

Mikroarrays zur Messung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit konfokaler Fluoreszenzdetektion

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

MARTIN ELBS

Tag der mündlichen Prüfung: 9.2.2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Theorie zur Fluoreszenzmikroskopie mit Rezeptor-Ligand-Arrays	5
2.1	Fluoreszenzfarbstoffe	5
2.2	Konfokale Mikroskopie	8
2.3	Mikroarrays auf Glasoberflächen	11
2.4	Rezeptoren und Liganden	16
2.4.1	Das Modellsystem Vancomycin	16
2.4.2	ZAP-70 in der Signaltransduktion von T-Zellen	19
2.5	Die Stärke von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen	20
2.5.1	Messung von Bindungskonstanten im Gleichgewicht	20
2.5.2	Messung von Bindungskonstanten durch Kinetikmessungen	23
2.5.3	Bivalente Bindungen	25
3	Herstellung von Mikroarrays	27
3.1	Beschichtungskontrolle mit fluoreszenten Liganden	27
3.2	Silanisierung von Glasoberflächen	30
3.3	Erzeugung des Arrays	32
3.4	Absättigung der umgebenden Oberfläche	36
3.5	Zellresistente Arrays	38
4	Messungen auf Mikroarrays	43
4.1	Untersuchung spezifischer Bindungen mit konfokaler Detektion	43
4.2	Kinetikmessungen	47
4.3	Bindungstitrationen auf Vancomycin	49
4.4	Kompetitionstitration auf Vancomycin	54
4.5	Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden	57
4.6	Bindungsstudien mit Zellysat	67

5 Zusammenfassung und Ausblick	71
A Methoden	75
A.1 Chemikalien und Lösungen	75
A.2 Festphasensynthese	75
A.2.1 Harze und Harzbelegung	75
A.2.2 Peptidsynthese	76
A.2.3 Synthese des bivalenten Liganden	78
A.2.4 Analytik	79
A.3 Modifizierung von Glasoberflächen	79
A.4 Datenerzeugung und -auswertung	81
A.4.1 Mikroskopie	81
A.4.2 Datenverarbeitung	83
A.4.3 Datenanalyse	83
A.5 Zellkultur	84
A.5.1 Test auf zellresistente Beschichtungen	84
A.5.2 Zellysate mit ZAP-70-YFP	85
B Makro für Image Pro Plus	87
Literaturverzeichnis	93

Abkürzungen

Für Aminosäuren wurde entsprechend den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur der Ein- oder Dreibuchstabencode verwendet.^[1] Im Einbuchstabencode wurde D-Alanin im Unterschied zu L-Alanin mit dem entsprechenden Kleinbuchstaben „a“ bezeichnet.

Ac	Acetyl
Ahx	Aminohexansäure
BSA	Rinderserumalbumin
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fluo	5(6)-Carboxyfluorescein
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GOPTS	3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisierung
Mtt	4-Methyltrityl
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
Pfp	Pentafluorphenyl
pY	Phosphotyrosin im Einbuchstabencode
RfS	reflektometrische Interferenzspektrometrie
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
TAMRA	5(6)-Carboxytetramethylrhodamin
TCP-Harz	Tritylchlorid-polystyrol (1 % Divinylbenzol)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
YFP	Gelb Fluoreszierendes Protein
ZAP-70	ζ-assoziertes Protein

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2000 bis November 2003 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt. In dieser Zeit, in knapp dreieinhalb Jahren, habe ich viel über Peptide, Fluoreszenz und Mikroarrays gelernt. Dreieinhalb Jahre entsprechen mehr als tausend beschichteten Deckgläschen, unzähligen Stunden vor dem Fluoreszenzmikroskop und über einer Million Mausklicks zur Auswertung der aufgenommenen Bilder. Dreieinhalb Jahre entsprechen aber auch vielen guten Ratschlägen, hilfreicher Unterstützung und erholsamer Ablenkung, ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen wäre. Dafür danke ich.

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Günther Jung, meinem Doktorvater, und Dr. Roland Brock für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Roland Brock hat mein Interesse an diesem Thema geweckt und mich intensiv gefördert. Im organisatorischen Chaos sorgten Ursula Becker und Lisa Neumann stets für die nötige Ordnung. Jens Frauenfeld und Boris Fischmann nahmen mir viele Stunden vor dem Fluoreszenzmikroskop ab und führten ausgezeichnete Messungen für mich durch. Thomas André half mir durch seinen unermüdlichen Kampf mit der Technik bei der Miniaturisierung der Arrays. Michael Hulko synthetisierte den bivalenten Liganden für mich und Nicole Sessler sorgte für eine reibungsfreie, automatisierte Peptidsynthese. Die kurzweiligsten Messungen und Auswertungen ergaben sich auf dem Gebiet der Zelllysate dank der Zusammenarbeit mit Oda Stoevesandt. Hilfreiche Ratschläge und tatkräftige Unterstützung erhielt ich auch jederzeit von Rainer Fischer, Mariola Fotin-Mleczek, Antje Hoff, Karsten Köhler, Oliver Mader, Günter Roth und Söhnke Voss. So herrschte eine angenehme und fruchtbare Atmosphäre, für die ich ihnen und allen namentlich nicht erwähnten Kollegen herzlich danke. Mein größter Dank gebührt jedoch meiner Familie und allen Freunden, die mich das ganze Studium hindurch unterstützten.

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die heutigen Biowissenschaften zielen darauf ab, die Proteine bzw. deren zugrunde liegende Gene nach ihren biologischen Eigenschaften zu systematisieren, um damit Vorhersagen zu ermöglichen.^[2] Die Vorgänge in Zellen werden als komplexe Zusammenhänge betrachtet, in denen Biomoleküle miteinander wechselwirken und bestimmte Funktionen erfüllen.^[3] Ein aussagekräftiges System soll die Gene oder die Genprodukte auflisten, einteilen und die funktionalen Beziehungen zwischen ihnen beschreiben, so dass sich aus den Eigenschaften der einzelnen Biomoleküle ihr Wechselspiel in größeren Zusammenhängen vorhersagen lässt. Im Gegensatz zu den hundert chemischen Elementen können die mehr als hunderttausend verschiedenen Biomoleküle in biologischen Systemen jedoch aufgrund der großen Zahl nicht alle einzeln ausführlich charakterisiert werden. Die Lösung besteht darin, die biologischen Prozesse ganzheitlich zu betrachten und alle Komponenten eines Prozesses gleichzeitig auszulesen. Dies vermeidet darüber hinaus falsche Einordnungen, die sich durch eine Untersuchung beispielsweise einzelner Proteine außerhalb des Zusammenspiels aller Biomoleküle ergeben können. Solch einen ganzheitlichen Blick bieten Mikