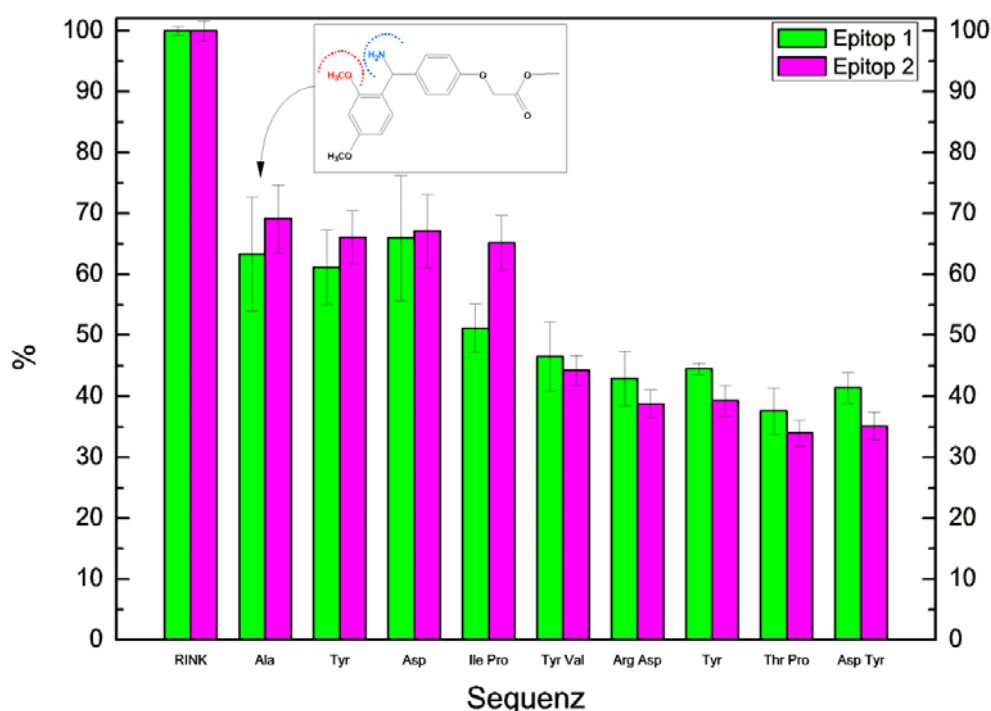


Abb. E35 Syntheseverlauf für Epitope 1 und 2 aus Lösung bezogen auf den Rink-Linker

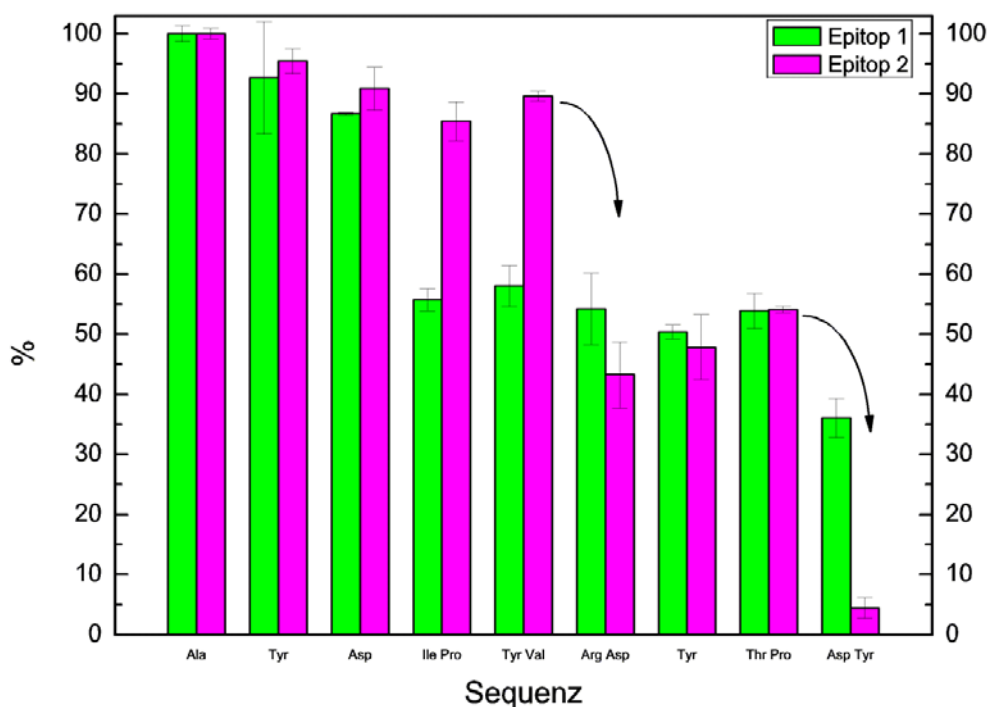
Abbildung E35 gibt die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte bezogen auf den ange-bundenen Rink-Linker wieder. Besonders auffällig ist der Rückgang der Kopplungseffizienz um bis zu 30 % beim Anbinden der ersten Aminosäure *L*-Alanin. Ein Grund dafür könnten sterische Hinderungen, verursacht durch den Rink-Linker, sein. Einen zweiten deutlichen Rückgang (ca. 20 %) verzeichnet die Reaktion des Fmoc-Valin-OPfp-Esters mit dem zuvor gekoppelten Prolin (Epitop 2). Auch hier könnte man das Argument der sterischen Hinderung in Betracht ziehen, welches allerdings bei der letzten Kopplung von Tyr an Pro nicht gelten würde (Epitop 2). Berechnet man die durchschnittliche Kopplungseffizienz pro Zyklus bezogen auf die erste Aminosäure (Ala = 100 %), so ergibt sich für Epitop 1 ein Wert von 94,9 %, für Epitop 2 ein Wert von 91,9 %.

Wie wichtig eine ausreichende Quellzeit des gegrifteten Polymers vor jeder Kopplung ist, zeigt der Vergleich mit Daten, bei denen die Quellzeit nur fünf Minuten betrug (Tab. 15)

Tab. 15 Einfluß der Quellzeit auf die Kopplungseffizienz während der Peptidsynthese

Epitop	Quellzeit	Kopplungszeit	Ø Kopplungseffizienz	Gesamtausbeute
1	5 min	1 h	88,0 %	36,1 %
2	5 min	1 h	67,8 %	4,4 %
1	10 min	1 h	94,9 %	65,8 %
2	10 min	1 h	91,9 %	50,8 %

Besonders deutlich ist der Unterschied bei Epitop 2 auszumachen. Eine Verdoppelung der Quellzeit führt zu einer annähernd 12-fach höheren Gesamtausbeute. Hier verursachen hauptsächlich die beiden Prolin-Bausteine die signifikante Differenz (Abb. E36).

**Abb. E36** Syntheseverlauf der Epitope 1 und 2 relativ zur ersten Aminosäure nach 5 min Quellzeit

Für das Epitop 5 (**DYKDDDDK**) mit acht Aminosäuren ergab sich eine theoretische Gesamtausbeute von 46,3 % mit einer durchschnittlichen Kopplungseffizienz von 89,6 %. Die Vorquellzeit betrug in diesem Fall ebenfalls jeweils zehn Minuten.

Die mit den Peptidepitopen versehenen Glaträger wurden anschließend mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan unter Zusatz von Triisobutylsilan als Radikalfänger (Scavenger) behandelt. Dabei werden zum einen die Seitenschutzgruppen entfernt und zum anderen das Peptidepitop als Amid vom Rink-Linker abgespalten. Nach dem Einengen der Abspaltungslösung mit einer Gefriertrocknungsanlage wurden die Rückstände mit MALDI-TOF analysiert.

Tab. 16 Massenspektrometrische Analyse der Peptidepitop-Synthesen aus Lösung

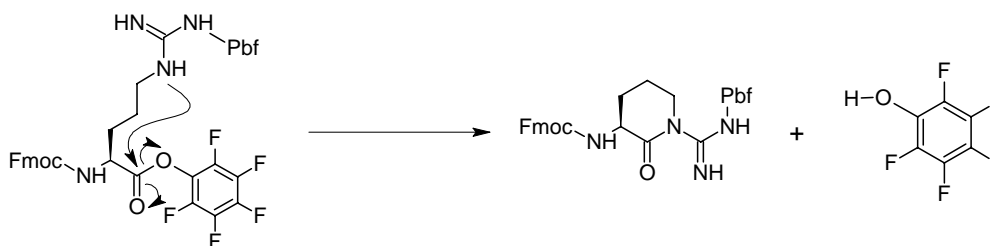
Peptidepitop	Sequenz	theoretische Masse ^j	MALDI-TOF
Epitop 1	DTYRYIDYA	1178,55 g/mol	1178,41
Epitop 2	YPYDVPDYA	1101,49 g/mol	1123,38 (M ⁺ + Na ⁺) 1139,37 (M ⁺ + K ⁺)
Epitop 5	DYKDDDDK	1012,42 g/mol	1012,56

Wie in Tabelle 16 ersichtlich ist, konnten alle Peptide nach Abspalten vom PEG-gegrafteten Glaträger im Massenspektrum als Amide identifiziert werden. Lediglich bei Epitop 2 findet man höhere Massen als erwartet, die assoziierten Kationen zugerechnet werden können.

Mit einer durchschnittlichen Kopplungseffizienz der einzelnen Syntheseschritte von 92 % wird ein Wert erreicht, der sich durchaus mit Ausbeuten von Peptidsynthesen im automatisierten Laborbetrieb an bereits optimierten Harzen und angepassten *in situ*-Aktivierungen vergleichen läßt.

3.3.1.4 Ergebnisse der Epitopsynthese aus Aminosäuretonern

Die Synthese der Peptidepitope mit Aminosäuretonern ist nahezu identisch mit denen aus Lösung. Lediglich Zustand und Zusammensetzung des Reaktionsmediums ist unterschiedlich. Die entsprechenden Testgläser werden vollständig mit dem Toner eingestreut und zum Kopeln auf eine Heizplatte bei unterschiedlichen Temperaturen und für eine bestimmte Zeit gelegt. Bei den Waschschrinen gab es nur eine Ergänzung, daß nämlich im Falle nicht entfernten Tonerpigmentes nach dem Acetylieren der nicht umgesetzten Aminogruppen zusätzlich der Träger mit Chloroform gewaschen wurde. In Abbildung E37 sind die Syntheseverläufe bei 150 °C Kopplungstemperatur und einer Kopplungszeit von zehn Minuten dargestellt.

**Abb. E38** Inaktivierung von Fmoc-L-Arg(Pbf)-OPfp-Estern durch δ -Laktamisierung

Im Falle des Arginins [Arg(L)] wurde aufgrund von möglichen Stabilitätsproblemen⁸⁴ der voraktivierten Aminosäure bei der Tonerherstellung (Abb. E38) vorerst auf eine Synthese aus Lösung zurückgegriffen.

^j für Monoisotope und als C-terminales Amid, verursacht durch die Abspaltung am Rink-Linker

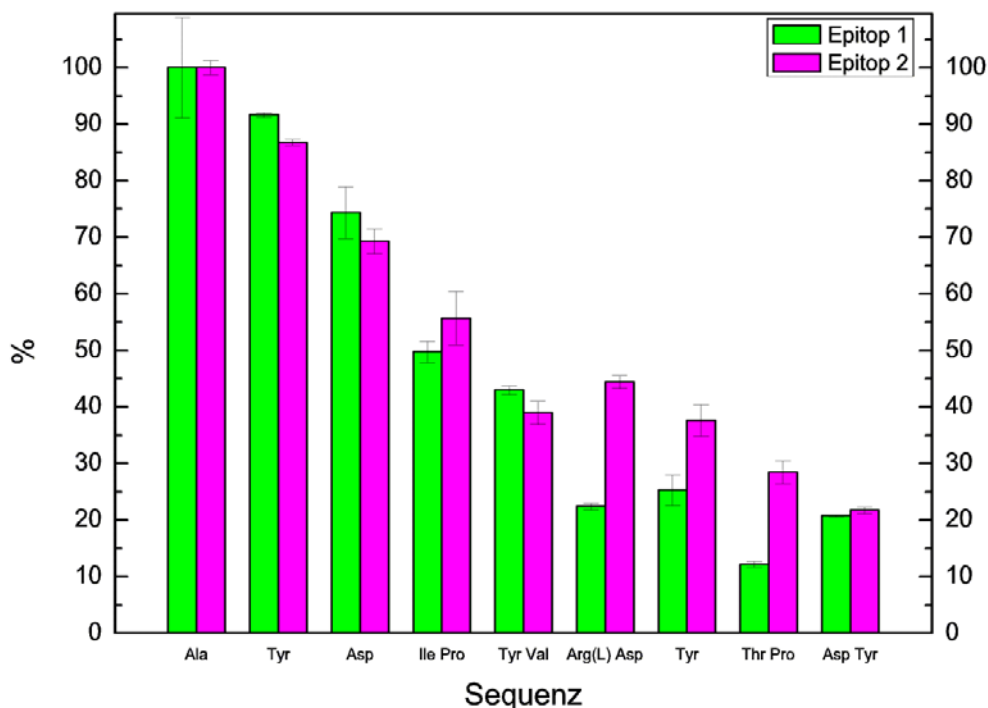


Abb. E37 Syntheseverlauf der Epitope 1 und 2 mit AS-Tonern relativ zur ersten Aminosäure (bei 150 °C und je 10 min)

Die Gesamtausbeuten erreichen bei beiden Sequenzen im Vergleich zur Synthese aus Lösung bei zehnmütigem Vorquellen nur etwa die Hälfte. Nach dem Abspalten der Peptide vom Träger konnte allerdings nur Epitop 2 identifiziert werden (Tab. 17). Die Probe mit dem erwarteten Epitop 1 zeigte lediglich schwache Signale im Massenbereich von ca. 800 m/z an, was für evtl. kürzere Fehlsequenzen, verursacht durch Syntheseabbrüche, spricht. Dies müßte sich aber auch in den ermittelten Syntheseausbeuten am Ende eines jeden Kopplungsschrittes bemerkbar machen. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß wegen der insgesamt geringen Menge an synthetisiertem Peptid es auf dem Glasträger zu Produktverlusten bei der Aufarbeitung kam.

Tab. 17 Massenspektrometrische Analyse der Peptidepitop-Synthesen aus AS-Tonern

Peptidepitop	Temperatur	Kopplungszeit	Sequenz	theoretische Masse	MALDI-TOF
Epitop 1	150 °C	10 min	DTYRYIDYA	1178,55 g/mol	-
Epitop 2	150 °C	10 min	YPYDVPDYA	1101,49 g/mol	1101,45 m/z

Es ist dennoch bemerkenswert, daß unter solch drastischen Bedingungen ($T = 150$ °C) in so kurzen Kopplungszeiten ($t = 10$ min) das Peptid **YPYDVPDYA** fehlerfrei - die Sequenz betreffend - synthetisiert werden konnte.

Tab. 18 Durchschnittliche Kopplungseffizienz und Gesamtausbeute bei der Peptidsynthese mit AS-Toner

Epitop	Temperatur	Kopplungszeit	Ø Kopplungseffizienz	Gesamtausbeute
1	150 °C	10 min	82,1 %	20,7 %
2	150 °C	10 min	82,6 %	21,7 %

Die Synthesen der Epitope 1 und 2 wurden bei niedrigeren Temperaturen (100 °C bzw. 125 °C) und längeren Kopplungszeiten (30 min) wiederholt.

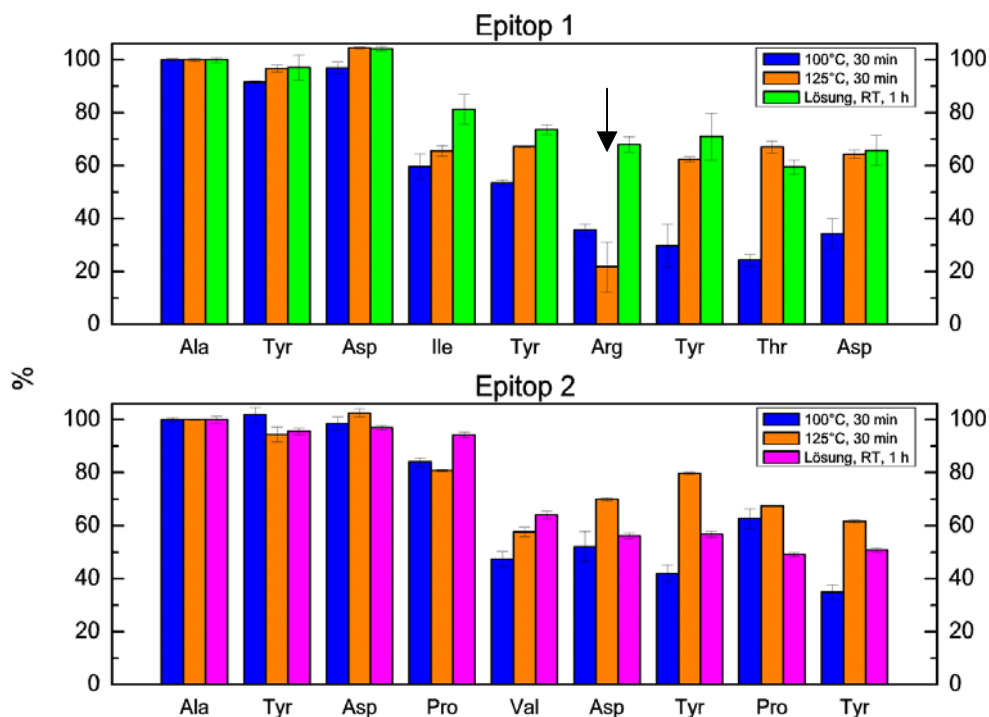


Abb. E39 Vergleich der Syntheseverläufe für Epitope 1 und 2 aus Lösung und AS-Toner für 100 °C bzw. 125 °C bei $t = 30$ min

Beim Vergleich der Syntheseverläufe (Abb. E39) fällt auf, daß die ermittelten Kopplungsausbeuten mit AS-Tonern großen Schwankungen unterliegen. Insbesondere die Entwicklung für $T = 125$ °C ist stellenweise unsinnig, wie z.B. die Zunahme von ca. 40 % für die Kopplungsausbeute von Arg nach Tyr bei Epitop 1. Bei der Analyse der Peptide stellte sich anschließend heraus, daß dennoch die Synthese des Epitop 1 bei einer Reaktionstemperatur von 125 °C erfolgreich verlaufen war (Tab. 19). Dies zeigt, daß die ermittelten Kopplungseffizienzen meßtechnischen Schwankungen unterlagen.

Tab. 19 Massenspektrometrische Analyse der Peptidepitop-Synthesen aus AS-Tonern

Peptidepitop	Sequenz	Temperatur	Kopplungszeit	theoretische Masse	MALDI-TOF
Epitop 1	DTYRYIDYA	100 °C	30 min	1178,55 g/mol	-
Epitop 2	YPYDVPDYA	100 °C	30 min	1101,49 g/mol	-
Epitop 1	DTYRYIDYA	125 °C	30 min	1178,55 g/mol	1178,39 m/z
Epitop 2	YPYDVPDYA	125 °C	30 min	1101,49 g/mol	-

Anzumerken ist, daß für die erfolgreiche Synthese von Epitop 1 mit einer Arginin-Einheit an Position 6 bei 125 °C erstmals ein Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OPfp-Toner verwendet wurde. Das zeigt, daß trotz der für die Stabilität des voraktivierten Arginins kritischen Temperatur ein Einbau in die Peptidsequenz gelungen ist. Das Fehlen der Massenpeaks für die übrigen Peptidepitope (1 und 2 bei 100 °C; 2 bei 125 °C) läßt sich entweder auf unvollständige Synthesen, unzureichendes Entfernen des Peptids vom Träger oder auf den bereits erwähnten Produkt-

verlust während der Aufarbeitung zurückführen. Wie sich durch eigene Studien auf modifizierten Glaträgern zeigte, eignet sich das Peptidepitop **DTYRYIDYA** und der spezifische Antikörper AU1 weniger gut als exemplarisches Erkennungspaar. Somit wurde verstärkt Konzentration auf das Epitop 5 (**DYKDDDDK**) gelegt, das als zweite Komponente eines anvisierten Epitop-Schachbrettmusters neben Epitop 2 fungieren sollte. Die Synthese mit AS-Tonern bei 90 °C mit einer Kopplungszeit von 90 Minuten im Vergleich zu Epitop 2 sind in Abbildung E40 zu sehen.

Tab. 20 Durchschnittliche Kopplungseffizienz und Gesamtausbeute bei der Peptidsynthese mit AS-Toner

Epitop	Temperatur	Kopplungszeit	Ø Kopplungseffizienz	Gesamtausbeute
2	90 °C	90 min	86,2 %	30,4 %
5	90 °C	90 min	93,2 %	61,1 %

Die Gesamtausbeute bei dem kürzeren Epitop 5 ist fast doppelt so hoch wie bei Epitop 2 (Tab. 20). Der Grund dafür liegt allerdings nicht in der unterschiedlichen Länge der beiden Peptide, sondern in den unterschiedlichen durchschnittlichen Kopplungsausbeuten. Zum Vergleich sind die Kopplungsausbeuten der Synthesen von Epitop 2 und 5 aus Lösung in Tabelle 21 wiedergegeben.

Tab. 21 Durchschnittliche Kopplungseffizienz und Gesamtausbeute bei Epitopen 2 und 5 aus Lösung

Epitop	Quellzeit	Kopplungszeit	Ø Kopplungseffizienz	Gesamtausbeute
2	10 min	1 h	91,9 %	50,8 %
5	10 min	1 h	89,6 %	46,3 %

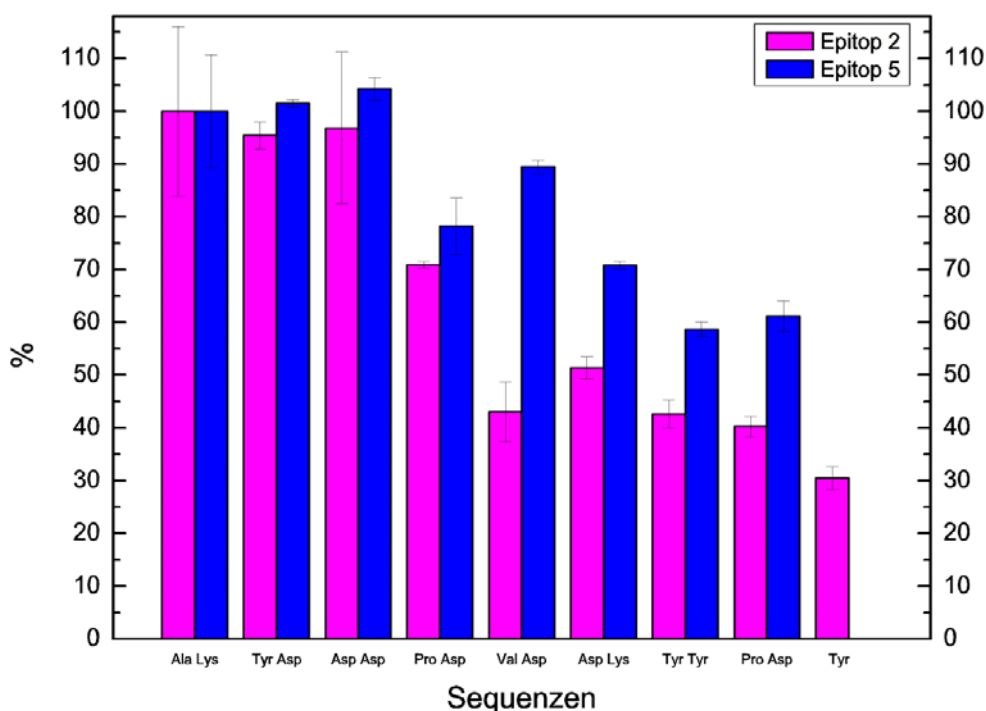


Abb. E40 Syntheseverlauf der Epitope 2 und 5 mit AS-Tonern relativ zur ersten Aminosäure (bei 90 °C und je 90 min)

Im Falle von Epitop 5 ist die Synthese mit AS-Tonern bei 90 °C und 90 Minuten Kopplungszeit einer Synthese aus Lösung sogar überlegen, was die durchschnittliche Kopplungseffizienz und damit auch die Gesamtausbeute betrifft.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie für die Tonersynthese sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tab. 22 Massenspektrometrische Analyse der Peptidepitop-Synthesen aus AS-Tonern

Peptidepitop	Temperatur	Kopplungszeit	Sequenz	theoretische Masse	MALDI-TOF
Epitop 2	90 °C	90 min	YPYDVPDYA	1101,49 g/mol	1101,64 m/z
Epitop 5	90 °C	90 min	DYKDDDDK	1012,42 g/mol	1012,26 m/z

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die Synthesen der drei Peptidepitope aus einer Lösung der *L*-Aminosäure-OPfp-Ester in DMF erfolgreich an den derivatisierten PEG-Glasträgern durchgeführt werden konnten. Die erzielten durchschnittlichen Kopplungsausbeuten liegen im Bereich von 90 %. Auch hier hat eine erhöhte Quellzeit positiven Einfluß auf die Ausbeute.

Eine Synthese mit Hilfe der Aminosäuretoner hatte nicht bei allen Kombinationen aus Zeit und Temperatur den gleichen erwünschten Erfolg. Die Peptidsequenzen von Epitop 1, 2 und 5 ließen sich dennoch unter unterschiedlichen Bedingungen synthetisieren und eindeutig im Massenspektrum nachweisen (Tab. 23).

Tab. 23 Übersicht erfolgreicher Peptidsynthesen aus Lösungen in DMF und mit Aminosäuretonern

Peptidepitop	Sequenz	aus Lösung	aus AS-Toner
Epitop 1	DTYRYIDYA	☑	125 °C, 30 min ☑
Epitop 2	YPYDVPDYA	☑	150 °C, 10 min 90 °C, 90 min ☑
Epitop 5	DYKDDDDK	☑	90 °C, 90 min ☑

3.4 Antikörper-Bindungsstudien

3.4.1 Immobilisierung von Peptid-Epitopen auf PEG-gegrafteten Glaträgern

Bevor die oberflächenmodifizierten Glaträger für eine Spotsynthese von Peptiden eingesetzt wurden, überprüfte man zunächst, inwieweit sich vorsynthetisierte, immobilisierte Peptidepitope durch spezifische Antikörper erkennen lassen und inwieweit sich die proteinresistenten Eigenschaften auf das Signal-Rausch-Verhältnis auswirken.

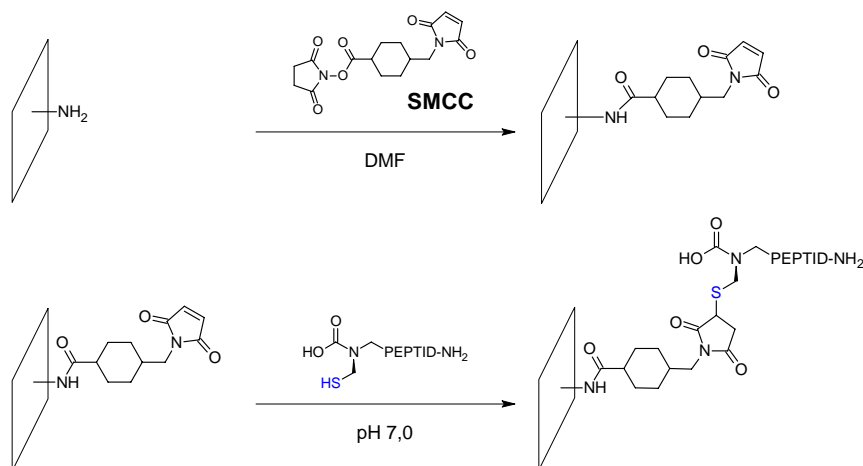


Abb. E41 Kovalente Anbindung von Cystein-terminierten Peptiden an aminofunktionalisierte Oberflächen mittels SMCC

Bei der Immobilisierung der Peptidepitope entschied man sich für den bifunktionalen Linker SMCC^k, der zum einen über seinen Succinimidyl-aktivierten Carbonsäureterminus an aminofunktionalisierte Oberflächen über eine Amidbindung gekoppelt werden kann und zugleich an seinem anderen Ende eine Maleimid-Funktionalität bereitstellt. Mit letzterer reagieren ähnlich einer MICHAEL-Addition spezifisch Thiolgruppen, die sich über die Aminosäure Cystein in Peptidsequenzen C-terminal einbauen lassen (Abb. E41)⁸⁵. So ist gewährleistet, daß das gewünschte Peptid mit seinem C-Terminus mit der Oberfläche kovalent verbunden ist und der N-Terminus für eine ungehinderte Erkennung durch den Antikörper präsentiert werden kann.

Um beide Schritte, 1. die Anbindung des Linkers an die Oberfläche und 2. die Addition des Cystein-Restes des Peptids zu quantifizieren, wurde zunächst eine PEG- β -Alanin-Glasoberfläche mit acetylierten OH-Gruppen und bekannter NH₂-Funktionalitätsdichte („Fmoc- β -Ala-OH I“, Abb. 40) mit SMCC versetzt und in einem zweiten Schritt erneut Fmoc- β -Alanin mit DCC/NMI zugegeben, um diejenigen Aminogruppen zu erfassen, die nicht mit SMCC umgesetzt wurden („Fmoc- β -Ala-OH II“). Um eine Reaktion des *in situ* aktivierten Fmoc- β -Alanins mit dem SMCC-Linker auszuschließen, wurde dieser zwischen beiden Schritten mit Ethylmercaptan (C₂H₅SH) blockiert. Aus der Differenz der beiden Funktionalitätsdichten, vor und nach dem Ankoppeln von SMCC, läßt sich eine Aussage über die Kopplungseffizienz des Linkers bestimmen. Abbildung E42 zeigt die erhaltenen Funktionalitätsdichten und deren Differenz mit und ohne Blockierung des SMCC-Linkers.

^k SMCC: Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure

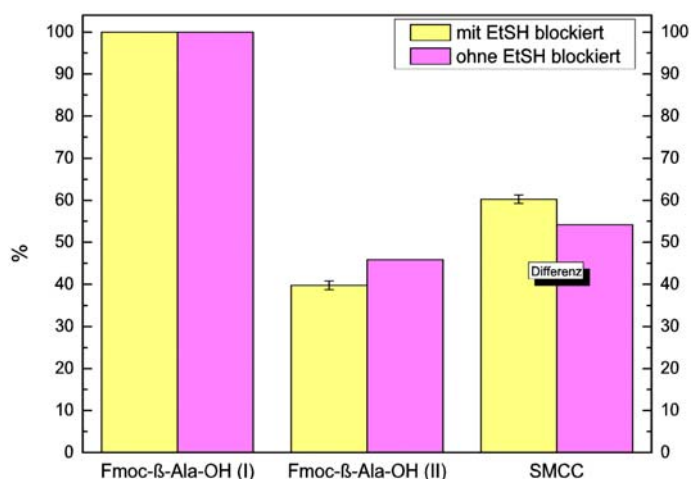


Abb. E42 Ausbeute der SMCC-Kopplung [in %] an PEG-β-Alanin-terminierte Glasoberflächen

Der Einfluß einer Blockierung des Linkers vor der erneuten Kopplung mit Fmoc-β-Alanin ist sehr gering und bewegt sich in der Größenordnung von 5 %. Die Effizienz der Bindung des SMCC-Linkers kann mit 60 % angegeben werden.

Um den Schritt der Peptidimmobilisierung an den Linker zu quantifizieren, wurden SMCC-terminierte Glasoberflächen nach dem gleichen Schema hergestellt. Die Blockierung mit Ethylmercaptan fand nicht statt. Die zum Test eingesetzten Peptid epitope 2

und 5 trugen C-terminal als Anknüpfungspunkt die Aminosäure Cystein und als zusätzliche Besonderheit jeweils ihre terminalen Fmoc-Gruppen; die Seitenschutzgruppen wurden während der Synthese abgespalten. Somit war es möglich, die Kopplungseffizienz der beiden Epitopsequenzen an den Linker durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe zu messen. Abbildung E43 zeigt die erhaltenen Resultate bei einer angenommenen Kopplungseffizienz des SMCC an die Oberfläche von 60 %. Obwohl sich die beiden Peptide vollständig im verwendeten Phosphatpuffer bei pH 7.0 auflösen, zeigten sie auf den ersten Blick unterschiedlich gute Bindungsausbeuten an den SMCC-Linker. Epitop 2 (**YPYDVPDYAC**) bindet mit ca. 50 % an SMCC, Epitop 5 (**DYKDDDDKC**) nur mit ca. 20 %. Da die erhaltenen Werte lediglich das Abspalten der jeweiligen Fmoc-Gruppen widerspiegeln, muß auch in Betracht gezogen werden, daß gerade dieses Abspalten unterschiedlich vollständig ablaufen und somit die Resultate verfälschen kann. Auf der anderen Seite wäre durchaus vorstellbar, daß sich aufgrund unterschiedlicher Strukturen und Ladungsverhältnisse der Peptidsequenzen, verursacht durch die unterschiedliche Art und Anzahl an Seitengruppen, tatsächlich ungleichmäßige Reaktionsausbeuten bei der Kopplung an den SMCC-Linker ergeben können.

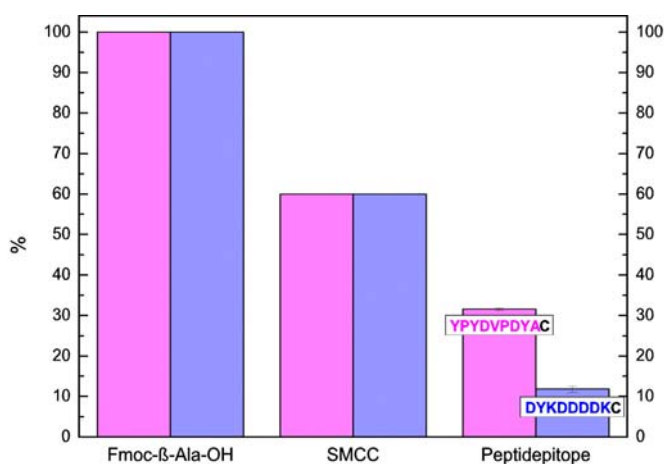


Abb. E43 Kopplungseffizienz [in %] der beiden Peptidepitope 2 und 5 an SMCC

3.4.2 Nachweis der SMCC-immobilisierten Peptidepitope mittels Antikörper

Nachdem die gewünschten Peptidepitope kovalent an die SMCC-modifizierte Oberfläche gebunden wurden, wird diese mit den spezifischen Antikörpern in einer Pufferlösung inkubiert. Die Antikörperdetektion ist auf zwei Wegen möglich. Zum einen kann der spezifische Antikörper bereits mit einem Farbstoff oder einem Enzym markiert sein oder man gibt einen markierten zweiten Antikörper hinzu, der den unmarkierten ersten Antikörper erkennt.

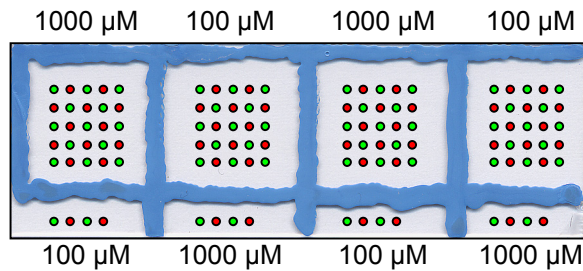


Abb. E44 Spotmuster eines PEG-gegrafteten, aminofunktionalisierten und SMCC-modifizierten Glasobjektträgers.

Konzentrationen beziehen sich auf die verwendeten Peptidlösungen. Die Zeile unterhalb der Schachbrettmuster dient als Kontrollstreifen. Die blauen Begrenzungen wurden mit einem wasserunlöslichen Lackstift erzeugt, um einzelne Reaktionsräume voneinander abzutrennen. Der linke Teil des Testträgers wurde mit dem anti-FLAG-Antikörper inkubiert, der spezifisch das Epitop 5 (**DYKDDDDK**) erkennt, der rechte Teil mit dem anti-HA-Antikörper versehen, der wiederum nur Epitop 2 (**YPYDVPDYA**) spezifisch erkennen soll. Abbildung E44 (oben) gibt diesen Sachverhalt schematisch wieder.

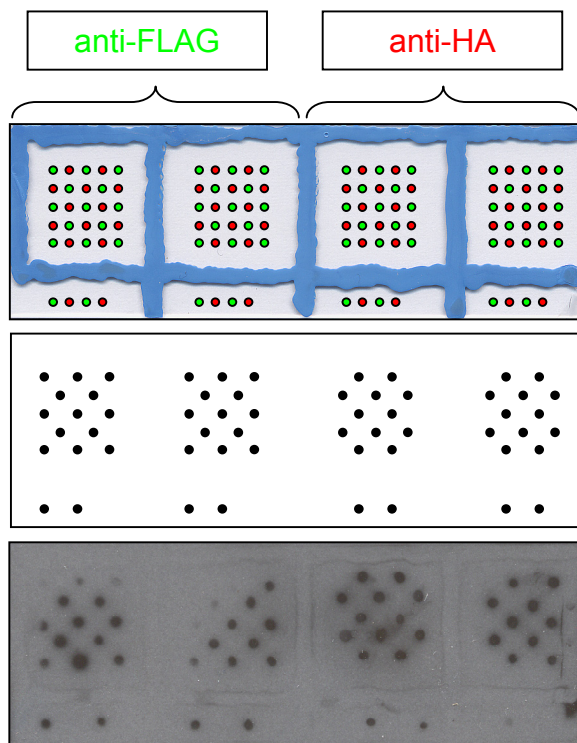


Abb. E45 Verteilungsmuster der spezifischen Erstantikörper (oben) und erwartetes Entwicklerbild nach Inkubation mit dem sekundären, POD-markierten anti-Maus-AK (Mitte) und entwickelter Fotofilm nach der ECL-Methode (unten)

Für einen ersten Test wurden dazu per Hand die Peptidepitope auf den Glas-träger in einer Art Schachbrettmuster aufgespottet. Das Spotvolumen der einzelnen Punkte betrug dabei jeweils 0,2 µL. Abbildung E44 zeigt ein bearbeitetes Foto eines Objektträgers mit dem erzeugten Spotmuster. Die grünen Punkte symbolisieren das Epitop 5, die roten Epitop 2. Die angegebenen

Konzentrationen beziehen sich auf die verwendeten Peptidlösungen. Die Zeile unterhalb der Schachbrettmuster dient als Kontrollstreifen. Die blauen Begrenzungen wurden mit einem wasserunlöslichen Lackstift erzeugt, um einzelne Reaktionsräume voneinander abzutrennen. Der linke Teil des Testträgers wurde mit dem anti-FLAG-Antikörper inkubiert, der spezifisch das Epitop 5 (**DYKDDDDK**) erkennt, der rechte Teil mit dem anti-HA-Antikörper versehen, der wiederum nur Epitop 2 (**YPYDVPDYA**) spezifisch erkennen soll. Abbildung E44 (oben) gibt diesen Sachverhalt schematisch wieder. Die Erstantikörper anti-FLAG und anti-HA entstammen beide aus der Maus. Eine sich anschließende Zweitinkubation mit einem Peroxidase (POD)-markierten anti-Maus-Antikörper auf dem gesamten Objektträger sollte nach Anwendung eines Lumineszenz-Reagenzes (ECL-Kit) ein Bild ergeben, wie in Abbildung E45 (Mitte) gezeigt ist. Auf der linken Seite werden nur die Peptidspots des Epitops 5 erkannt und auf der rechten Seite nur die des Epitops 2. Beim Vergleich der Abbildungen E45 Mitte und unten erkennt man eine nahezu vollständige Übereinstimmung. Wenige Ausnahmen könnten z.B. durch Eintrocknungseffekte während des Aufbringens der Peptidlösungen verursacht worden sein.

Für einen Test zum Ausschluß einer Kreuzreaktion der beiden Erstantikörper, wurde derselbe Träger noch einmal verwendet. Eine Kreuzreaktion würde vorliegen, wenn es zu einer Addition beider Farbkanäle im Fluoreszenzscanner, symbolisiert durch eine Gelbfärbung, käme. Zunächst mußten jedoch mit einem stripping-Puffer¹ sämtliche gebundenen Antikörper entfernt werden. Zu einer Neuinkubation wurde der Träger nun mit einem Gemisch aus einem Kaninchen-anti-HA-Antikörper und einem Maus-anti-FLAG-Antikörper in TBS-Puffer versetzt. Anschließend ließ man ein Gemisch von Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-Kaninchen-

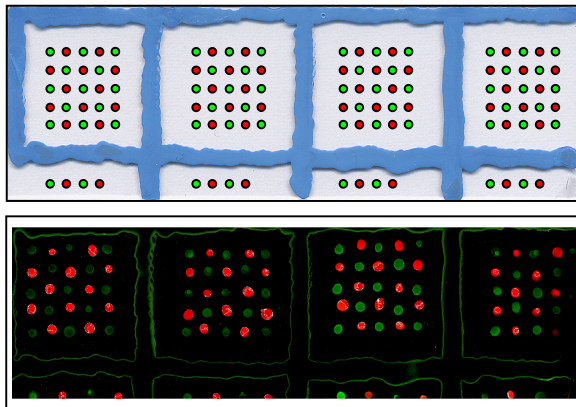


Abb. E46 Zu erwartendes (oben) und reelles Spotmuster (unten) nach Inkubation mit spezifischen Erst- und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern

(Alexa Fluor[®] 647) und anti-Maus-Zweitantikörpern (Alexa Fluor[®] 546) ebenfalls in TBS auf den Peptidträger einwirken. Da die beiden farbstoffmarkierten Zweitantikörper bei unterschiedlichen Wellenlängen mit einem Laser angeregt und detektiert werden können, läßt sich somit ein Schachbrettmuster aus roten und grünen Spots erzeugen. Abbildung E46 zeigt das zu erwartende (oben) und das tatsächliche, mit einem Fluoreszenzscanner aufgenommene Bild (unten). Ein grüner Spot repräsentiert nun das Epitop 5, erkannt vom Maus-anti-FLAG-Antikörper, der seinerseits wiederum spezifisch von dem

grün fluoreszierenden anti-Maus-Antikörper erkannt wird. Umgekehrt repräsentiert ein roter Spot Epitop 2, erkannt vom Kaninchen-anti-HA-Antikörper, der von dem rot fluoreszierenden anti-Kaninchen-Antikörper erkannt wird. Aufgrund der jeweils in Mischungen eingesetzten Antikörper-Lösungen konnte gezeigt werden, daß sowohl Erst- als auch Zweitantikörper zu keinen störenden Kreuzreaktionen neigen. Außerdem ist hervorzuheben, daß sämtliche Inkubationen mit Antikörpern ohne jegliche Blockieragenzien erfolgte. Das sehr gute Signal-Rausch-Verhältnis ist demzufolge auch auf die vorhandene Proteinresistenz zurückzuführen.

3.4.3 Vergleich mit kommerziell erhältlichen, aminotermi­nierten Glasobjektträgern

Nachdem die beiden Peptidepitope kovalent an SMCC-modifizierte Oberflächen gebunden und indirekt über fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper nachgewiesen werden konnten, war es interessant herauszufinden, inwieweit die entwickelten PEG-graftpolymerisierten Glasoberflächen sich mit anderen Oberflächensystemen hinsichtlich Signalintensität vergleichen lassen. Dazu wurden Aminopropylsilan-Objektträger (APS) von nuncTM (Katalog-Nr.: 231632), Nexterion[®] Slide A+ Träger von SCHOTT und eigene β -Alanin-terminierte, graftpolymerisierte Glasobjektträger zunächst mit SMCC in DMF umgesetzt. Anschließend wurden die beiden Cystein-terminierten Peptidepitope **YPYDVPDYA-C** und **DYKDDDDK-C** mit Hilfe eines Spotroboters abwechselnd in einem Zweilinien-Muster auf die verschiedenen

¹ Charakteristika solcher stripping-Puffer sind ein großer Überschuß an Harnstoff zur Proteindenaturierung und ein Detergenz wie beispielsweise SDS (Natriumdodecylsulfat) zum gründlichen Entfernen von Proteinen.

Träger aufgetragen. Die Konzentration der Peptidlösungen in Phosphatpuffer betrug dabei $1000 \mu\text{M}$ mit einem jeweiligen Spotvolumen von ca. $0,9 \text{ nL}$. Die beiden kommerziell erhältlichen Träger wurden entsprechend gängiger Protokolle mit 1 %iger BSA-Lösung in TBS für eine Stunde geblockt. Bei den PEG- β -Alanin-Träger fand dagegen kein Blockieren statt, da man hier durch die erwiesenen proteinresistenten Eigenschaften keine Adsorption von BSA erreichen würde. Sowohl die spezifischen Erst- als auch die fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper wurden als Gemisch aufgetragen. Nach der Aufnahme der Trägersorten im Fluoreszenzscanner unter Beibehaltung der Intensitäten sowie gleicher Werte für Helligkeit und Kontrast erhielt man folgende Bilder (Abb. E47):

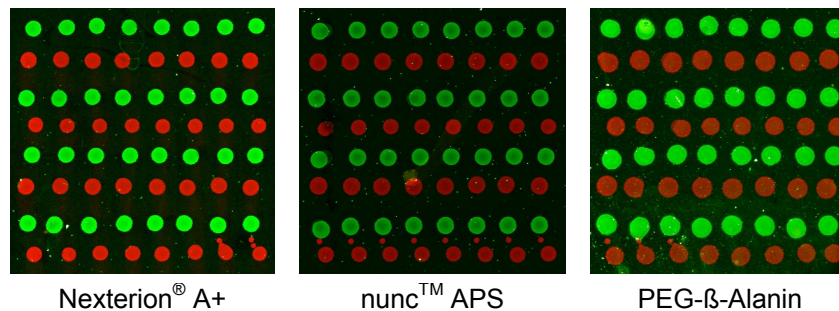


Abb. E47 Vergrößerte Fluoreszenzaufnahmen von Epitop-Spotmustern nach Inkubationen mit Erst- und Zweitantikörpern

Die drei gewählten Systeme lassen sich leicht voneinander unterscheiden. Die intensivsten Signale wurden mit dem Nexterion®-Träger erzielt (Abb. E47, links) und die schwächsten mit dem nunc™-Aminopropylsilan-Träger (Abb. E47, Mitte). Der selbst modifizierte Glasträger (Abb. E47, rechts) liegt mit seiner Signalintensität im Mittelfeld, obwohl hier kein zusätzlicher Blockingsschritt vor der Antikörper-Inkubation durchgeführt wurde. Die Gründe für die Unterschiede liegen zum einen in der unterschiedlichen Aminogruppendichte ($\text{APS} < \text{PEG-}\beta\text{-Alanin}$) und wahrscheinlich in den verwendeten Glassorten, da bei den Nexterion®-Gläsern nach eigenen Angaben besonders autofluoreszenzarmes Glas zum Einsatz kommt.

3.5 Herstellung und Charakterisierung der Aminosäure-Tonerpartikel

3.5.1 Vorbetrachtungen

Die Aminosäuretoner sollten in der Theorie neben den voraktivierten Aminosäuren eine Art „festes“ Lösungsmittel enthalten, welches bei einer Temperatur von ungefähr 70 °C schmilzt, aufgrund seiner hohen Polarität die Aminosäure dabei auflöst und deren Kopplung auf dem Träger ermöglicht. Es war naheliegend, dabei das höhere Homolog zum etablierten *N,N*-Dimethylformamid (DMF) das *N,N*-Diphenylformamid (DPF) zu verwenden, welches zwischen 69 – 71 °C schmilzt und die genannten Kriterien erfüllen würde. Die daraus hergestell-

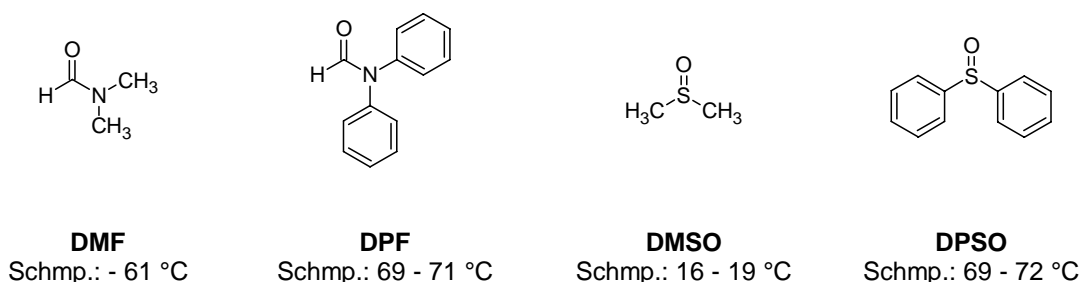


Abb. E48 Vergleich der Schmelzpunkte der *N,N*-disubstituierten Formamid-Derivate und der Sulfoxid-Derivate

ten Tonermikropartikel agglomerierten allerdings sehr stark, vermutlich durch die Aufnahme von Wasser. Vermindert werden konnte dies nach dem Ersatz des DPFs durch DPSO (Diphenylsulfoxid), welches einen nahezu identischen Schmelzbereich vorweist (Abb. E48).

Die beiden wichtigsten Synthesebestandteile, Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester und Diphenylsulfoxid, ersetzen als Einheit im herkömmlichen Toner die farbgebenden Substanzen. Das theoretische Kopplungsschema eines Aminosäure-Tonerpartikels ist in Abbildung E49 wiedergegeben. Der Aminosäuretoner wird auf bestimmte Bereiche des Syntheseträgers gedruckt (Spots) und anschließend bis zur Schmelztemperatur erhitzt. Dabei verflüssigt sich die vorher feste Matrix und gestattet der Aminosäure die Kopplung an den Träger. Nach einigen Wasch-, Capping- und Entschützungs-schritten wird der Träger getrocknet und die nächste Aminosäure

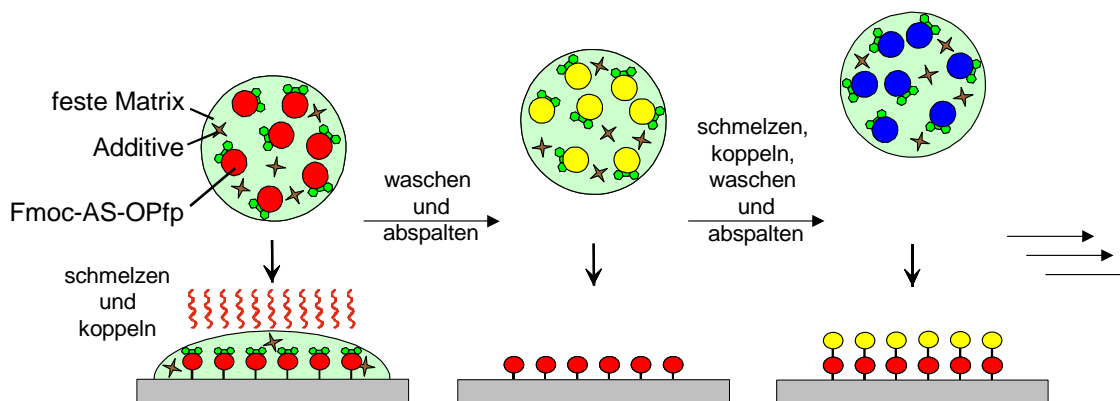


Abb. E49 Schema der einzelnen Schritte zum Koppeln von Aminosäure-Tonerpartikel auf einem aminoterminiertem Träger

kann aufgedruckt werden.

3.5.2 Herstellungsverfahren

Das übliche Verfahren zur Herstellung von Tonern, das Mischen und Kneten der einzelnen Komponenten bei einer Temperatur, bei der das Tonerharz eine hohe Viskosität aufweist, ist wegen der Temperatursensitivität der eingesetzten voraktivierten Fmoc-*L*-Aminosäure-OPfp-Ester ungeeignet. Auch andere Verfahren, wie z.B. die beiden Polymerisationstechniken (EA und MSP) scheiden aus, da angenommen werden muß, daß die reaktiven Aminosäuren unter diesen Bedingungen (wäßriges Medium, reaktive Monomere und Polymerisationsinitiatoren) abreagieren und später nicht mehr für eine Peptidsynthese zur Verfügung stehen würden. Es mußte daher ein Verfahren gefunden werden, bei dem die einzelnen Tonerbestandteile zu einer homogenen, festen Matrix miteinander vermischt werden können und diese Matrix anschließend in Mikropartikel zermahlen werden kann.

Gute Ergebnisse wurden erzielt, indem man die einzelnen Bestandteile

- Diphenylsulfoxid,
- Fmoc-*L*-Aminosäure-OPfp-Ester,
- Tonerharz (wie in den OKI-Tonern enthalten) und
- Ladungskontrollreagenz (z.B. Fe(III)- oder Al(III)-Komplex)

miteinander mischte und langsam unter Rühren erwärmte, bis sich eine homogene Schmelze gebildet hatte. Die zähe Masse wurde auf einer Unterlage aus Teflon ausgestrichen und abgekühlt. Die erstarrte Tonermatrix wurde zerkleinert und anschließend in einer Luftstrahlmühle (Abb. E50) zu Mikropartikeln zermahlen. Durch Sieben erhielt man die Fraktion mit der gewünschten Größenverteilung.



Abb. E50 Luftrahlmühle zur Generierung von Aminosäure-Tonerpartikeln

3.5.3 Bestimmung von Kopplungsfähigkeit, Größenverteilung und Ladungseigenschaften der einzelnen Aminosäure-Tonerpartikel

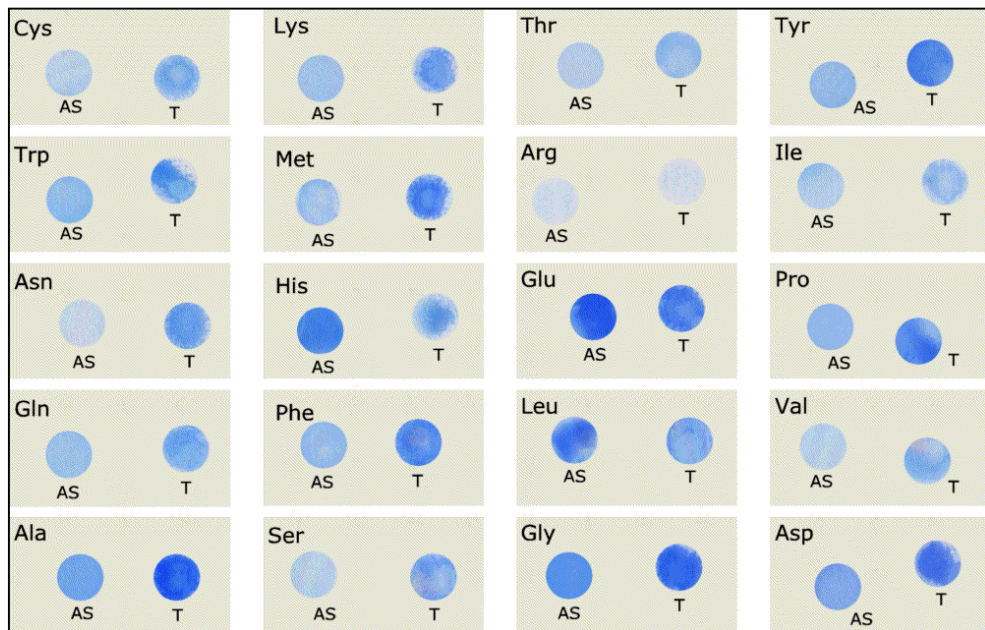


Abb. E51 Übersicht von gekoppelten, entschützten und mit Bromphenolblau angefärbten Mischungen aus Aminosäure-OPfp-Estern und DPSO („AS“) sowie AS-Tonermischungen („T“)

Abbildung E51 zeigt eine Übersicht von Aminosäure-Spots, die mit Bromphenolblau angefärbte Aminogruppen auf PEG- β -Alanin derivatisiertem Glas repräsentieren. Die mit „T“ bezeichneten Punkte symbolisieren die gekoppelten Aminosäuretoner im Vergleich zu einer Mischung der voraktivierten Aminosäuren in DPSO („AS“). Nach der gleichzeitigen Kopplung von Toner und Mischung bei 125 °C für 30 Minuten wurden die Träger gewaschen, die Fmoc-Gruppen abgespalten und die Träger anschließend mit Bromphenolblau angefärbt. Rein qualitativ läßt sich erkennen, daß **alle** Toner eine Kopplung der eingebetteten Aminosäure-OPfp-Ester an die Oberfläche erlauben, d.h. die in dem Toner enthaltenen Zusatzstoffe haben keinen nachteiligen Einfluß auf die Kopplung. Man erkennt zudem Unterschiede in der Farbstärke, die man auf natürliche Unterschiede in der Kopplungseffizienz der jeweiligen Aminosäure zurückführen könnte.

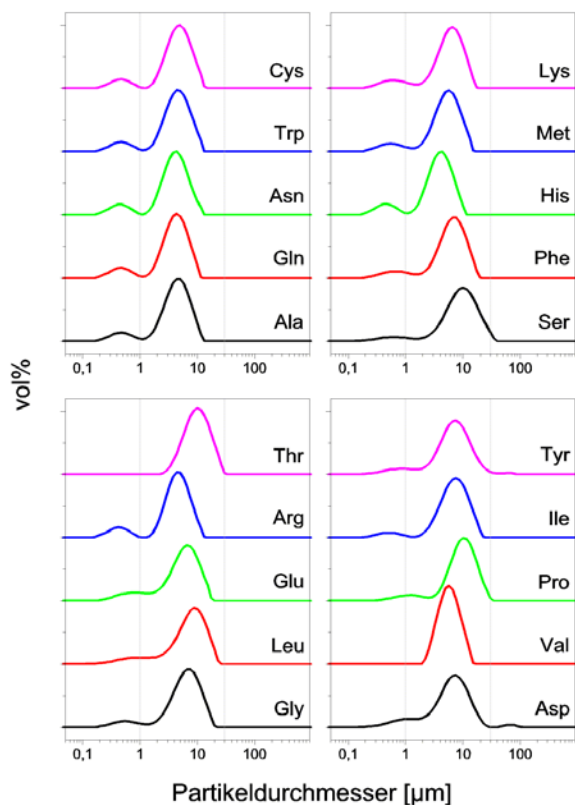


Abb. E52 Größenverteilung der 20 Aminosäuretoner

Andererseits besitzen die α -Aminogruppen der zwanzig Aminosäuren unterschiedliche Lewis-Basenstärken, was dazu führt, daß die Deprotonierung des Bromphenolblaus - als Voraussetzung für einen Farbumschlag von gelb nach blau - unterschiedlich gut abläuft.

Für ein optimales Druckergebnis mit dem OKI-Drucker ist es wichtig, daß die einzelnen Partikelkollektive die gleiche enge Größenverteilung im Bereich von etwa 9 μm wie im Referenz-Farbtoner (Abb. E53) aufweisen. Nach Mahlen der Partikelmatrix und Sieben der Mikropartikel wurden die zwanzig

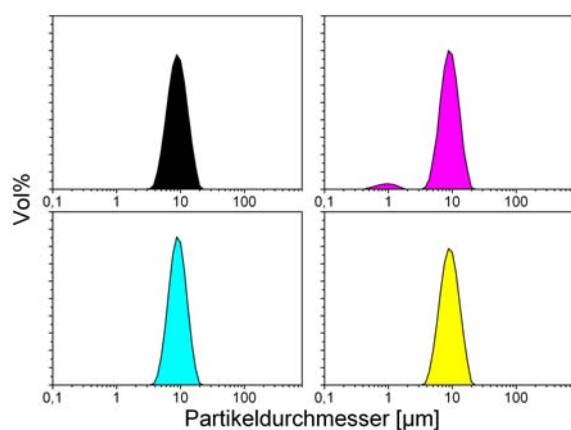


Abb. E53 Größenverteilung der vier OKI-Farbtoner

erzeugten Toner auf ihre Größe und insbesondere auf ihre Größenverteilung hin untersucht. Aus Abbildung E52 (vorherige Seite) ist ersichtlich, daß die erzeugten Toner einen mittleren Partikeldurchmesser von ca. 9 μm aufweisen und bis auf Valin (Val, rechts unten) jeweils einen geringen Staubanteil unterhalb 1 μm beinhalten, der sich nur durch eine aufwendige Sichtung unter Zuhilfenahme von Zentrifugalkräften abtrennen ließe und vorerst nicht entfernt wurde.

Zwei weitere wichtige Parameter sind Betrag und Vorzeichen der Ladung des Toners, die kurz vor dem Druckvorgang triboelektrisch erzeugt wird. Ausgedrückt wird dies durch das Ladungs-Masse-Verhältnis Q/m in [$\mu\text{C/g}$]. Dazu werden die verschiedenen Aminosäuretoner

abgewogen und die Ladung in der draw-off-Methode mit einem Q/m -Meter vermessen. Abbildung E54 zeigt die gemessenen Werte bezogen auf den Referenztoner von OKI, der ein Q/m -Verhältnis von $- (3,92 \pm 0,30) \mu\text{C/g}$ aufweist. Die hergestellten Aminosäuretoner besitzen alle jeweils eine negative Ladung und schwanken im Mittel in einem relativ engen Bereich von $-2,5 \mu\text{C/g}$ (Gly) bis $-5,3 \mu\text{C/g}$ (Thr).

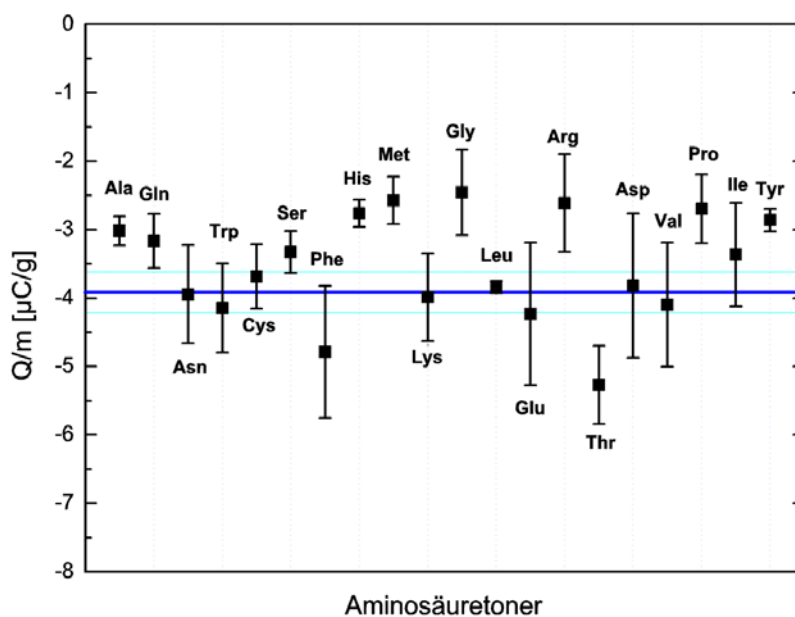


Abb. E54 Q/m -Verhältnisse der Aminosäuretoner im Vergleich zum Referenztoner von OKI (dunkelblaue Linie) und dessen absoluter Fehler (cyanfarbene Linie)

3.5.4 Synthese von Ladungskontrollreagenzien (CCA)

Durch die Orientierung der Entwicklung von Aminosäuretonern an den Vorgaben der Toner der Firma OKI müssen Ladungskontrollreagenzien verwendet werden, die eine negative Aufladung des fertigen Toners ermöglichen und die gleichzeitig keine reaktiven Gruppen tragen, mit denen die voraktivierten Aminosäure-OPf-Ester reagieren könnten. Da die verwendeten Farbtonerbestandteile oft einer gewissen Geheimhaltung seitens des Herstellers unterliegen, waren eigene Synthesen vonnöten. Ein Beispiel dazu ist der negativ geladene Eisen(III)-

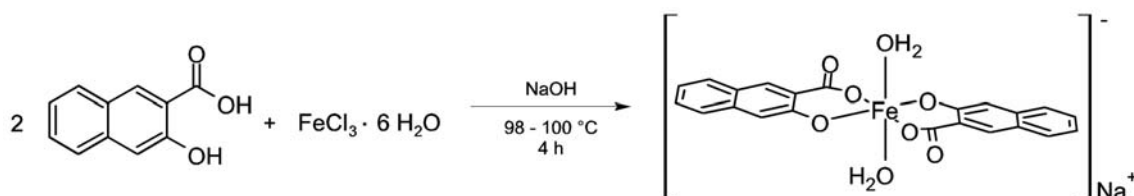


Abb. E55 Reaktionsschema der Synthese des Natrium-diaquobis(3-hydroxy-2-naphthoate)-ferrat(III)-Komplexes

Komplex, der sich aus der Reaktion von 3-Hydroxy-2-naphthonsäure mit Eisen(III)-chlorid Hexahydrat in Wasser erzeugen ließ (Abb. E55)⁸⁶. Man erhält ihn als ein feines, schwarzes Pulver in 75 %iger Ausbeute. Durch die Elektronenkonfiguration des Zentralatoms besitzt der Komplex paramagnetische Eigenschaften, was eine Analyse der Verbindung mittels NMR ausschließt. Die Identifikation erfolgte daher mit ESI-MS und IR-Spektroskopie. Die Substanz schmilzt bei ca. 186 °C, ist unlöslich in Wasser und mäßig löslich in DMSO, Methanol oder Ethanol. Seine wichtigste Eigenschaft ist allerdings die Fähigkeit, den Toner-mischungen die gewünschte negative Ladung bei triboelektrischer Aufladung zu verleihen. Ein weiteres mögliches Ladungskontrollreagenz stellt ein verlackter, sechsfach koordinierter Aluminium-Azokomplex dar (Abb. E56)⁸⁷, der über mehrere Reaktionsstufen (1. Diazotierung der Anthranilsäure; 2. Synthese des Liganden durch eine Azakupplung und

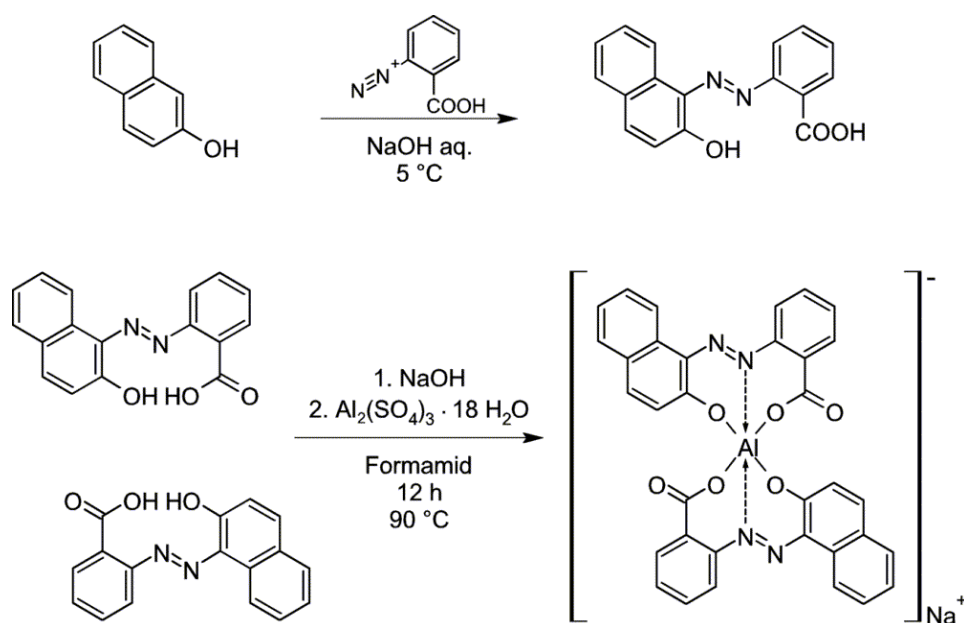


Abb. E56 Reaktionsschema der Synthese des Natrium-bis[2-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzoate]-aluminat(III)-Komplexes

3. Verlackung des Liganden mit einem Al(III)-Salz) zugänglich ist. Der Komplex ist als rotorangefarbenes, feinkristallines Pulver in 53 %iger Ausbeute erhältlich. Er verleiht in gleicher Weise wie der Eisen(III)-Komplex den Tonermischungen eine durch Reibung erzeugte negative Ladung. Aufgrund der aufwendigeren Synthese und der niedrigeren Ausbeuten beschränkte man sich allerdings auf den o.g. Eisen(III)-Komplex. Dieser ist zudem kostengünstiger herzustellen (Lösungsmittel, Edukte, etc.) und einfacher aufzuarbeiten.

3.6 Erzeugung eines 2-Peptid-Arrays im Schachbrettmuster mit dem Laserdrucker

3.6.1 Verwendung von Laserdruckerfolien als Aminosäuretoner-Transporter

Vor der endgültigen Verfügbarkeit des angesprochenen Peptidlaserdruckers wurden Schachbrettmuster aus den Peptidepitopen mit Folien nach der Tonertransfermethode erzeugt. Der Ablauf sah dabei wie folgt aus:

1. Herstellung der entsprechenden sechs Aminosäuretoner für die Epitope 2 und 5 (Ala, Asp, Lys, Pro, Tyr und Val),
2. Ausdruck einer Matrix mit dem jeweiligen Aminosäuretoner auf Laserdruckerfolien,
3. exakter Transfer der Matrix auf den modifizierten Glasträger,
4. Kopplung der voraktivierten Aminosäure an den Träger unter Andruck und Hitze,
5. Wasch- und Entschützungs Schritte, Wiederholung der Schritte 1. - 5. und
6. Inkubation mit spezifischen Erst- und farbstoffmarkierten Zweitantikörpern.

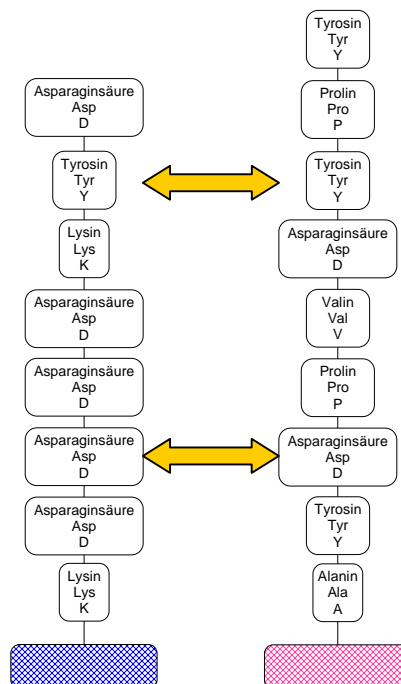


Abb. E57 Syntheschema der Peptidepitope **DYKDDDDK** (links) und **YPYDVPDYA** (rechts)

Bei Aminosäuren, die sich an derselben Position innerhalb der Peptidsequenzen befanden, griff man auf eine Synthese aus Lösung zurück (Asp an Position 3; Tyr an Position 7; Abb. E57).

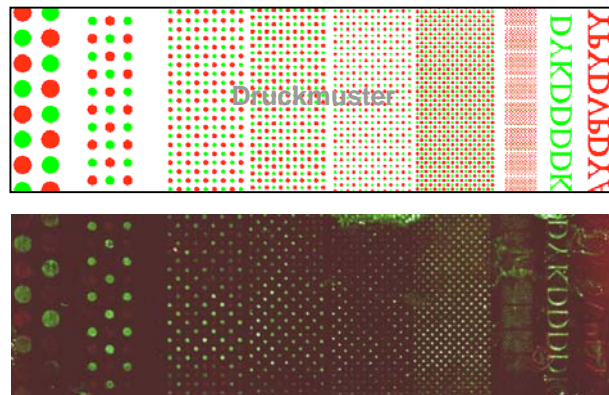


Abb. E58 Druckmuster (oben) und nach Inkubation mit spezifischem Erst- und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper erhaltenes Bild (unten)

Die in Abbildung E58 (unten) aufgenommene Fluoreszenzscanner-Aufnahme entspricht nahezu dem verwendeten Druckmuster. Auch die mitgedruckten Buchstaben repräsentieren Antikörper-erkannte Peptidepitope. Lediglich Epitop 2 (rot) erscheint schwächer. Bei dieser Sequenz waren bereits die Ausdrücke der entsprechenden Aminosäuretoner insgesamt schwächer im Vergleich zu Epitop 5. Wahrscheinlich ist bei der Synthese von Epitop 2 die Gesamtausbeute wegen der beiden Prolin-Bausteine niedriger und somit weniger Peptid vorhanden, das von dem Antikörper letztlich erkannt werden kann.

3.7 Peptidlaserdrucker-Prototyp auf Basis der OKI C7200er Serie

3.7.1 Aufbau

Der Peptidlaserdrucker wurde in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung (IPA) in Stuttgart entwickelt.⁸⁸ Einfach formuliert ist er eine Erweiterung eines kommerziell erhältlichen OKI-Vierfarb-LED-Druckers⁸⁹ (Anfang 2002: Modell C7200 [Abb. E59, links], mittlerweile C7350) um weitere 16 auf insgesamt 20 Druckwerke. Aufgrund der verwendeten LED-Technik und der eingesetzten

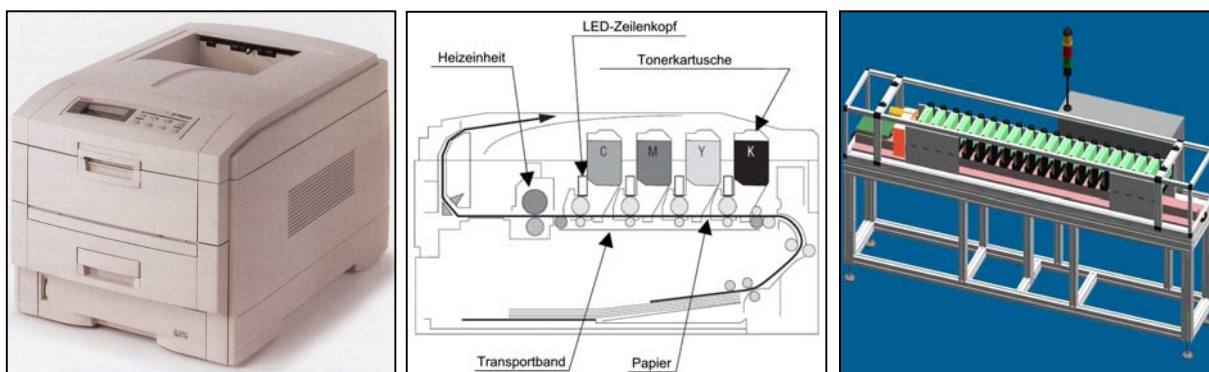


Abb. E59 OKI LED-Farbdrucker C7200 (links); Querschnitt durch den C7200 zur Verdeutlichung des Tandemdruckprinzips (Mitte); technische Skizze des Peptidlaserdruckers mit 20 Druckwerken (rechts)

Aminosäuretoner müßte man ihn daher „Aminosäure-LED-Drucker“ bezeichnen. Anschaulicher ist aber die Bezeichnung „Peptidlaserdrucker“, weil sie die zugrundeliegende Technik und die spezifische Anwendung zusammenfaßt. Ein Vorteil des in diesem Druckersystem verwendeten Tandemprinzips (Abb. E59, Mitte) ist die bereits beschriebene lineare Anordnung der einzelnen Druckwerke, die sich durch überschaubaren technischen Aufwand erweitern läßt. Zudem erlaubt die planare Führung des Druckmediums den Einsatz starrer Trägermaterialien wie z.B. Glas, wenn man auf die Umkehrwalzen vor und nach der Tonerkartuschen-Einheit verzichtet.

Der Peptidlaserdrucker ist in eine Rahmenkonstruktion aus Aluminium integriert und ist vor Licht durch verschiebbare Seiten- und Deckenwände geschützt (Abb. E60, links). Er besitzt einen Anschluß für Schutzgas, so daß der gesamte Druckprozeß in einer inerten Atmosphäre



Abb. E60 Peptidlaserdrucker mit Schaltschrank, Probenschlitten, Signalampel und Bedienpult (links); Blick entlang der Druckstraße mit ausgebauten Tonerkartuschen (Mitte); Probenschlitten mit bedrucktem Glasträger (rechts)

ablaufen kann. Der Schaltschrank zur Stromzufuhr und Druckersteuerung befindet sich an der Seite der Rahmenkonstruktion und trägt eine dreifarbige Signalampel, die Auskunft über den aktuellen Prozeßstatus gibt. Die Tonerkartuschen sind hintereinander angeordnet und werden mechanisch durch eine Königswelle parallel angetrieben. Das zu bedruckende Trägermaterial läßt sich durch Unterdruck auf einem Probenschlitten mit Linearantrieb mikrometergenau über Anschläge positionieren. Der Schlitten besitzt einen Hochspannungsanschluß (1 bis 10 kV) und bewegt sich präzise auf einer mittigen Stahlschiene (Abb. E60, Mitte) unter den einzelnen Kartuschen hinweg. Die Abweichung auf einer Länge von ca. 3 m beträgt dabei ca. 10 μm . Die Steuerung der LED-Zeilen der Druckwerke übernimmt ein sogenannter FPGA^m. Dieser ist notwendig, da durch die hohe Anzahl an ansteuerbaren LEDs pro Entwicklereinheit (ca. 10.000) große Datenmengen schnell verarbeitet und an die jeweilige, am Druckprozeß teilnehmende Tonerkartusche adressiert weitergeleitet werden müssen. Sonstige Steuerungsaufgaben, wie z.B. die Spannungsversorgung der Netzteile, für die Schalter zur Positionsüberwachung des Probenschlittens etc. werden von PLC-Baugruppenⁿ übernommen.

3.7.2 Leistungsfähigkeit

Momentan ist der Peptidlaserdrucker in der Lage, Punktraster in einer Auflösung von ca. 400 cm^{-2} zu drucken (Abb. E61, rechts). Die Punkte haben dabei einen Durchmesser von 250 μm und sind zu den benachbarten Punkten innerhalb einer Zeile 500 μm (Mittelpunkt zu Mittelpunkt) entfernt. Ein kompletter Druckvorgang dauert ca. 70 Sekunden. Momentan

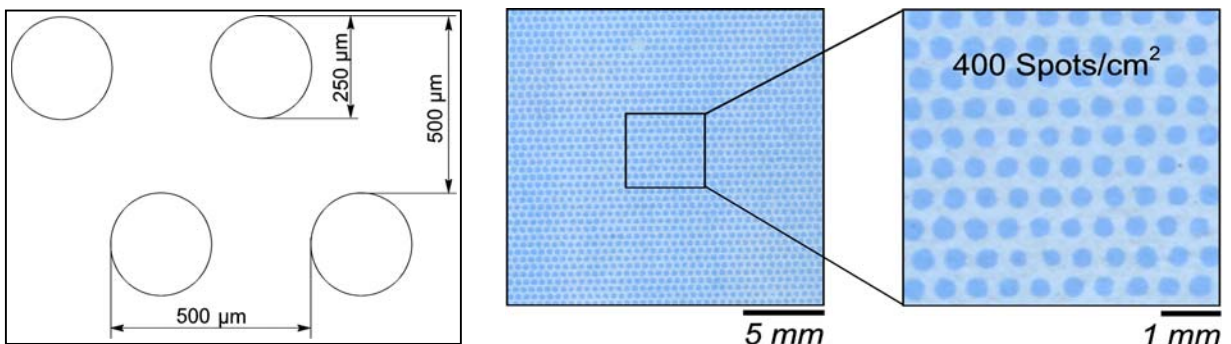


Abb. E61 Schematisches Druckmuster mit Durchmesser- und Abstandsmaßen (links); vergrößerte Ausschnitte aus einem mit Glycin-Toner bedruckten Glas nach Kopplung und Anfärben mit BPB (rechts)

laufen Optimierungsarbeiten dahingehend, daß bei jedem Druckdurchlauf ein exaktes Übereinanderdrucken gewährleistet werden kann. Dazu müssen die einzelnen Druckwerke aufeinander abgestimmt bzw. ausgerichtet werden und eventuelle Abweichungen mechanisch oder mit Hilfe der Steuerungssoftware ausgeglichen werden. Die angeführte Auflösung soll durch weitere Verkleinerung der Druckpunkte und durch Reduzierung ihrer Abstände zueinander erhöht werden. Erkennbare theoretische Grenzen bei dieser Verbesserung sind zum einen die Größe der Tonerpartikel, die Größe der LEDs bzw. der durch sie erzeugten Lichtpunkte und zum anderen die erzielbare mechanische Genauigkeit.

^m FPGA: field programmable gate array; ein frei programmierbarer Logikschaltkreis mit hoher Rechenkapazität; Die auszuführenden Operationen erfolgen parallel.

ⁿ PLC: programmable logic controller; eine speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) für Steuerungs- und Regelungsaufgaben in der Automatisierungstechnik

4. Zusammenfassung

4.1 Modifikationen von Glasoberflächen mit proteinresistenten Eigenschaften

Das Prinzip der UV-induzierten, radikalischen Graftpolymerisation von Poly(ethylenglykol)methacrylat (PEGMA_n; $n \sim 5$) zum Aufbau eines PEG-Polymerfilms konnte erfolgreich auf Glasoberflächen übertragen werden. Notwendig dafür war eine vorausgehende Silanisierung des Glases und dessen anschließende Ozonisierung, um oberflächengebundene, photosensible Gruppen als Radikalstarter zu erzeugen. Es wurden aus verschiedenen Silanisierungsmethoden und Lösungsmitteln diejenigen ausgewählt, die Monoschichten mit einer hohen Ordnung schaffen. Der Einfluß von Ozon auf die Filme von alkyl- (18-TCS) und

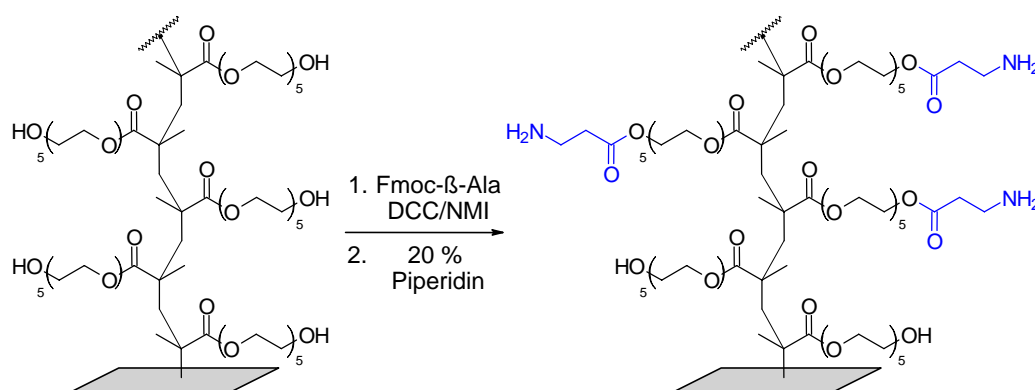


Abb. Z1 Veresterung endständiger OH-Gruppen eines graftedpolymerisierten PEG-Methacrylat-Films mit Fmoc-β-Alanin

alkenylsilanisierten (7-TCS) Gläsern wurde mittels XP-, IR-Spektroskopie und Kontaktwinkelmessungen verfolgt. Die dabei höchstmögliche Anzahl generierter Hydroperoxidgruppen auf der Oberfläche betrug $5,4 \text{ nmol/cm}^2$ und wurde iodometrisch bestimmt. Die Versuchsbedingungen der sich anschließenden Graftpolymerisation wurden durch Variation von Bestrahlungsdauer und Monomerkonzentration hinsichtlich maximaler Filmdicke (370 \AA) optimiert. Ebenso wurde die Anbindung von Fmoc-β-Alanin zur Einführung primärer Aminogruppen (Abb. Z1) mit der Maßgabe einer möglichst hohen Belegungsdichte verbessert. Die erzeugten Beschichtungen sind zudem stabil gegenüber 90 %iger TFA, wie XPS- und ellipsometrische Schichtdicken-Messungen belegen.

Die entwickelten Glasoberflächen verhindern darüber hinaus die unspezifische Adsorption von Proteinen (Lysozym, Fibrinogen, BSA und γ -Globulin), die zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in Konzentrationen von

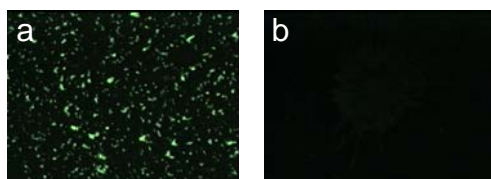


Abb. Z2 Glasträger unbehandelt (a) und PEG-gegraftet (b) nach der Inkubation mit FITC-markiertem Fibrinogen

2 mg/mL in PBS-Puffer mit den Glasträgern in Kontakt gebracht wurden. Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop zeigten keinerlei signifikante Adsorptionen (Abb. Z2). Zweifelsfrei bestätigt wurde dieser Befund mittels XP-Spektroskopie an den gleichen unmarkierten Proteinen.

4.2 Peptidsynthesen

Die so modifizierten Glasoberflächen erlauben Peptidsynthesen mit Fmoc-Aminosäure-OPfp-Estern aus Lösung (DMF) und mit Hilfe von Aminosäure-Tonerpartikeln in vergleichbarer Ausbeute und Qualität. Die Ausbeute der einzelnen Syntheseschritte der kurzen Beispielsequenzen **DTYRYIDYA**, **YPYDVPDYA** und **DYKDDDDK** an Rink-Linker modifizierten, PEG-gegrafteten Glasobjektträgern wurden über das Abspaltprodukt der Fmoc-Gruppe quantifiziert; die Peptide nach Abspaltung vom Träger mittels MALDI-TOF analysiert. Tabelle 24 zeigt eine Zusammenfassung der einzelnen Peptidsynthesen und die jeweiligen Reaktionsbedingungen. Die Synthesen aus Lösung funktionierten erwartungsgemäß bei allen Beispielsequenzen ohne Einschränkung. Bei der Synthese mit Aminosäuretonern konnte jedoch nicht unter jeder Reaktionsbedingung das gewünschte Peptid anschließend im Massenspektrum gefunden werden. Dennoch ist es bemerkenswert, daß unter diesen, für die Peptidsynthese ungewöhnlichen Bedingungen (Temperatur, Art des Mediums), Kopplungen von voraktivierten Aminosäuren als Bestandteil eines Laserdrucker-Tonerpartikels zu Oligopeptiden möglich sind.

Tab. 24 Übersicht über erfolgreiche Peptidsynthesen aus Lösungen in DMF und mit Aminosäuretonern

Peptidepitop	Sequenz	aus Lösung	aus AS-Toner
Epitop 1	DTYRYIDYA	☑	125 °C, 30 min ☑
Epitop 2	YPYDVPDYA	☑	150 °C, 10 min 90 °C, 90 min ☑
Epitop 5	DYKDDDDK	☑	90 °C, 90 min ☑

4.3 Antikörper-Bindungsstudien und Vergleich mit kommerziell erhältlichen Arraysystemen

Die beiden Cystein-terminierten Peptidepitope **YPYDVPDYA-C** und **DYKDDDDK-C** wurden über den bifunktionalen Linker SMCC an die oben beschriebenen, modifizierten und aminoterminierten Glasträger kovalent angebunden. Für die Kopplungseffizienz von SMCC an Aminogruppen in DMF konnte ein Wert von ca. 60 % ermittelt werden. Die Peptidepitope koppeln unterschiedlich gut an SMCC (**YPYDVPDYA**: ca. 50 %, **DYKDDDDK**: ca. 20 %). Die Erkennung der schachbrettartig angeordneten Peptidsequenzen erfolgte indirekt durch fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper. Eine Kreuzreaktion zwischen den beiden Erstantikörpern (anti-HA bzw. anti-FLAG) und den beiden Zweitantikörpern, erkennbar an einem gelben Fluoreszenzsignal durch Addition des roten und grünen Kanals im Fluoreszenzscanner, fand nicht statt. Die beiden Peptidepitope wurden zum Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenzsignale auch auf kommerziell erhältlichen aminoterminierten Glasoberflächen mit Hilfe eines Spotroboters aufgetragen und mit Erst- bzw. Zweitantikörpermischungen inkubiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar gut (Abb. Z3).

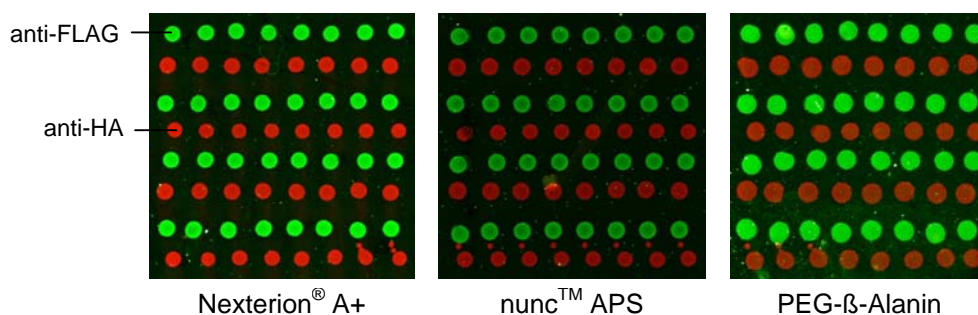


Abb. Z3 Vergrößerte Fluoreszenzaufnahmen von Epitop-Spotmustern nach Inkubationen mit Erst- und Zweitantikörpern

4.4 Aminosäure-Tonerpartikel, Peptidarray und Peptid-Laserdrucker

Es konnten mit allen zwanzig proteinogenen *L*-Aminosäuren aus dessen Fmoc- und Seitengruppen-geschützten OPfp-Estern Tonerpartikel unter Zusatz eines „festen“ Lösungsmittels und üblicher Tonerbestandteile (CCA, Harze) hergestellt werden. Die Toner stimmen in Größenverteilung [μm] und Ladungseigenschaften [$\mu\text{C/g}$] mit ihrem Vorbild, dem Farbtoner eines OKI-Vierfarb-Laserdruckers, gut bis sehr gut überein. Außerdem erlauben sie die Freisetzung der Aminosäure beim Schmelzen und deren Kopplung an den Träger (Abb. Z4).

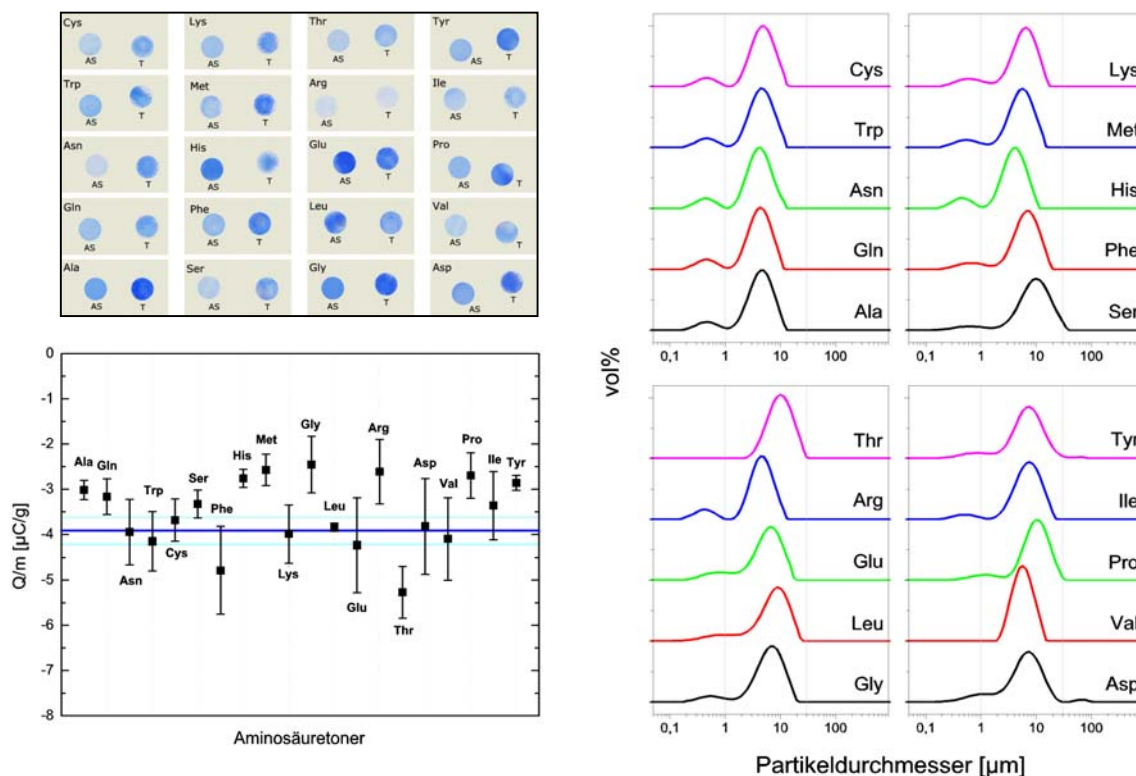


Abb. Z4 Übersicht über die Kopplungsfähigkeit der Aminosäuretoner (T) und AS-DPSO-Mischungen (AS) durch Anfärben entschützter Aminogruppen mit Bromphenolblau nach erfolgter Kopplung (links oben); Größenverteilung der zwanzig Aminosäure-Tonerpartikel (rechts); Q/m-Verhältnis der Aminosäuretoner mit dem Eisen(III)-Komplex als CCA in Relation zum OKI-Toner (links unten)

Für einen ersten Test einer orts aufgelösten Peptidsynthese mit Aminosäuretonern ohne den entwickelten Peptidlaserdrucker wurden Peptidepitope aus Tonerpartikeln aufgebaut, die vorher auf einer Laserdruckerfolie ausgedruckt und anschließend auf einen derivatisierten Glasträger positionsgenau transferiert wurden. Nach den Standardsynthese- und Entschützungs-schritten wurden die Peptidsequenzen indirekt nacheinander mit den spezifischen Erst- und den fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern inkubiert und nachgewiesen (Abb. Z5). Die beobachteten schwächeren Fluoreszenzsignale für Epitop **YPYDVPDYA** könnten synthesebedingt (geringere durchschnittliche Kopplungseffizienz) oder durch die Transfermethode verursacht worden sein (geringere Übertragungsmenge während des Transports des Druckmusters von der Folie auf den Glasträger).

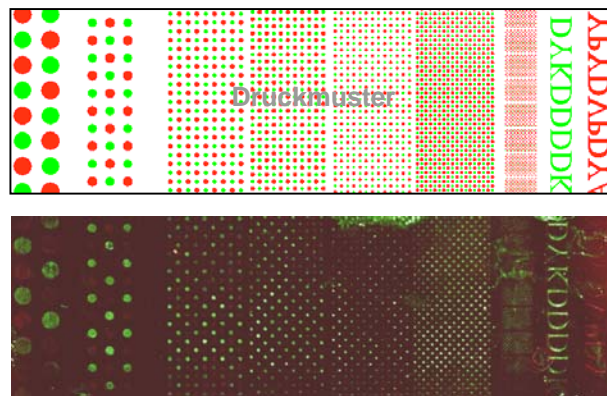


Abb. Z5 Druckmuster (oben) und nach Inkubation mit spezifischem Erst- und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper erhaltenes Bild (unten)

Der vom Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung (IPA) in Stuttgart entwickelte und gefertigte 20-Farben-LED-Drucker auf Basis der Vierfarb-LED-Drucktechnik von OKI besteht aus einer linearen Anordnung von zwanzig LED-Druckwerken, die über eine Königswelle gleichzeitig angetrieben werden, um ein gleichmäßiges Rotieren der Druck- und Transportwalzen innerhalb der Druckwerke sicherzustellen. Der zu bedruckende Träger wird auf einem Schlitten mit präzisiertem Linearvortrieb unter den Druckwerken hindurch bewegt und durchläuft die gesamte Druckstraße in weniger als 70 Sekunden. Es wird eine Auflösung von derzeit ca. 400 cm⁻² erreicht. Weitere Optimierungsarbeiten hinsichtlich Druckgenauigkeit und Auflösungssteigerung sind in Arbeit.

5. Ausblick

5.1 Erzeugen eines Peptidarrays mit dem Peptidlaserdrucker

Es existieren für alle zwanzig proteinogenen Aminosäuren kopplungsfähige Tonermischungen. Die Arbeiten zur Sicherstellung der Druckgenauigkeit sind in Kürze abgeschlossen. Für die ersten Versuchsdurchläufe wird das im Objektträgerformat bereits erfolgreich getestete Epitop-Schachbrettmuster aus den Peptidsequenzen **YPYDVPDYA** und **DYKDDDDK** durch **direkten** Druck der Aminosäuretoner auf derivatisiertem Glas wiederholt werden. Daran werden sich weitere kombinatorische Peptidsynthesen mit anderen Antikörper-Epitop-Paaren anschließen. Auf dem druckbaren Bereich, abzüglich einer vierseitigen Umrandung, ließen sich $394 \times 394 = 155.236$ Peptidspots generieren. Geplant sind darüber hinaus eine weitere Reduzierung der Spotdurchmesser und der Abstände zueinander, so daß eine Auflösungssteigerung möglich wird. Zudem sollen die zur Zeit noch per Hand durchgeführten Wasch- und Entschützungs-schritte automatisiert werden.

5.2 Hintergrund und Idee eines „Peptidchips“

Mit der Übertragung des Peptidarray-Konzeptes in die Größenordnung eines Halbleiter-Chips gelangt man zum ursprünglichen Begriff eines Biochips zurück. Das, was zum größeren Teil heute unter dem Begriff „Chips“ zusammengefaßt wird, bezeichnet eher Formate eines Objektträgers (2,6 x 7,6 cm), auf dem sich unterschiedlichste Moleküle gitterartig anordnen lassen. So entstehen auf diesen Trägern beispielsweise DNA-Chips durch kombinatorische Synthese von Nukleotid-Bausteinen, werden Proteine, DNA- bzw. RNA-Fragmente oder Antikörper auf Oberflächen immobilisiert und oftmals mit dem Begriff „Protein-“, „Gen-“ oder „Biochip“ tituliert. Gründe dafür mögen auch in der Übersetzung des englischen Ursprungswortes liegen. Konsequenterweise wurde dazu auch der Begriff des „Microarrays“ eingeführt, um der fortschreitenden Miniaturisierung Rechnung zu tragen. Genau an diesem Punkt setzt der Halbleiter-Peptidchip an. Er wäre in der Lage, auf seiner Oberfläche durch die Möglichkeit einer gezielten Ansteuerung seiner einzelnen Pixelbereiche kombinatorische Synthesen orts aufgelöst durchzuführen und gleichzeitig durch eine integrierte Sensorik die auftretenden Bindungsereignisse zu detektieren, quasi eine Synthese- und markierungsfreie Auslesemaschine in einem. Durch seine geringeren Ausmaße und seine dennoch hohe Dichte an Syntheseorten pro Flächeninhalt würde er das zu untersuchende Analysevolumen sehr gering halten.

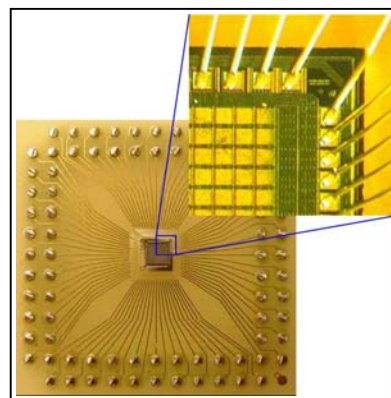


Abb. A1 CMOS-Chip, fixiert auf einer Platine und gebondet

5.2.1 Aufbau und Syntheseprinzip

Ein für die kombinatorische Peptidsynthese geeigneter Chip besteht aus einzelnen elektronisch ansteuerbaren Pixelfeldern, auf denen sich lokal begrenzte elektrische Ladungsfelder erzeugen lassen. Mit einem ebenso durch Reibung aufladbaren Aminosäuretoner ließen sich die jeweiligen Aminosäuren Pixel für Pixel ortsgenau über elektrostatische Wechselwirkungen ablagern. Hinzu kommt die Realisierung von Oberflächenmodifikation und –derivatisierung, damit ausreichend reaktive Gruppen für die Synthese zur Verfügung gestellt werden. Abbildung A1 zeigt einen solchen CMOS-Chip. CMOS bedeutet „Complementary Metal Oxide Semiconductor“, komplementärer Metalloxid-Halbleiter. Der CMOS ist ein Halbleiterelement, das aus zwei Metalloxid-Halbleiter-Feldeffekt-Transistoren (englisch: „Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor“, MOSFET) besteht, die auf einem einzigen Siliziumchip integriert sind. Der MOSFET wiederum wird als ein unipolarer Transistor bezeichnet, bei dem die Gateelektrode durch eine Metalloxidschicht (SiO_2) vom Halbleiterkristall (Si) getrennt ist. In der Vergrößerung deutlich zu erkennen sind die einzelnen Pixelfelder und die elektrischen Anschlüsse zum Erzeugen der gewünschten Ladungsmuster. Der hier gezeigte Typus besitzt Pixelflächen von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, was einer Elektrodendichte von $10\,000 \text{ pro cm}^2$ entspricht. Bei einer erfolgreichen kombinatorischen Synthese wäre man damit in der Lage, hochkomplexe Peptidarrays im Chipformat zu generieren. Das Syntheseprinzip mit elektrostatisch aufladbaren Aminosäuretonern gibt Abbildung A2 wieder. Im ersten Schritt werden ähnlich zum Xerographie-Verfahren elektrische Ladungsmuster (orange) auf den Pixeloberflächen erzeugt. Beim Kontakt mit gleichsinnig geladenen Partikeln erfolgt eine Ablagerung nur auf den ungeladenen Pixeln. Durch einen kurzen Heizimpuls werden die Partikel vorerst lediglich angeschmolzen und dabei fixiert. Erst nach erneutem Ladungsmusteraufbau, Ablagerung und Anschmelzen von Partikeln bis sämtliche Pixel belegt sind, erfolgt der eigentliche Reaktionsschritt durch längeres Erwärmen über die Schmelztemperatur der Partikelmatrix hinaus. Die vorher feste Matrixsubstanz verflüssigt

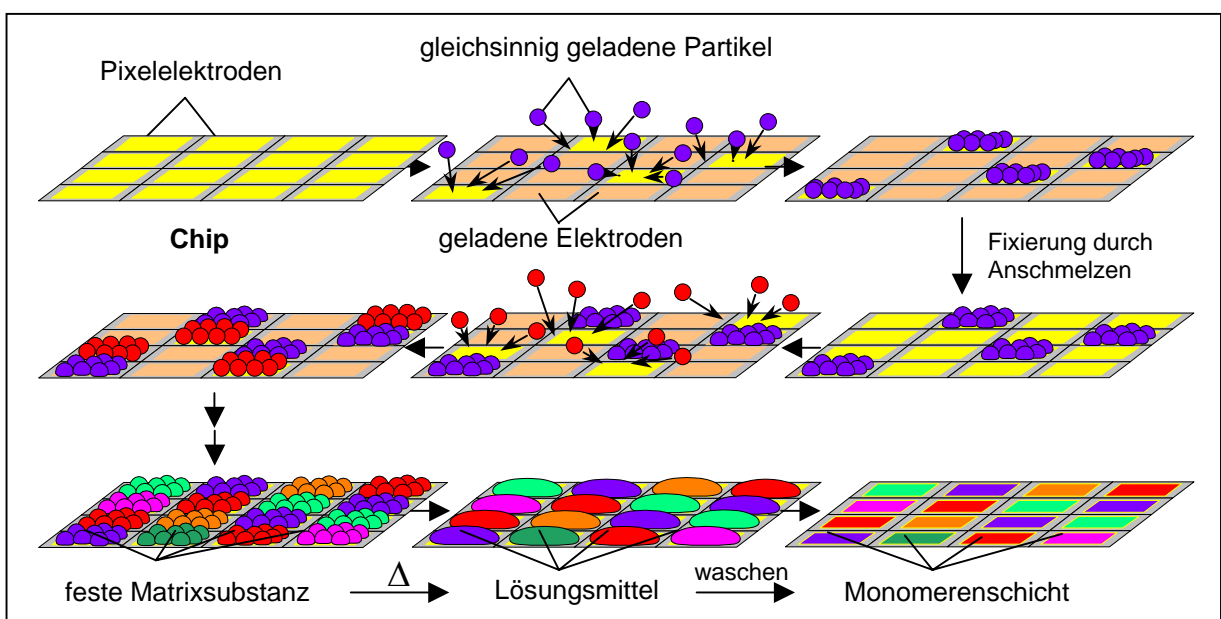


Abb. A2 Kombinatorisches Syntheseprinzip mit Aminosäure-Tonerpartikeln auf einem Chip

sich und übernimmt die Rolle des Reaktionsmediums. Dies ermöglicht die Kopplung der Monomerbausteine an die derivatisierte Oberfläche. Nach standardisierten Wasch- und Entschützungsritten ist die erste Monomerenschicht kovalent auf der Chipoberfläche gebunden und der Zyklus kann von neuem beginnen.

5.2.2 Erste Ergebnisse

Die prinzipielle Machbarkeit des Chipkonzepts zeigt Abbildung A3. Zu erkennen ist eine vergrößerte Darstellung eines CMOS-Chips mit $100 \times 100 \mu\text{m}$ großen Pixelelektroden, auf denen sich selektiv zwei herkömmliche Farbtöner abscheiden ließen. Die Abscheidung erfolgte in einer sogenannten Aerosolkammer (Abb. A4 links), in der durch Verwirbeln der einzelnen Partikelkollektive mit Druckluft und Reiben an der Kunststoffwand die gewünschte triboelektrische Ladung (siehe Laserdruckprozeß) des Partikelaerosols erzeugt wird. Die einzelnen Pixelfelder wurden in diesem Fall schachbrettartig nacheinander geschaltet und dabei elektrische Felder erzeugt, die zum selektiven Abscheiden der aufgeladenen Partikel führten.

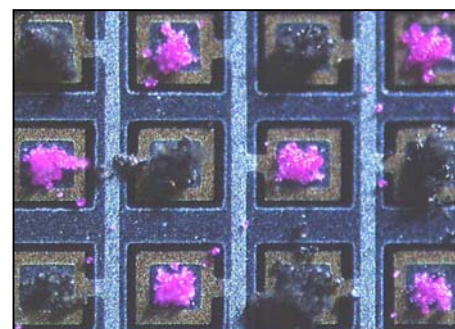


Abb. A3 Pixelelektroden nach selektiver Abscheidung zwei verschiedener Farbtöner (schwarz und magenta)

Der Versuch mit Aminosäure-Tonerpartikeln funktioniert ähnlich gut. Abbildung A4 (Mitte) zeigt einen Fmoc-Alanin-OPfp-Toner, der auf jedem zweiten Pixel abgelagert werden konnte. Nach Anschmelzen des Aminosäuretoners bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten sind gleichmäßige, transparente, isolierte Reaktionsräume entstanden (Abb. A4 rechts).⁹⁰

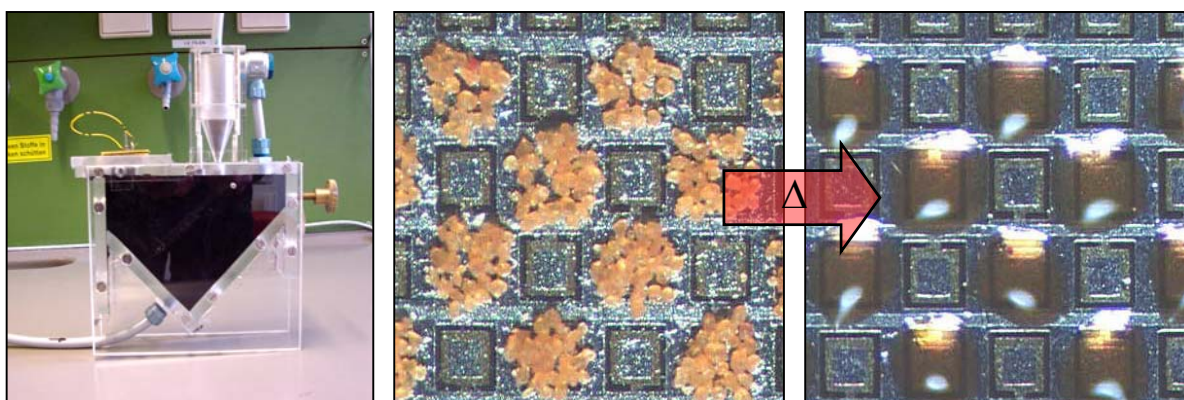


Abb. A4 Aerosolkammer mit Druckluftanschluß (links); Mikroskopiebilder von abgeschiedenem (Mitte) und danach angeschmolzenem AS-Toner (rechts)

Die Pixelfelder des gezeigten CMOS-Chips tragen eine dünne Aluminiumschicht, die sich genauso wie die bearbeiteten Silizium- bzw. Glasoberflächen derivatisieren und aminoterminieren lassen: die Grundvoraussetzung für die Peptidsynthese aus Partikeln. Das bereits getestete Epitopschachbrettmuster **YPYDVPDYA** und **DYKDDDDK** soll als nächstes auf dem Chip synthetisiert und vorerst ebenso über fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper sichtbar gemacht werden.

6. Materialien und Analytik

6.1 Materialien und Geräte

6.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Die Reagenzien zu Oberflächenmodifizierungen, Festphasensynthesen sowie Synthesen in flüssiger Phase wurden von folgenden Unternehmen bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt: Sigma-Aldrich Chemie (mit den Marken Sigma, Aldrich, Fluka bzw. Riedel-de Haën, Taufkirchen/Deutschland), Merck Biosciences (Novabiochem, Bad Soden/Deutschland), VWR International (Darmstadt/Deutschland), Bachem (Weil am Rhein/Deutschland)

Die voraktivierten Fmoc-*L*-Aminosäure-pentafluorphenylester (Fmoc-AS-OPfp) von Histidin, Threonin und Serin wurden von Fluka (Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland), die restlichen 17 der 20 proteinogenen OPfp-*L*-Aminosäureester von Novabiochem (Merck Biosciences, Bad Soden/Deutschland) erworben.

Für Cellulosemembranen wurde das Gel Blotting Papier GB002 (Dicke: 0,4 mm) von Schleicher & Schüll Bioscience (Dassel/Deutschland) verwendet. Die Laserdruckerfolien aus PET (AF4300) stammten von 3M (Neuss/Deutschland), die Glasobjektträger (76 x 26 mm, geputzt) von R. Langenbrinck (Emmendingen/Deutschland).

Alle verwendeten Lösungsmittel bzw. flüssigen Reagenzien wurden ohne weitere Aufreinigung in der angegebenen Qualitätsstufe verwendet:

Essigsäureanhydrid (99+%), Cyclohexan (p.a.) jeweils von Acros Organics, Geel/Belgien; Piperidin (99 %, Aldrich); Schwefelsäure (p.a., konz., AppliChem/Darmstadt); Dichlormethan (analytical reagent grade, Fisher Scientific/Schwerte); Bicyclohexyl (puriss.), *N,N*-Diisopropyl-diethylamin (purum), Ethanol (p.a.), Methanol (p.a.) jeweils von Fluka; Wasserstoffperoxid (30%, p.a.), Chloroform (p.a.) jeweils von J. T. Baker, Deventer/Niederlande; *n*-Hexan (p.a., Riedel-de Haën); *N*-Methylimidazol (99 %, Sigma). Das für Aminosäurekopplungen aus Lösung verwendete *N,N*-Dimethylformamid (peptide grade, biosolve, Valkenswaard/Niederlande) wurde über Molekularsieb 4 Å, die Lösungsmittel Benzol und Isopropanol über Molsieb 4 Å bzw. 3 Å (jeweils von Carl Roth/Karlsruhe) getrocknet.

Die zur Verifizierung der Proteinresistenz eingesetzten Proteine Rinderserumalbumin (BSA, Cohn-Fraktion V, $\geq 96\%$), Fibrinogen (aus Humanplasma; gerinnungsfähiges Protein: $\sim 95\%$), γ -Globulin (aus Humanblut, 99 %) und Lysozym (aus Hühnereiweiß, lyophilisiert, $\sim 95\%$) stammten von Sigma-Aldrich/Taufkirchen).

6.1.2 Antikörper

Die jeweiligen Antikörper wurden als Lösungen bestellt und nach Aliquotierung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unverdünnt aufbewahrt. Kurz vor jeder Anwendung wurden diese aufgetaut und in einem bestimmten Verhältnis mit Pufferlösung verdünnt.

Name	bestellt bei
anti-HA antibody, affinity isolated, 0.8 mg/mL, host: rabbit	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
anti-FLAG [®] M5 monoclonal antibody, purified, host: mouse	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
anti-HA.11 monoclonal antibody, purified, host: mouse	Covance, Berkeley, California, USA
Peroxidase-konjugierter goat anti-mouse AK IgG + IgM (H+L); AffiniPure	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Crove, Pennsylvania, USA
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/mL	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Alexa Fluor [®] 546 goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/mL	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Alexa Fluor [®] 647 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2 mg/mL	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Für den Antikörpernachweis mittels Chemilumineszenz wurde das *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*-Kit von Perbio Science/Bonn in Kombination mit einem Kodak Biomax XAR Film von Sigma verwendet.

6.1.2 Geräte

Oberflächenmodifikation

Zur Erzeugung von Ozon diente ein Ozonisator *LAB2B* der Marke Triogen und wurde bezogen von der WS Industrievertretung und Technischer Fachhandel/Bonn. Sauerstoff wurde in der Qualitätsstufe „medizinischer Sauerstoff“ aus Druckgasflaschen benutzt.

Für die Graftpolymerisation unter UV-Licht verwendete man einen Quecksilber-Mitteldruck-Strahler (150 W) von UV-Consulting Peschl/Mainz mit dem passenden Spannungsgerät *TQ 150* (Heraeus Noblelight GmbH/Hanau). Emissionsspektrum des Strahlers in Abb. M1)

Die Bestrahlung der Proben geschah in einer Stickstoffatmosphäre, um störende Nebenreaktionen durch etwa sich bildendes Ozon zu vermeiden. Daher fanden die Bestrahlungsversuche in einer Edelstahlwanne statt, die mit einer Quarzglasplatte zum Lichtdurchlaß verschlossen wurde und Gasanschlüsse zum Einlaß des Schutzgases aufwies.

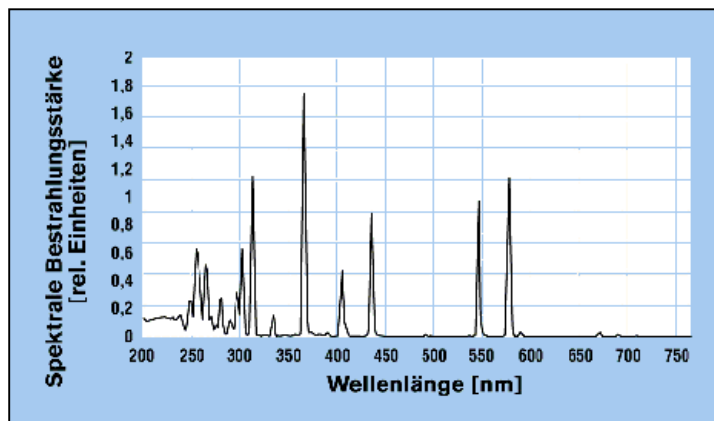


Abb. M1 Emissionsspektrum des Hg-Strahlers (Quelle: Heraeus Noblelight GmbH)

Säulen zur Proteinaufreinigung nach Markierung mit FITC

Zur Anwendung kamen *NAPTM-25* Einwegsäulen, die bereits mit *SephadexTM G-25* (DNA grade) vorgepackt waren (Amersham Biosciences Europe GmbH/Freiburg). Das Säulenmaterial ist ein Polydextran mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa.

Peptidsynthese

Die Peptidepitope zur Immobilisierung an SMCC-terminierte Oberflächen wurden in der Peptidsyntheseinheit von Dr. Rüdiger Pipkorn am DKFZ an fester Phase synthetisiert, gereinigt und mittels MALDI-TOF charakterisiert.

Tonerherstellung

Zum Mahlen der Tonermatrizes verwendete man die Luftstrahlmühle *100 AS* der Firma Hosokawa/Augsburg. Die dafür notwendige Druckluft wurde mit der Adsorptionstrocknungsanlage *DACZ 9* von Boge/Bielefeld und dem Kompressor *EPC 440-100* von Kaeser Kompressoren GmbH/Coburg bereitgestellt. Zum Sieben stand eine *AS 200 digit* der Firma Retsch GmbH/Haan zur Verfügung.

Spotroboter

Zum Spotten der Cystein-terminierten Peptidepitope wurde ein *BioChip Arrayer* von der Firma PerkinElmer LAS GmbH/Rodgau, vormals Packard Biochip Technologies, verwendet.

6.2 Analytik

XPS

Die XP-Spektren wurden an einem *MAX-200*-Spektrometer der Firma Leybold-Heraeus GmbH/Hanau (seit 1987: Leybold AG) aufgenommen. Als nicht-monochromatische Röntgenquelle diente eine Aluminiumanode mit einer Energie der $K\alpha_{1,2}$ -Linie von 1486,6 eV. Zur Detektion der Elektronen wurde ein Energieanalysator EA 200 verwendet. Die experimentelle

Auflösung der Anlage betrug 0,9 eV.⁹¹ Als Meßparameter wurden folgende Werte eingestellt (Tab. 25):

Tab. 25 Meßparameter für 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

Zur Kontrolle von Signalintensität und Probenposition wurde zunächst ein Übersichtsspektrum gemessen. Anschließend wurden die Detailspektren zur qualitativen und quantitativen Analyse aufgenommen. Aufgrund von auftretenden Aufladungseffekten wurden die Spektren auf den C1s-Peak mit 284,6 eV kalibriert. Die Spektren wurden zudem vor einer Analyse durch eine apparatespezifische Transmissionsfunktion normiert, da die Nachweisempfindlichkeit des Analysators vom jeweiligen Energiebereich abhängig ist. Die quantitative Analyse wurde mit dem Programmpaket *Microcal Origin, Version 3.78* der Firma Microcal Software, Inc. (Northhampton/USA) durchgeführt.

Vor einer qualitativen Analyse der Meßdaten ist es notwendig, aufgrund der inelastisch gestreuten Sekundärelektronen eine Untergrundkorrektur vorzunehmen. Beim sogenannten SHIRLEY-Abzug⁹² wird eine Unstetigkeit an der Stelle des Peakmaximums berücksichtigt, indem der inelastische Untergrund einer heavyside-Stufenfunktion folgt und proportional zur Peakintensität ist. Dazu werden ähnlich einem linearen Untergrundabzug links und rechts des Signals Fixpunkte festgelegt und das Gesamtintegral so berechnet, daß die Halbintegrale links und rechts der Unstetigkeit gleich groß sind.

Zur Bestimmung von Stöchiometrieverhältnissen N_A/N_B zwischen detektierten Elementen A und B wurde das statistische Modell angewendet:

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

I_A und I_B : Intensitäten der Elementsignale

σ_A und σ_B : elementspezifische Wirkungsquerschnitte

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

Die Intensitäten I_X wurden durch Anpassung von Voigt-Profilen an die jeweiligen Signale und durch Integration der Einzelpeaks erhalten. Wirkungsquerschnitte σ_X (normiert auf $\sigma_{C1s} = 1$) und Abschwächungslängen λ_X wurden der Literatur entnommen⁹³ und lauten wie folgt (Tab. 26):

Tab. 26 Verwendete Wirkungsquerschnitte σ_x und Abschwächungslängen λ_x

Orbital	σ [w.E.]	λ [Å]
C1s	1,00	24,0
O1s	3,08	20,3
N1s	1,84	21,5
Si2p	0,82	35,2

FT-IRRAS (Fourier-transformierte Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie)

IRRA-Spektren wurden mit einem Spektrometer von Bio-Rad Laboratories/München, Modell *FTS 175c*, aufgenommen. Das Gerät wird mit getrockneter Luft gespült und ist ausgestattet mit einem Flüssigstickstoff-gekühlten Hg-Cd-Te-Detektor (MCT-Detektor). Die Spektren wurden nach ca. 1500 Scans mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen.

Ellipsometrie

Zur Bestimmung der Dicke des Graftpolymerfilms auf Siliziumoberflächen diente ein Ellipsometer, Typ *M-44*, von J. A. Woollam Co. Inc. (Lincoln/Nebraska). Alle Messungen wurden bei einem eingestellten Winkel von 75° durchgeführt. Die Filmdicke wurde unter Verwendung der Software *WVase32TM* und des CAUCHY⁹⁴-Modells bestimmt.

Kontaktwinkel

Die Kontaktwinkel wurden mit einem Goniometer *G1* von der Firma Krüss GmbH/Hamburg unter Verwendung der Methode des liegenden Tropfens („sessile drop method“) bestimmt. Nach dem Anlegen einer Tangente an den Flüssigkeitstropfen wird die Tangente zum Mittelpunkt parallel verschoben und der entsprechende Winkel von der Skala abgelesen. Die Messung erfolgte dabei dynamisch durch Aufnahme der Vorrückwinkel unter stetiger Dosierung des Wassertropfens mit einer Kanüle. Es wurden je Probe sechs Werte bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet.

Massenspektrometrie

Zur Massenbestimmung der synthetisierten Peptide auf modifizierten Glasoberflächen wurde ein MALDI-Flugzeitmassenspektrometer des Typs *Reflex II* (Bruker-Daltonik/Bremen) benutzt. Das Gerät war mit einer SCOUT-Ionenquelle, einem 337 nm Stickstoff-Laser und einem Ionenreflektor ausgestattet und verfügte über eine verzögerte Ionenextraktion (delayed extraction).

Die Analysen der synthetisierten Ladungskontrollreagenzien wurden in der Massenspektrometrie-Abteilung des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg durchgeführt. Zum Einsatz kam dabei ein *Finnigan TSQ-700* von Thermo Electron/Bremen.

NMR

Die NMR-Spektren wurden mit einem *DRX-301*-Spektrometer von Bruker BioSpin GmbH/Rheinstetten bei 300 MHz (^1H) bzw. 75 MHz (^{13}C) aufgenommen. Als Referenz dienten die Restprotonen des verwendeten deuterierten Lösungsmittels. Die chemischen Verschiebungen δ sind alle in [ppm], die *H,H*-Kopplungskonstanten J in [Hz] angegeben.

Verwendete Abkürzungen: s (Singulett), br-s (breites Singulett), d (Dublett), dd (Doppeldublett), t (Triplet), m (Multiplett).

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren der Reinsubstanzen wurden als KBr-Preßling an einem FT-IR-Spektrometer *IFS-66* von Bruker aufgenommen. Die Lage der Banden wird in Wellenzahlen ν in $[\text{cm}^{-1}]$ angegeben. Bandenintensitäten werden wie folgt abgekürzt: s (stark), m (mittel), w (schwach), br (breit).

UV-Spektroskopie

Für UV-spektroskopische Untersuchungen wurden die chemikalienbeständigen UV-Einmal-küvetten aus Kunststoff (220 bis 900 nm) von neoLab/Heidelberg mit einem *SmartSpec Plus* Spektrophotometer von Bio-Rad Laboratories/München benutzt.

Fluoreszenzmikroskopie

Für die Aufnahme der adsorbierten, FITC-markierten Proteine auf Glaträgern kam eine *Pix-Cell II LCM* System von Arcturus/Mountain View, USA an einem Olympus *M081* Mikroskop zum Einsatz. Verwendet wurde das Objektiv mit einer 4-fachen Vergrößerung. Die Bilder wurden mit einer Hitachi-Digitalkamera aufgenommen und 50-fach nachvergrößert.

Fluoreszenzscanner

Die mit farbstoffmarkierten Antikörpern versehenen Glasobjektträger wurden mit einem *GenePix[®] 4000B* Fluoreszenzscanner bei einer Laseranregung mit 632 nm (rot) bzw. 532 nm (grün) ausgelesen - zur Darstellung der Bilder diente die Software *GenePix[®] Pro* (beides von Axon Instruments bzw. Molecular Devices/Union City, USA).

Partikelgrößen-Meßgerät

Zur Bestimmung der Größenverteilung der Mikropartikel kam ein *Mastersizer 2000* der Firma Malvern Instruments GmbH/Herrenberg zum Einsatz.

DSC (Differential Scanning Calorimetry)

Zur Bestimmung der Phasen- bzw. Glasübergangstemperaturen während des Schmelzprozesses der Aminosäure-Tonpartikel wurde ein *DSC 204 F1 Phoenix[®]* von der Firma Netzsch Gerätebau GmbH/Selb verwendet.

Q/m-Meter

Mit dem Modell *210HS-2B Q/m Analyzer* der Firma TREK Inc./Medina, USA wurden die Ladungs-Masse-Verhältnisse der Tonermischungen in der „draw-off“-Methode bestimmt.

7. Durchführung

7.1 Oberflächenmodifikationen

7.1.1 Modifizierung von Cellulosemembranen⁹⁵

Die Cellulose im Format 21 x 29 cm wird in ca. 30 mL DMF für 10 Minuten in einer Instrumentenschale aus Melamin vorinkubiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird die noch feuchte Membran in folgende Lösung für drei Stunden eingelegt: 1,25 g Fmoc- β -Alanin (4,0 mmol), 748 μ L DIC (4,8 mmol) und 632 μ L NMI (8,0 mmol). Das Gefäß bleibt dabei verschlossen. Anschließend wird die Lösung dekantiert und die Membran dreimal mit je 50 mL DMF für jeweils fünf Minuten gewaschen. An dieser Stelle ist es möglich, Proben zu entnehmen, um später den Derivatisierungsgrad zu bestimmen (siehe 7.1.1.1). Man versetzt die Cellulose mit 50 mL einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF für 20 Minuten. Die Membran wird dann nacheinander mit DMF (5 x 50 mL, 5 min) und MeOH (3 x 50 mL, 5 min) gewaschen. Nach Trocknung an der Luft ist die derivatisierte Cellulose einsatzbereit. Für eine längere Lagerung kann sie lichtgeschützt und luftdicht verpackt bei 0 °C mehrere Monate gelagert werden.

7.1.1.1 Bestimmung des Derivatisierungsgrades

Nach erfolgter Ankopplung von Fmoc- β -Alanin und Waschen mit DMF werden aus der getrockneten Cellulosemembran Spots definierter Größe herausgestanzt. Der mittlere Flächeninhalt der Membranspots beträgt dabei $(0,23 \pm 0,02)$ cm². Die Membranproben werden mit je 1 mL 20 %igem Piperidin in DMF versetzt, 20 Minuten geschüttelt und die erhaltenen Lösungen gegen die Stammlösung bei $\lambda = 301$ nm UV-spektroskopisch vermessen. Aus der gemessenen Extinktion E , der konstanten Schichtdicke $d = 1$ cm und dem molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 5129$ ⁹⁶ L/mol errechnet sich der Derivatisierungsgrad DG nach⁹⁷:

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

ε : Extinktionskoeffizient [L/mol]

E : Extinktion bei $\lambda = 301$ nm

V : Volumen [mL] der Abspalllösung

A : Flächeninhalt des Cellulosespots [cm²]

7.1.2 Modifizierung von Laserdruckerfolien aus Polyethylenterephthalat (PET)

7.1.2.1 Peroxidierung mit Wasserstoffperoxid und UV-Licht

Die Folien werden in Stücke zu je 2 x 1 cm geteilt und die obere rechte Ecke entfernt, um die Oberseite der Folie zu markieren. Sie werden nacheinander zweimal mit DMF und einmal mit Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet. Um während der Bestrahlung den Auftrieb der Folienstücke durch Bläschenbildung zu verhindern, werden die Folien mit der Unterseite an den Boden einer Glasschale geklebt (Klebestift). Es wird soviel 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben, bis der Flüssigkeitspegel über der Folie ungefähr 1 cm beträgt. Die UV-Lampe wird im Abstand von 10 cm zu den Folien positioniert und für eine bestimmte Zeit eingeschaltet. Die Lösung erwärmt sich dabei auf ca. 45 °C und es bilden sich vermehrt kleine Luftbläschen. Eventuell vom Boden abgelöste Folien färben sich dabei stärker gelb. Die bestrahlten Proben werden vom Boden gelöst, nacheinander je zweimal mit DMF und H₂O gewaschen, um restlichen Klebstoff zu entfernen und im Hochvakuum über Nacht getrocknet.

7.1.2.2 UV-induzierte Graftpolymerisation

Die getrockneten und peroxidierten PET-Folien werden mit der derivatisierten Seite nach oben in eine Lösung von 5 v% PEGMA₅ und 2 mM Mohrsches Salz ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6 H₂O) in destilliertem Wasser in einer Quarzglasschale eingelegt. Stickstoff wird mit Hilfe einer dünnen Glaskapillare durch die Lösung hindurch für ca. 30 Sekunden eingeleitet und in die Schale anschließend mit einem Quarzglasdeckel und Parafilm verschlossen. Im Abstand von 10 cm zu den Folien wird die UV-Lampe für eine bestimmte Zeit eingeschaltet. Die Folien bleiben während der gesamten Bestrahlung auf dem Schalenboden liegen. In der Lösung bilden sich gelbfarbene, niederschlagartige Schlieren aus. Die Folien werden gründlich mit Wasser gespült und in 70 °C heißem Wasser für 48 Stunden gerührt. Nach Abspülen mit Wasser werden die Proben im Hochvakuum über Nacht getrocknet. Nach dieser Prozedur weisen die beschichteten PET-Folien im Vergleich zum Ausgangsmaterial eine geringere mechanische Stabilität auf und besitzen eine schwach gelbe Färbung.

7.1.2.3 Einführung der Aminoterminierung mit Fmoc-β-Alanin

Die PEG-gegrafteten Folien werden für 10 Minuten in DMF gelegt. Man mischt unter Rühren 1,56 g Fmoc-β-Alanin (0,1 M) und 929 µL DIC (0,12 M) in 50 mL trockenem DMF und läßt 5 Minuten stehen. Das DMF wird von den Folien mit Stickstoff abgepustet. Zur angesetzten Lösung werden nun 793 µL NMI (0,24 M) zugetropft und die erhaltene Mischung zu den Folien gegeben. Man läßt drei Stunden stehen. Die Lösung wird abgetrennt und die Folien werden mit DMF gewaschen (5 x 3 min). Anschließend gibt man eine Lösung von 20 % Piperidin in DMF zu, inkubiert 20 Minuten und wäscht anschließend nacheinander mit DMF (5 x 5 min) und MeOH (2 x 3 min). Die Folien werden an Luft getrocknet.

7.1.2.4 Aufdrucken des Aminosäuretoners

Die derivatisierte Folie wird mittels Klebestift auf ein herkömmliches Blatt Papier der Größe DIN A4 geklebt und im Laserdrucker mit einem Fmoc-*L*-Asparaginsäure-OPfp-Toner bedruckt. Man läßt eine Stunde reagieren und wäscht anschließend in DMF (5 x 5 min). Danach gibt man eine Lösung von 20 % Piperidin in DMF zu, inkubiert 20 Minuten und wäscht anschließend nacheinander mit DMF (5 x 5 min) und MeOH (2 x 3 min). Die freien Aminogruppen werden mit einer 0,01 %igen Lösung von Bromphenolblau in MeOH innerhalb von 15 Minuten angefärbt. Man spült einmal mit MeOH nach und trocknet an der Luft.

7.1.3 Modifizierung von Glasobjektträgern

7.1.3.1 Silanisierung

Glasobjektträger werden für eine Stunde in 200 mL frisch zubereitete CAROSche Säure ($\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ (30 %), 70/30) gegeben, anschließend gründlich unter fließendem Wasser abgespült und im Trockenofen für 30 Minuten bei 100 °C getrocknet. Man achtet darauf, daß sämtliche Wasserreste entfernt sind und läßt die Träger abkühlen. Man mischt 45,9 μL 7-Octenyltrichlorosilan (7-TCS; 0,2 mmol) oder 78,8 μL Octadecyltrichlorosilan (18-TCS; 0,2 mmol) mit je 200 mL Cyclohexan und gibt die Träger dazu. Das Gefäß wird verschlossen und über Nacht luftdicht stehen gelassen. Man spült die Silanlösung mehrfach mit *n*-Hexan von den Glaträgern und wäscht mit Wasser nach. Danach werden die Träger in Chloroform (2 x 200 mL, 15 min) gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur längerfristigen Lagerung bewahrt man die Träger unter Stickstoff lichtgeschützt auf.

7.1.3.2 Ozonisierung

Die Oberseiten der silanisierten Glasobjektträger werden durch Anritzen der oberen rechten Ecke markiert. Die Träger werden mit der Oberseite nach oben dicht nebeneinander auf eine Unterlage aus Glas oder Polypropylen gelegt und in eine Edelstahlwanne (45 x 30 x 9 cm) mit Gasanschlüssen und Silikonschläuchen gegeben. Die Wanne wird luftdicht verschlossen. Die Durchflußrate an medizinischem Sauerstoff durch den Ozonisator bzw. die gesamte Apparatur wird auf 1 L/min eingestellt. Aus der Apparatur austretendes Ozon wird über den zweiten Schlauch an der Edelstahlwanne in den Abzug geleitet. Der Ozonisator wird bei maximaler Leistung (Stufe 11) für 30 Minuten eingeschaltet. Danach läßt man für ca. eine Minute Sauerstoff durch die Apparatur leiten und flutet anschließend die Edelstahlwanne mit Stickstoff (ca. 3 Minuten). Die Träger werden herausgenommen und sofort für den nächsten Derivatisierungsschritt (7.1.3.3) weiterverwendet.

7.1.3.3 UV-induzierte Graftpolymerisation

Man löst 149 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,4 mmol) in 190 mL Wasser und gibt unter Rühren 10 mL Poly(ethylenglycol)methacrylat (PEGMA₅;

~ 30 mmol^o) hinzu. Diese Lösung wird solange unter Rühren abwechselnd evakuiert und mit Stickstoff belüftet, bis keine signifikante Gasentwicklung mehr festzustellen ist. Die frisch ozonisierten Glasobjektträger werden in einer Schale (20 x 11,5 x 2,6 cm) aus Polypropylen eng mit der Oberseite nach oben angeordnet. Man gibt die wäßrige Lösung zu, wobei eine Blasenbildung zu vermeiden ist. Die Plastikschaale wird in die Edelstahlwanne gesetzt und letztere mit einer Quarzglasplatte luftdicht verschlossen. Innerhalb der nächsten fünf Minuten wird die Wanne mit Stickstoff geflutet und die UV-Lampe mittig in einem Abstand von 10 cm zur Glasoberfläche positioniert. Die Bestrahlungsdauer beträgt 60 Minuten. Während der Bestrahlung herrscht ein geringer Stickstoffüberdruck in der Wanne. Nach dem Ende der Prozedur werden die gegrifteten Träger gründlich mit Wasser abgespült und für zwei Stunden in 80 °C heißem Wasser gerührt. Danach läßt man sie über Nacht in DMF rühren, spült das DMF mit MeOH ab und trocknet die Träger im Luftstrom. Sie werden im Kühlschrank bei 0 °C unter Stickstoff lichtgeschützt gelagert.

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

Die PEG-gegrifteten Gläser werden in DMF für ca. 10 Minuten vorgequollen. Man mischt unter Rühren in trockenem DMF die Fmoc-geschützte Aminoalkansäure (0,1 M) und DCC (0,12 M) und läßt 5 Minuten stehen. Das DMF läßt man von den Glasträgern vorsichtig ablaufen. Zur angesetzten Lösung wird nun NMI in einer entsprechenden Endkonzentration von 0,24 M zugetropft und die erhaltene Mischung auf die Objektträgeroberseite aufgegeben (ca. 1 mL pro Objektträger). Je nach gewünschter Aminogruppendichte läßt man die Träger mit der überstehenden Lösung eine bestimmte Zeit luftgeschützt stehen. Man saugt die überstehende Lösung ab und wäscht mit DMF (5 x 3 min). Die Träger werden anschließend in eine Lösung von 70 % DMF, 20 % *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) und 10 % Essigsäureanhydrid über Nacht eingelegt. Die Lösung wird entfernt und man wäscht die Träger fünfmal je drei Minuten mit DMF. Die einzelnen Objektträger werden nun mit je 1 mL 20 %igem Piperidin in DMF versetzt, 20 Minuten inkubiert und die erhaltene Lösung gegen die Stammlösung bei $\lambda = 301$ nm UV-spektroskopisch vermessen. Der mittlere Flächeninhalt der verwendeten Träger beträgt 19,76 cm². Aus der Extinktion E ($d = 1$ cm) und dem molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 5129$ M⁻¹ errechnet sich der Derivatisierungsgrad DG nach:

$$DG [\text{nmol}/\text{cm}^2] = \frac{E \cdot V[\text{L}] \cdot 10^9}{\varepsilon \cdot 19,76 \text{ cm}^2}$$

Die Träger werden anschließend nacheinander mit DMF (3 x 50 mL, 5 min) und MeOH (2 x 50 mL, 3 min) gewaschen. Nach Trocknung im Luftstrom sind die derivatisierten Objektträger einsatzbereit. Für eine längere Lagerung können sie lichtgeschützt und unter Stickstoff bei 0 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

^o M(PEGMA₅) ~ 360 g/mol laut Hersteller

7.2 Proteinresistenz-Tests

7.2.1 Markierung von Proteinen und Antikörpern mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)⁹⁸

Je 20 mg der entsprechenden Proteine bzw. Antikörper werden in 2 mL Carbonatpuffer (pH 9,0) gelöst. Die Konzentration an FITC in getrocknetem DMSO beträgt ebenfalls 10 mg/mL. Das Volumen an eingesetzter FITC-Lösung berechnet sich wie folgt:

$$V_{\text{FITC}}[\text{mL}] = \frac{m_{\text{Protein}}[\text{mg}] \cdot 0,1}{M_{\text{Protein}}} \cdot R \cdot M_{\text{FITC}}$$

m: Masse

M: molare Masse [g/mol]

R bezeichnet das gewünschte Reaktionsverhältnis zwischen FITC und Protein bzw. Antikörper. Mit $R = 10$ und $M_{\text{FITC}} = 389,4$ g/mol ergeben sich folgende Ansätze:

Substanz	<i>M</i> [g/mol]	V_{FITC} [μL]
BSA	66.430	117
γ-Globulin	157.500	49
Lysozym	14.307	544
Fibrinogen	340.000	23

Das berechnete Volumen an FITC-Lösung wird zu der Protein- bzw. Antikörperlösung gegeben und für 90 Minuten unter Lichtausschluß leicht geschüttelt. Im Falle von Lysozym verwendete man eine DMF-FITC-Lösung, da es bei der Zugabe von DMSO-FITC zu einer Ausflockung kam. In der Zwischenzeit werden die Sephadex[®] G-25-gepackten Säulen mit je 25 mL PBS-Puffer äquilibriert. Jeweils 2 mL der Reaktionslösung werden pro Säule aufgetragen und getrennt. Die erste gelbe Fraktion ist das entsprechende FITC-markierte Produkt, das aufgefangen und vor Lichteinfluß geschützt wird. Von den einzelnen Lösungen werden UV-spektroskopisch zwei Extinktionswerte *E* bei $\lambda_1 = 280$ nm und $\lambda_2 = 492$ nm gegen PBS-Puffer bestimmt, um Proteingehalt *P* und Markierungsgrad *MG* zu berechnen. Dabei müssen die Lösungen gegebenenfalls vorher mit PBS-Puffer verdünnt werden.

$$P[\text{mg/mL}] = \frac{E_{280} - 0,3 \cdot E_{492}}{1,4}$$

P: Proteingehalt der Lösung [mg/mL]

$$MG \left[\frac{\text{mol}_{\text{FITC}}}{\text{mol}_{\text{Protein}}} \right] = \frac{E_{492} \cdot M_{\text{Protein}}}{P \cdot \epsilon_{\text{FITC}}} = \frac{E_{492} \cdot M_{\text{Protein}}}{P \cdot 68000}$$

MG: Markierungsgrad [$\text{mol}_{\text{FITC}}/\text{mol}_{\text{Protein}}$]

Aus den gemessenen Werten erhielt man folgende Durchschnittsangaben:

Substanz	<i>P</i> [mg/mL]	<i>MG</i> [$\text{mol}_{\text{FITC}}/\text{mol}_{\text{Protein}}$]
BSA	1,91	3,21
γ -Globulin	4,04	2,83
Lysozym	2,11	1,27
Fibrinogen	1,95	4,91

7.2.2 Fluoreszenzmikroskopie adsorbierter FITC-Proteine auf Glasoberflächen

Die jeweiligen, unterschiedlich modifizierten Glasobjektträger (PEG-OH-gegraftet und PEG-NH-acetyliert) und zum Vergleich eine unbehandelte Probe werden für 15 Minuten in PBS-Puffer rehydratisiert. Nach Entfernen der Pufferlösung werden die Träger mit je ca. 1 mL FITC-markierter Protein- bzw. Antikörperlösung in PBS überschichtet und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Die Proteinlösungen sollten einen Gehalt *P* von ungefähr 2 mg/mL aufweisen und müssen gegebenenfalls mit PBS-Puffer verdünnt werden. Nach Ablauf der Zeit wird die Proteinlösung sukzessive gegen PBS-Puffer ausgetauscht, ohne daß die Objektträger aus der Lösung genommen werden. Man läßt die Träger noch 10 Minuten in PBS-Puffer liegen, spült mit destilliertem Wasser nach und trocknet sie im Luftstrom. Die Träger werden unter Stickstoff und Lichtausschluß bei 0 °C aufbewahrt.

7.2.3 XP-Spektroskopie adsorbierter Proteine auf Glasoberflächen

Die zu untersuchenden Objektträger werden für 15 Minuten in PBS-Puffer rehydratisiert. In der Zwischenzeit werden Lösungen von je 20 mg Protein bzw. Antikörper in 10 mL PBS angesetzt. Nach Entfernen der Pufferlösung werden pro Objektträger in einer Petrischale 10 mL Proteinlösung zugegeben und unter leichtem Schütteln für eine Stunde inkubiert. Zur PBS-Protein-Lösung wird anschließend so viel PBS-Pufferlösung zugegeben bis die Petrischale überläuft. So ist sichergestellt, daß der betreffende Träger nicht austrocknen kann. Man schüttelt anschließend leicht für drei Minuten. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt. Man läßt die Träger noch zehn Minuten in PBS-Puffer liegen, spült mit destilliertem Wasser nach und trocknet sie im Luftstrom. Die Träger werden unter Stickstoff und Lichtausschluß bei 0 °C bis zur Messung am XP-Spektrometer aufbewahrt.

7.3 Antikörperbindungsstudien

7.3.1 Kovalente Anbindung von Peptiden an NH₂-funktionalisierte Glasträger

7.3.1.1 Einführung des bifunktionellen Linkers Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure, SMCC

Die NH₂-funktionalisierten Träger (Angaben für ca. 5 Stück) werden für 15 Minuten in DMF vorgequollen. Nach Entfernen des DMF wird je 1 mL folgender Lösung pro Träger aufgetragen: 3,4 mg/mL SMCC in trockenem DMF (10 mM). Man läßt über Nacht inkubieren, wäscht anschließend viermal je 3 Minuten mit DMF und trocknet die Träger im Luftstrom.

7.3.1.2 Kopplung der Cystein-terminierten Peptide an SMCC-Oberflächen

Von den entsprechenden Peptiden werden Stammlösungen von 1000 µM in Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) und eine Konzentrationsreihe angesetzt. Die SMCC-modifizierten Glasträger werden für 10 Minuten in Phosphatpuffer eingelegt und getrocknet. Die gepufferten Peptidlösungen werden entweder zu je 1 µL mit einer Pipette oder zu je 1 nL mit einem Spotroboter auf den Träger aufgespottet und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier als Unterlage inkubiert. Man gibt nun zu den Trägern eine Lösung von 218 µL 2-Mercaptoethanol in 50 mL Phosphatpuffer (50 mM) und schüttelt für 30 Minuten. Danach wäscht man mit Phosphatpuffer (3 x 50 mL, 5 min), Wasser (1 x 50 mL, 1 min), Ethanol (2 x 50 mL, 3 min) und trocknet im Luftstrom.

7.3.2 Inkubation mit spezifischem bzw. sekundärem, POD-markiertem Antikörper

Die Träger mit den kovalent gekoppelten Peptiden werden zunächst im Waschpuffer (TBS, pH 7,4 mit 0,1 v% Tween[®] 20) für 15 Minuten vorinkubiert. Die spezifischen Antikörper werden mit TBS/Tween-Puffer 1:1000 verdünnt. Die Pufferlösung wird von den Trägern entfernt und je 1 mL Antikörperlösung pro Objektträger aufgetropft. Man läßt die Träger entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder für 16 Stunden bei 4 °C inkubieren. Um ein Austrocknen der Oberflächen zu vermeiden, verwendet man in den Petrischalen als Unterlage ein mit TBS-Puffer angefeuchtetes Filterpapier. Die Antikörperlösung wird abgesaugt und die Träger werden zum Waschen einzeln in 50 mL-Falcon Tubes gegeben. Man wäscht gründlich unter Schütteln mit TBS/Tween (6 x 30 mL, 5 min). Die gewaschenen Träger werden zum Schutz vor einem Austrocknen in TBS-Puffer gelassen. Der Peroxidase-markierte Zweitantikörper wird in der Zwischenzeit mit TBS/Tween-Puffer 1:4000 verdünnt und man entfernt die Pufferlösung von den Trägern. Auf die noch feuchten Glasträger gibt man jeweils 1 mL der Zweitantikörperlösung und inkubiert unter denselben Bedingungen (16 h bei 4 °C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur). Die Antikörperlösung wird abgesaugt und die Träger werden ebenfalls zum Waschen einzeln auf 50 mL-Falcon Tubes verteilt. Man wäscht gründlich unter Schütteln mit TBS/Tween (6 x 30 mL, 5 min).

7.3.3 Nachweis des Sekundärantikörpers mittels Chemilumineszenz

Die noch feuchten, mit dem Zweitantikörper versehenen Träger werden in einer Entwicklerkassette zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und so vor Austrocknung geschützt. Man mischt 250 µL der Luminollösung („Enhanced Luminol Reagent“) und 250 µL der Peroxidlösung („Oxidizing Reagent“) des ECL-Kits. Pro Träger werden ca. 3-4 Tropfen dieser Mischung aufgetragen. Man legt die Klarsichtfolie wieder über die Träger und verteilt somit die Lösung gleichmäßig. In der Dunkelkammer wird der lichtempfindliche Film zurechtgeschnitten, für eine Sekunde kurz auf die Träger gedrückt und in der Entwicklermaschine entwickelt. Sollte die Belichtungszeit zu kurz gewesen sein, wiederholt man den Vorgang schrittweise bei längeren Expositionen.

7.3.4 Nachweis des Sekundärantikörpers mittels Fluoreszenz

Die unter 7.3.2 mit dem spezifischen Antikörper versehenen Glasträger werden nach dem Waschen mit TBS/Tween mit farbstoffmarkierten Zweitantikörpern in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS/Tween versetzt (1 mL pro Träger) und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Antikörperlösung wird abgesaugt und die Träger werden zum Waschen einzeln auf 50 mL-Falcon Tubes verteilt. Man wäscht gründlich unter Schütteln mit TBS/Tween (6 x 30 mL, 5 min) und spült zum Schluß mit dest. Wasser die Pufferlösung ab. Die Träger werden im Luftstrom getrocknet und bis zur Analyse mit dem Fluoreszenzscanner unter Stickstoff und Lichtausschluß bei 0 °C aufbewahrt.

7.3.5 Entfernen der gebundenen Antikörper

Die Träger mit den gebundenen Antikörpern werden zweimal für je 15 Minuten in der Lösung 1 (120,13 g Harnstoff, 2,50 g Natriumdodecylsulfat in 200 mL Wasser) und anschließend zweimal für je 15 Minuten in der Lösung 2 (160 mL Wasser, 200 mL Ethanol, 40 mL Essigsäure) geschüttelt. Die Träger werden danach zweimal je fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen, mit dest. Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet.

7.4 Peptidsynthesen an fester Phase

7.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Peptidsynthesen aus Lösung

7.4.1.1 Spotsynthese auf derivatisierter Cellulose

Die zur Synthese notwendigen OPfp-Ester der Fmoc-geschützten *L*-Aminosäuren werden in einer Konzentration von 0,3 M in trockenem DMF frisch aufgelöst. Das gewünschte Peptid wird vom C-Terminus her aufgebaut, d.h. man beginnt bei einer Sequenz wie zum Beispiel: $\text{H}_2\text{N-AS}_1\text{-AS}_2\text{-AS}_3\text{-AS}_4\text{-AS}_5\text{-COOH}$ mit der Aminosäure Nr. 5. ☉ Man pipettiert je nach gewünschter Spotgröße ca. 1 bis 10 µL der DMF-Lösung auf die aminoterminierte Cellulose

(ca. 5 x 5 cm) und läßt diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Gefäß ruhen. ② Man wäscht die Cellulose anschließend nacheinander unter leichtem Schütteln für 1, 2 und 5 Minuten mit je 25 mL einer 5 %igen Lösung von Essigsäureanhydrid in DMF und danach mit DMF (5 x 25 mL, 3 min). ③ Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe gibt man die Cellulose in 25 mL 20 %iger Piperidinlösung in DMF und wäscht wiederum mit DMF nach (5 x 25 mL, 3 min). ④ Reste von DMF werden durch zweimaliges Waschen in je 25 mL MeOH für 3 Minuten entfernt und die Cellulose an der Luft getrocknet. Der erste Kopplungszyklus ist damit beendet und man wiederholt die Schritte ① bis ④, bis die letzte Aminosäure gekoppelt hat und damit die Peptidsequenz aufgebaut ist.

Nun läßt man die Cellulose für ca. 10 Minuten in DCM schütteln und gibt sie anschließend für eine Stunde in ein verschließbares Polypropylen-Gefäß zusammen mit einer Lösung von 91 % TFA, 4 % DCM, 3 % Triisobutylsilan in Wasser. Man wäscht nacheinander mit jeweils 25 mL DCM (4 x 3 min), DMF (3 x 3 min) und MeOH (2 x 3 min) und trocknet die Cellulosemembranen im Luftstrom.

7.4.1.2 Manuelle Peptidsynthesen aus Lösung am RINK-Amid-Linker auf Gläsern

Die Anbindung des Rink-Amid-Linkers (4'-{(R,S)- α -[1-(9-Fluorenyl)methoxycarbonylamino]-2,4-dimethoxybenzyl}-phenoxyessigsäure) ist identisch mit 7.4.2.3. Zur Synthese verwendet man 0,3 molare Lösungen von Fmoc-L-Aminosäure-Pentafluorphenylestern in trockenem DMF. Die Träger werden 5 bzw. 10 Minuten vorher in DMF gequollen. Pro halbem Objektträger werden ungefähr 0,5 mL AS-Lösung verwendet. Die Kopplungszeit bei Raumtemperatur beträgt eine Stunde. Die Waschprozedur entspricht ebenfalls Punkt 7.4.2.3; das Waschen mit DCM entfällt allerdings.

7.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern

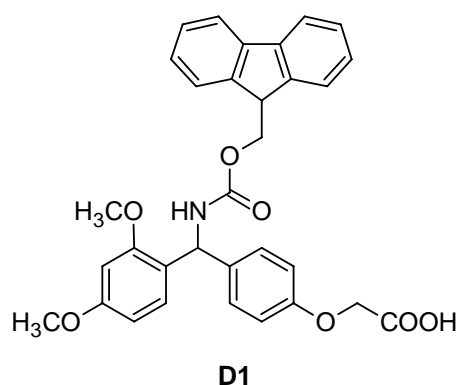
7.4.2.1 Testausdrucke auf derivatisierter Cellulosemembran

Ein ca. 10 x 5 cm großes Stück NH₂-terminierter Cellulosemembran wird mit Klebestift auf ein DIN A4-Blatt an die Stelle geklebt, auf der das Druckmuster erscheinen soll. Die Tonerkartusche des Laserdruckers wird mit Aminosäuretoner befüllt und wieder in den Drucker eingesetzt. Das Blatt mit der Membran wird über den Einzelblatteinzug mit dem gewünschten Muster bedruckt und die Membran anschließend vorsichtig entfernt. Man legt die bedruckte Membran zwischen zwei Blatt normales Papier und erhitzt die Membran zum Koppeln der Aminosäure von unten mit einer regelbaren, vorgeheizten Heizplatte und von oben mit einem Bügeleisen auf ca. 100 °C für 10 Minuten. Man wäscht die Tonerrückstände mit DMF von der Membran (3 x 20 mL, 3 min) und inkubiert anschließend die Membran in einer Lösung von 5 mL Essigsäureanhydrid, 10 mL DIPEA in 35 mL DMF für 20 Minuten. Man wäscht mit DMF (5 x 20 mL, 3 min) und legt danach die Membran in eine Lösung von 20 % Piperidin in DMF für 20 Minuten. Die Cellulose wird nacheinander mit DMF (5 x 20 mL, 3 min) und MeOH (5 x 20 mL, 3 min) gewaschen und mit 0,01 % BPB in MeOH für ca. 15 Minuten angefärbt. Man wäscht einmal mit MeOH nach (20 mL, 3 min) und trocknet die Membran an Luft.

7.4.2.2 Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern auf NH_2 -terminiertem Glas

Das gewünschte Druckmuster aus Aminosäuretoner wurde zunächst auf eine PET-Folie (Laserdruckerfolie) gedruckt und anschließend exakt auf einem derivatisierten Glasobjektträger ausgerichtet. Als Schablone diente dazu ein Winkel aus Kunststoff. Die mit Klebeband fixierte Folie wurde zusammen mit dem Glas auf einen Geltdrockner gelegt und unter Vakuum bei 90 °C für 90 Minuten erhitzt. Anschließend werden die Träger wie in Punkt 7.4.1.1 gewaschen, entschützt und getrocknet.

7.4.2.3 Manuelle Peptidsynthesen mit Aminosäuretonern am RINK-Amid-Linker auf Gläsern

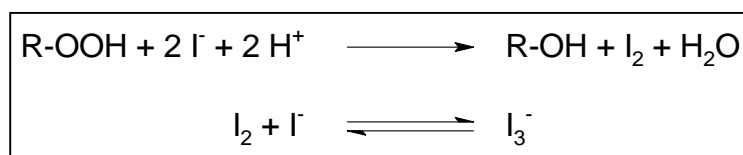


Die PEG-OH-gegrafteten Glasobjektträger werden für 10 Minuten in DMF vorgequollen. Zwischenzeitlich löst man 1,08 g (2 mmol) 4'-{(R,S)- α -[1-(9-Fluorenyl)methoxycarbonylamino]-2,4-dimethoxybenzyl}-phenoxyessigsäure („Rink-Amid-Linker“) **D1** und 496 mg (2,4 mmol) DCC in 20 mL trockenem DMF. Nach fünf Minuten Rühren gibt man 318 μL NMI (4 mmol) dazu. Das DMF wird von den Trägern abgesaugt und die Linkerlösung aufgetropft (1 mL pro Träger). Man inkubiert für 1, 2 und 3 Stunden, wäscht die Träger anschließend dreimal mit DMF (5 x 1 min), tropft 1 mL einer Lösung von 20 % Piperidin in DMF je Träger auf und mißt nach 20 Minuten die Extinktion bei 301 nm. Die Träger werden nacheinander mit DMF (3 x 1 min) und MeOH (2 x 1 min) gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Für die Peptidsynthese werden die Rink-modifizierten Gläser halbiert, gewogen und deren Oberseite markiert. Der Aminosäuretoner mit der ersten zu koppelnden Aminosäure wird mit dem Spatel auf dem Träger verteilt und dieser auf die bereits vorgeheizte Heizplatte ($T = 90\text{ °C}$; 100 °C ; 125 °C bzw. 150 °C) gelegt. Um die vollständige Verteilung der geschmolzenen Masse zu gewährleisten, wird ein ähnlich großes Bruchstück eines Objektträgers aufgelegt und gegebenenfalls angedrückt. Man läßt für eine bestimmte Zeit reagieren und gibt danach den noch heißen Träger nacheinander für 2, 3 und 5 Minuten in eine Lösung von 1 mL Essigsäureanhydrid in 20 mL DMF. Um eventuelle Reste der im Aminosäuretoner befindlichen Zusatzstoffe zu entfernen, wird einmal mit Chloroform für 3 Minuten gewaschen. Man wäscht mit DMF (3 x 1 min) und spaltet mit je 0,5 mL 20 %igem Piperidin in DMF die Fmoc-Schutzgruppe innerhalb von 20 Minuten ab. Man mißt die Extinktion für jeden Kopplungsschritt, um später die durchschnittliche Kopplungsausbeute bestimmen zu können. Die Träger werden nacheinander mit DMF (3 x 1 min) und MeOH (2 x

1 min) gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Man wiederholt die Schritte, bis die letzte Aminosäure der gewünschten Sequenz gekoppelt hat und wäscht anstatt mit MeOH mit DCM (2 x 1 min), um restliches DMF zu entfernen.

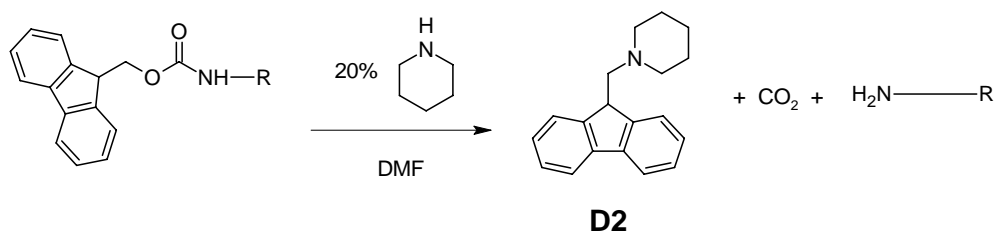
7.5 UV-spektroskopische Untersuchungen

7.5.1 Iodometrische Konzentrationsbestimmung an Hydroperoxogruppen nach Ozonisierung⁹⁹



Die durch Ozonisierung entstandenen Hydroperoxogruppen (R-O-OH) oxidieren Iodid zu elementarem Iod, das bei Überschuß an Iodidionen zum Triiodid-Anion weiterreagiert, welches UV-spektroskopisch nachgewiesen werden kann. In 420 mL (entsprechend 335,3 g)^p einer Mischung aus einem Teil Benzol (getrocknet über Molekularsieb 4 Å) und sechs Teilen Isopropanol (getrocknet über Molekularsieb 3 Å) werden 0,34 mg Eisen(III)-chlorid Hexahydrat (FeCl₆ · 6 H₂O; 1 ppm) gelöst. Die Mischung wird mit Natriumiodid bis zur Sättigung unter Ausschluß direkten Sonnenlichts versetzt. Die frisch ozonisierte Probe (Folie oder Glasträger) wird in 10 mL dieser Benzol-Isopropanol-Mischung bei 60 °C eingelegt. Man läßt unter gelegentlichem Schwenken 10 Minuten reagieren, entfernt das Wasserbad und mischt 1 mL Wasser hinzu. Nach 5 Minuten Abkühlen wird die entstandene Lösung bei λ = 360 nm spektroskopisch gegen die Ausgangslösung (+ 10 % Wasser) vermessen. Für die Konzentrationsberechnung wird ein ε = 15772^q L/mol verwendet. Anhand der Masse bzw. Fläche der Probe läßt sich die Belegungsdichte in nmol/mg bzw. nmol/cm² berechnen.

7.5.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten vom Piperidin-Dibenzofulven-Addukt



Das bei der Reaktion von Piperidin und Fmoc-geschützten, primären Aminogruppen entstehende Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (**D2**) besitzt sein Absorptionsmaximum bei

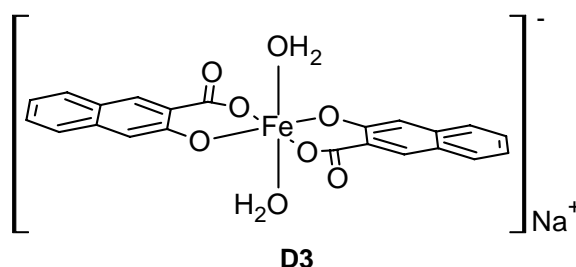
$$^p \rho_{\text{MIX}} = \frac{V_1 \rho_1 + V_2 \rho_2}{V_1 + V_2}$$

^q bestimmt aus einer Konzentrationsreihe von Tetrabutylammoniumtriiodid [13311-45-0] in Isopropanol/H₂O

$\lambda = 301$ nm. Zur Bestimmung von ϵ werden verschieden konzentrierte Lösungen von Fmoc-*L*-Alanin in DMF mit Piperidin versetzt, so daß der Gehalt an Piperidin jeweils 20% beträgt. Die Lösungen werden 20 min geschüttelt und danach photometrisch in Kunststoff-Küvetten bei 301 nm vermessen. Als Referenz dient eine Mischung aus 800 μ L DMF und 200 μ L Piperidin. Aus der Steigung der Auftragung von E_{301} gegen die Konzentration erhält man einen mittleren Koeffizienten von $\epsilon = 5129$ M⁻¹, welcher unterhalb von Literaturwerten liegt, die zudem großen Schwankungen unterliegen.

7.6 Synthesen von Ladungskontrollreagenzien

7.6.1 Natrium-diaquobis(3-hydroxy-2-naphthonsäure)-ferrat(III)



In einem 500 mL-Dreihalskolben mit Tropftrichter und Rückflußkühler wird in eine Suspension von 7,53 g (40 mmol) 3-Hydroxy-2-naphthonsäure in 150 mL Wasser unter Rühren eine Lösung von 5,41 g (20 mmol) FeCl₃ · 6 H₂O in 13,5 mL Wasser zugetropft. Die Lösung färbt sich dabei von hellgelb nach tiefdunkelblau. Man erwärmt die Mischung auf ca. 96 °C und tropft innerhalb einer Stunde eine Lösung von 2,40 g (60 mmol) NaOH in 100 mL Wasser zu. Man erhitzt für drei Stunden zum Sieden und läßt anschließend auf Raumtemperatur abkühlen. Die Reaktionslösung wird an der Wasserstrahlpumpe filtriert und der schwarze Rückstand mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Filtrat nahezu neutralen pH anzeigt. Der Niederschlag wird im Exsikkator über Nacht getrocknet, mit Chloroform gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhält 7,3 g von **D3** (15 mmol; 75 %) als grau-schwarzes Pulver.

ESI-MS: ber. (M -Na⁺): 464,21; gef.: 464,1 (14); 428,2 (M -2 H₂O, -Na⁺; 40); 143,4 (100)

¹H-NMR: keine Daten, da paramagnetisch

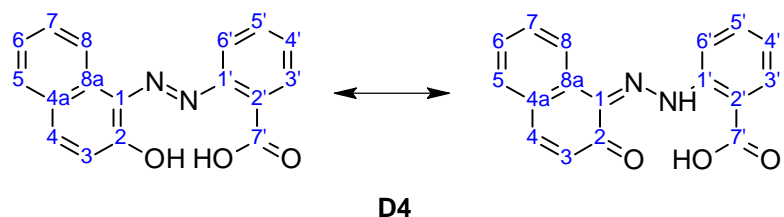
IR (KBr): 3426 br (O-H), 3054 m (Ar-C-H), 1630 m, 1593 m, 1516 m (jeweils Ar-C=C), 1452 m, 1389 m, 1149 w, 1085 w, 742 m (Ar-C-H)

UV: $\lambda_{\max} = 236,2$ nm (Ethanol)

Schmp.: 186,2 °C

7.6.2 Natrium-bis[2-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzoesäure]-aluminat(III)

7.6.2.1 Synthese des Komplexliganden 2-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)benzoesäure



10,0 g (72,92 mmol) Anthranilsäure werden in 33,3 mL (45,7 g) halbkonzentrierter Schwefelsäure (ca. 47 %) gelöst und auf 5 °C mit Eis abgekühlt. Man erhält eine beigefarbene Suspension. Unter Rühren werden 29,2 mL (72,92 mmol) einer wäßrigen 2,5 M NaNO₂-Lösung (8,63 g auf 50 mL Wasser) so zugetropft, daß die Temperatur der Reaktionslösung nicht über 5 °C steigt. Man rührt anschließend noch, bis sich alles gelöst hat. Die Mischung (**A**) wird weiter im Eisbad gekühlt. Mischung **B** besteht aus 10,51 g (72,92 mmol) 2-Naphthol, aufgelöst in 72,92 mL 2 M NaOH (8 g auf 100 mL). In die Mischung **B** wird nun langsam bei ca. 5 °C die diazotierte Anthranilsäure-Lösung (**A**) zugetropft. Sofort fällt ein orangeroter Niederschlag aus. Um ein Verklumpen zu vermeiden, gibt man Eiswasser nach Bedarf zu. Der Niederschlag wird an der Wasserstrahlpumpe filtriert und im Exsikkator über Nacht getrocknet. Eine Umkristallisation erfolgt in Hexan/DCM.

ESI-MS: ber. (M^+): 292,29; gef.: 315,3 ($M^+ + Na^+$; 100); 293,3 (M^+ ; 40)

¹H-NMR [300 MHz, d₆-DMSO]: δ = 6,64 (d; 1H; ³J = 9,8; 3-H), 7,36 (t; 1H; ³J = 7,62; 4'-H), 7,44 (t; 1H; ³J = 7,14; 6-H), 7,64-7,69 (m, 2H, 5-H und 5'-H), 7,85 (d; 1H; ³J = 9,8; 4-H), 8,02 (dd; 1H; ³J = 7,9; ⁴J = 1,2; 3'-H), 8,33 (d; 1H; ³J = 8,5; 6'-H), 8,41 (d; 1H; ³J = 7,9; 8-H), 9,70 (br-s, 1H, OH), 16,37 (br-s, 1H, NH)

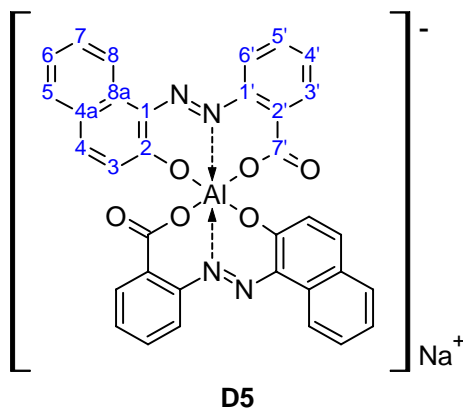
¹³C-NMR [75 MHz, d₆-DMSO]: δ = 118,56; 120,68; 121,10; 124,34; 124,19; 126,99; 127,89; 128,15; 128,60; 131,75; 131,97; 133,69; 134,14; 150,09; 160,23; 162,91; 165,48

IR (KBr): 3429 br (O-H), 3031 m (Ar-C-H), 2680-2472 w (C=O), 1705 s (C=O), 1621 m, 1602 m, 1568 m (jeweils Ar-C=C), 1495 s, 1480 s, 1448 s, 1254 s (C-N), 1200 s (C-O), 845 w + 749 s (Ar-C-H)

R_f (CCl₄/MeOH 3:1) = 0,56

7.6.2.2 Komplexbildung mit Aluminium(III)-sulfat

1,17 g (4 mmol) der Diazoverbindung **D4** werden in 35 mL Formamid suspendiert. Des Weiteren werden 0,40 g (10 mmol) NaOH in 10 mL Formamid gegeben, die sich erst nach ca. einer Stunde vollständig gelöst haben. Die NaOH-Lösung wird zur Diazasuspension gegeben und 20 Minuten auf 70 °C erwärmt. Zu dieser tiefdunkelroten Mischung gibt man eine Lösung von 1,60 g (2,4 mmol) Al₂(SO₄)₃ · 18 H₂O in 20 mL DMF. Man rührt bei 90 °C für weitere fünf Stunden und gießt anschließend die Reaktionsmischung in ca. 50 mL Eiswasser, wobei



ein rotorangefarbener, feiner Niederschlag ausfällt, der filtriert und an Luft getrocknet wird. Man erhält 800 mg von **D5** (1,3 mmol; 53 %). Eine Umkristallisation erfolgt in MeOH.

ESI-MS: ber. ($M\text{-Na}^+$): 607,54; gef.: 607,49 (100); 249,40 (10)

$^1\text{H-NMR}$ [300 MHz, d_6 -DMSO]: δ = 6,36 (d; 2H; $^3J = 9,2$; 3-H), 7,05 – 7,68 (m; 10H; 4'-H, 5'-H, 6'-H, 6-H, 7-H), 7,75 (d; 4H; $^3J = 9,2$; 4-H, 5-H); 8,06 (d; 2H; $^3J = 7,0$; 3'-H), 8,50 (d; 2H; $^3J = 8,2$; 8-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [75 MHz, d_6 -DMSO]: δ = 118,56; 120,61; 121,05; 123,08; 124,19; 127,88; 128,61; 129,31; 132,87; 133,59; 134,55; 139,68; 149,15; 150,18; 155,23; 159,41; 160,23; 165,02

IR (KBr): 3430 br, 3059 w, 2956 s, 2904 s (jeweils Ar-C-H), 1652 m - 1602 m (Ar-C=C), 1491 w, 1353 w, 1310 w, 1256 w (C-N), 749 m (Ar-C-H)

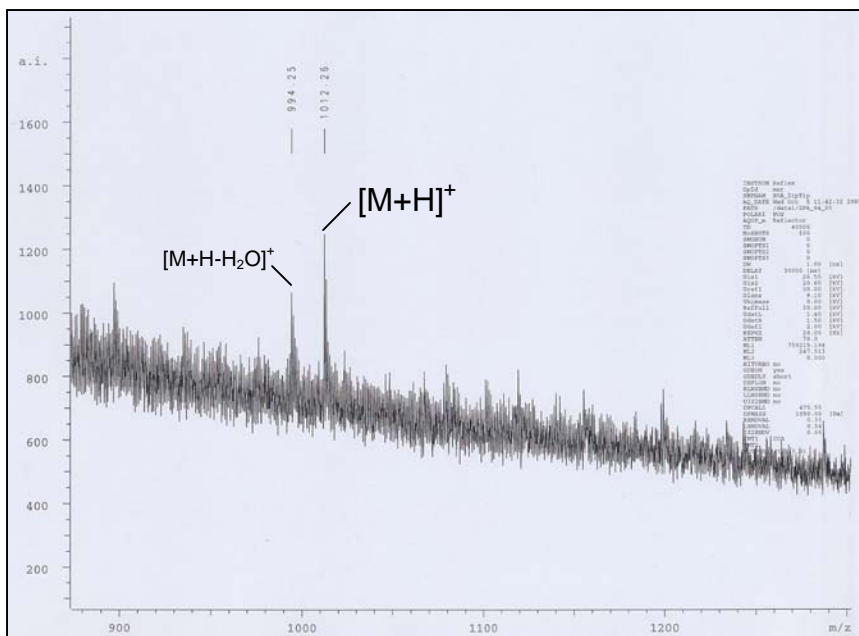
R_f (CCl₄/MeOH 3:1) = 0,67

7.7 Herstellung von Aminosäuretoner

Die jeweiligen Tonerkomponenten (DPSO, CCA, Fmoc-*L*-AS-OPfp-Ester und das Tonerharz) werden abgewogen und in einem 250 mL-Becherglas vermischt. Die Mischung wird langsam erwärmt, bis sich eine viskose Schmelze gebildet hat. Diese läßt man solange rühren, bis sich die einzelnen Bestandteile gut vermischt haben. Die noch flüssige Masse wird auf einer Teflonmembran ausgebreitet. Nach dem Abkühlen wird die erstarrte Mischung mit einem Messer zerkleinert und in der Luftstrahlmühle mit getrockneter Luft zermahlen. Die erhaltenen Mikropartikel werden mit einem Sieb in verschiedene große Fraktionen getrennt. Die Aminosäure-Tonerpartikel werden unter Stickstoff bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

8.1.3 Epitop 5 (DYKDDDDK)

Reaktionsbedingungen: 90 °C, 90 min Kopplungsdauer



9. Literaturverzeichnis

- ¹ (a) Southern, E.; Mir, K.; Shchepinov, M. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 5-9 ; (b) *VLSLIPS® System* (Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis) von Affymetrix : www.affymetrix.com
- ² JPT Peptide Technologies GmbH: www.jpt.com
- ³ Albericio, F. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211-221.
- ⁴ Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- ⁵ Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *37*(22), 3404-3409.
- ⁶ (a) Rink, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790; (b) Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645-4648.
- ⁷ Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Najera, C. *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33*, 203-303.
- ⁸ Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- ⁹ Carpino, L. A.; Xia, J.; El-Faham, A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 54-61.
- ¹⁰ Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
- ¹¹ Carpino, L. A.; Xia, J.; Zhang, C.; El-Faham, A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 62-71.
- ¹² (a) Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2307-2309. (b) Falb, E.; Yechezkel, T. ; Salitra, Y. ; Gilon, C. *J. Peptide Res.* **1999**, *53*, 507-517.
- ¹³ Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*(19), 5401-5402.
- ¹⁴ Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652.
- ¹⁵ Kaduk, C.; Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Forner, K.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *Let. Peptide Sci.* **1995**, *2*, 285-288.
- ¹⁶ Katritzky, A. R.; Suzuki, K.; Singh, S. K. *Arkivoc* **2004**, General Papers, (*part i*), 12-35.
- ¹⁷ Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Brudel, M.; Winter, R.; Schümann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3275-3280.
- ¹⁸ Kovacs, J.; Mayers, G. L.; Johnson, R. H.; Cover, R. E.; Ghatak, U. R. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1810-1815.
- ¹⁹ Kovacs, J.; Kisfaludy, L.; Ceprini, M. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*(1), 183-184.
- ²⁰ (a) Frank, R.; Overwin, H. *Methods Mol. Biol.* **1996**, *66*, 149-169. (b) Kramer, A.; Schneider-Mergener, J. *Methods. Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25-39. (c) Kramer, A.; Reineke, U.; Dong, L.; Hoffmann, B.; Hoffmüller, U.; Winkler, D.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J. *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 319-327.
- ²¹ (a) Frank, R.; Döring, R. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040; (b) Eichler, J.; Bienert, M. Stierandova, A.; Lebl, M. *Pept. Res.* **1991**, *4*, 296-307.
- ²² Frank, R. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- ²³ Fodor, S. P.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- ²⁴ Beier, M.; Hoheisel, J. D. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, e11.
- ²⁵ Pellois, J. P.; Zhou, X.; Srivannavit, O.; Zhou, T.; Gulari, E.; Gao, X. *Nature Biotechn.* **2002**, *20*, 922-926.

- 26 umfangreiche Übersichten: (a) Frank, R.; Schneider-Mergener, J. *SPOT-Synthesis – Scope and Applications* aus: Peptide Arrays on Membrane Supports: Synthesis and Application, J. Koch und M. Mahler (Eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, **2002**, 1-22; (b) Frank, R. *J. Immunol. Meth.* **2002**, *267*, 13-26; (c) Liu, R.; Enstrom, A. M.; Lam, K. S. *Exp. Hemat.* **2003**, *31*, 11-30.
- 27 Heine, N., Dissertation **2000**, Humboldt-Universität Berlin.
- 28 Bray, A. M.; Maeji, N. J.; Jhingran, A. J.; Valerio, R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6163-6166.
- 29 Volkmer-Engert, R.; Hoffmann, B.; Schneider-Mergener, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1029-1032.
- 30 Puskas, J. E.; Chen, Y. *Biomacromolecules* **2004**, *5(4)*, 455-461.
- 31 Sweet, G. E.; Bell, J. P. *J. Polym. Sci., Phys. Ed.* **1978**, *16*, 1935-1946.
- 32 Desai, N. P.; Hubbell, J. A. *J. Biomed. Mat. Res.* **1991**, *25*, 829-843.
- 33 Gupta, B.; Hilborn, J.; Bisson, I.; Frey, P. *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc.* **2000**, *41(1)*, 1040-1041.
- 34 (a) Zhang, P. Y.; Rånby, B. *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, *41*, 1469-1478; (b) Feng, Z.; Rånby, B. *Angew. Makromol. Chem.* **1992**, *196*, 113-125.
- 35 Walzak, M. J.; Flynn, S.; Foerch, R.; Hill, J. M.; Karbasheski, E.; Strobel, M. *J. Adhes. Sci. Techn.* **1995**, *9(9)*, 1229-1248.
- 36 Kato, K.; Uchida, E.; Kang, E. T.; Uyama, Y.; Ikada, Y. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 209-259.
- 37 Carlson, C. F. US-Patente 2 221 776 (**1938**) und 2 297 691 (**1942**)
- 38 Yamamoto, M.; Ohtaki, N.; Okiyama, Y.; Yoshida, K.; Sumida, F. *OKI Techn. Rev.* **1998**, *64*, 15-20.
- 39 Michel, E.; Baur, R.; Macholdt, H. T. *J. Electrostat.* **2001**, *51-52*, 91-96.
- 40 Anderson, J. H. *J. Electrostat.* **1996**, *37*, 197-209.
- 41 Macholdt, H. T. *Chemie in unserer Zeit* **1990**, *24(4)*, 176-181.
- 42 *Nature's Electricity*, Adams, Ch. K., Blue Ridge Summit, PA: Tab Books, **1987**, S. 163.
- 43 Birkett, K. L.; Gregory, P. *Dyes and Pigments* **1986**, *7*, 341-350.
- 44 Macholdt, H. T.; Sieber, A. *J. Imag. Techn.* **1988**, *14*, 89-93.
- 45 Produktbeispiel siehe: <http://www.trekinc.com/products/210hs.asp>
- 46 Julien, P. C.; Gruber, R. J. *Dry Toner Technology* aus: Handbook of Imaging Materials, A. S. Diamond and D. S. Weiss (Eds.), Marcel Dekker, New York, **2002**, 173-208.
- 47 (a) Germer, W. *Bundesanstalt für Wasserbau* **2002**, *Mitteilungsblatt Nr. 85*, 133-135; (b) Greenpeace Österreich; www.greenpeace.at.
- 48 Hoffman, A. S. *Artif. Organs* **1992**, *16*, 43-49.
- 49 Renken, J.; Dahint, R.; Grunze, M.; Josse, F. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 176-182.
- 50 Ademovic, Z., Dissertation **2002**, RWTH Aachen.
- 51 (a) Coleman, D. L.; Gregonis, D. E.; Andrade, J. D. *J. Biomed. Mat. Res.* **1982**, *16*, 381-389; (b) Grinnell, F.; Feld, M. K. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4888-4893; (c) Okano, T.; Nishiyama, S.; Shinhara, L.; Akaike, T.; Sakuria, Y.; Kataoka, K.; Tsuruta, T. *Biomed. Mat. Res.* **1981**, *15* 383-402.
- 52 Kingshott, P; Griesser, H. J. *Curr. Opinion in Solid State Mat. Sci.* **1999**, *4*, 403-412.

- 53 Scott, R. A.; Peppas, N. A. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1371-1380.
- 54 Jo, S.; Park, K. *Biomaterials* **2000**, *21*(6), 605-616.
- 55 Jun, Y.; Cha, T.; Guo, A.; Zhu, X. Y. *Biomaterials* **2004**, *25*(17), 3503-3509.
- 56 Bergstrom, K.; Holmberg, K.; Safran, A.; Hoffman, A. S.; Edgell, M. J.; Kozlowski, A.; Hovanes, B. A.; Harris, J. M. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*(6), 779-790.
- 57 Litauszki, L.; Howard, L.; Salvati, L.; Tarcha, P. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *35*(1), 1-8.
- 58 Xu, D.; Yu, W. H.; Kang, E. T.; Neoh, K. G. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *279*(1), 78-87.
- 59 Kim, M. K.; Park, I. S.; Park, H. D.; Wee, W. R.; Lee, J. H.; Park, K. D.; Kim, S. H.; Kim, Y. H. *J. Cataract. Refract. Surg.* **2001**, *27*, 766-774.
- 60 Wang, P.; Tan, K. L.; Kang, E. T. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, *11*(2), 169-186.
- 61 Cheo, S. H. Y.; Wang, P.; Tan, K. L.; Ho, C. C.; Kang, E. T. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2001**, *12* (5), 377-384.
- 62 Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.
- 63 Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426-436.
- 64 Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. *Science* **1997**, *276*, 1425-1428.
- 65 Sato, T.; Kobayashi, K.; Tanigawa, H.; Uno, K. *CLAO Journal* **2002**, *28*(4), 181-185.
- 66 Herrwerth, S.; Rosendahl, T.; Feng, C.; Fick, J.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Dahint, R.; Grunze, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1880-1887.
- 67 Wenschuh, H.; Volkmer-Engert, R.; Schmidt, M.; Schulz, M.; Schneider-Mergener, J.; Reineke, U. *Biopolymers* **2000**, *55*, 186-206
- 68 www.mathweb.com
- 69 (a) Guan, J.; Gao, C.; Feng, L.; Shen, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 2505-2512; (b) Guan, J.; Gao, C.; Feng, L.; Shen, J. *European Polym. J.* **2000**, *36*, 2707-2713; (c) Guan, J.; Gao, C.; Feng, L.; Shen, J. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2000**, *11*(5), 523-536.
- 70 (a) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554; (b) Harder, P.; Bierbaum, K.; Wöll, Ch.; Grunze, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 445-454; (c) Kölbel, M.; Tjerkstra, R. W.; Kim, G.; Brugger, J.; van Rijn, C. J. M.; Nijdam, W.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*(3), 219-224.
- 71 (a) Bensebaa, F.; Voicu, R.; Huron, L.; Ellis, T. H. *Langmuir* **1997**, *13*, 5335-5340; (b) Dannenberger, O.; Wolff, J. J.; Buck, M. *Langmuir* **1998**, *14*, 4679-4682; (c) Dannenberger, O.; Buck, M.; Grunze, M. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2202-2213.
- 72 Richards, T. W.; Shipley, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, *41*(12), 2002-2012.
- 73 Usacheva, T. M.; Ivanova, O. I.; Shakhparonov, M. I. *Russ. J. Phys. Chem.* **1985**, *59*(9), 1360-1361.
- 74 Laurence, Ch.; Nicolet, P.; Dalati, M. T.; Abboud, J.-L. M.; Notario, R. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*(23), 5807-5816.
- 75 Fieglund, L. R.; McCorn Saint Fleur, M.; Morris, J. R. *Langmuir* **2005**, *21*, 2660-2661.

- 76 Dubowski, Y.; Vieceli, J.; Tobias, D. J.; Gomez, A.; Lin, A.; Nizkorodov, S. A.; McIntire, T. M.; Finlayson-Pitts, B. J. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 10473-10485.
- 77 Disselkamp, R. S.; Dupuis, M. J. *J. Atmos. Chem.* **2001**, *40*(3), 231-245.
- 78 Uosaki, K.; Quayum, M. E.; Nihonyanagi, S.; Kondo, T. *Langmuir* **2004**, *20*, 1207-1212.
- 79 Kim H.W.; Chung C.W.; Rhee Y.H. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *35*, 47-53.
- 80 Reinhardt, L. A.; Sacksteder, K. A.; Cleland, W. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(51), 13366-13369.
- 81 Lim, P. S.; Jenson, A. B.; Cowsert, L.; Nakai, Y.; Lim, L. Y.; Jin, X. W.; Sundberg, J. *P. J. Infect. Dis.* **1990**, *162*, 1263-1269
- 82 Kolodziej, P. A.; Young, R. A. *Methods Enzymol.* **1991**, *194*, 508-519.
- 83 Sloodstra, J. W.; Kuperus, D.; Pluckthun, A.; Meloen, R. H. *Mol Divers.* **1997**, *2*(3), 156-164.
- 84 Cezari, M. H. S.; Juliano, L. *Pep. Res.* **1996**, *9*, 88-91.
- 85 (a) Yoshitake, S. ; Yamada, Y. ; Ishikawa, E. ; Masseyeff, R. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *101*, 395-399 ; (b) Uto, I.; Ishimatsu, T. ; Hirayama, H. ; Ueda, S. ; Tsuruta, J. ; Kambara, T. *J. Immunol. Methods* **1991**, *138*, 87-94.
- 86 Yoji, K.; Yukihiko, I; Kazuhiro, I. US Patent 4,404,271A1, **1981**.
- 87 nach: Lycka, A.; Lustinec, D.; Holecek, J.; Nadvornik, M.; Holcapek, M. *Dyes and Pigments* **2001**, *50*, 203-209.
- 88 Güttler, S. *VDI-Z* **2005**, *6*, 147-149.
- 89 Matsuda, K.; Muto, E.; Nagaoka, K.; Sato, H. *OKI Techn. Rev.* **2003**, *70*, 34-37.
- 90 (a) König, K., Diplomarbeit **2005**, Universität Heidelberg; (b) Nesterov, A., Dissertation (in Arbeit), Universität Heidelberg.
- 91 Köhn, F., Diplomarbeit **1998**, Universität Heidelberg.
- 92 Shirley, D. A. *Phys. Rev. B* **1972**, *5*, 4709-4714.
- 93 (a) Yeh, J. J.; Lindau, I. *At. Data Nucl. Data Tables* **1985**, *32*, 1-155; (b) Scofield, J. H. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phen.* **1976**, *8*, 129-137.
- 94 Cauchy, A. L. *Bull. Sci. Math.* **1830**, *14*, 6-10.
- 95 Wenschuh, H.; Volkmer-Engert, R.; Schmidt, M.; Schulz, M.; Schneider-Mergener, J.; Reineke, U. *Biopolym. Pept. Sci.* **2000**, *55*, 188-206.
- 96 Aufgrund verschiedener Werte für ϵ in der Literatur wurden Extinktionen E verschiedener Konzentrationen von Fmoc- β -Alanin in 20% Piperidin/DMF bei 301 nm nach jeweils 20 Minuten gemessen und ein ϵ von 5129 bestimmt (siehe 7.5.2); Literaturwerte: $\epsilon_{310\text{ nm}} = 7800$ in Shannon, S. K.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*(14), 4586-4594; $\epsilon_{290\text{ nm}} = 5253$ in Chan, W. C.; White, P. D. "Fmoc solid phase peptide synthesis – A practical approach", Oxford University Press, Oxford, **2000**, S. 63.
- 97 Eichler, J.; Bienert, M.; Stierandova, A.; Lebl, M. *Pept. Res.* **1991**, *4*, 296-307.
- 98 nach: Haugland, Rosaria P., Coupling of monoclonal antibodies with fluorophores, *Methods Mol Biol*, *45*, 205-221, 1995.
- 99 Fujimoto, K.; Takebayashi, Y.; Inoue, H.; Ikada, Y. *J. Polym. Sci. A: Polymer Chemistry* **1993**, *31*, 1035-1043.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, den 19. Oktober 2005

Mario Beyer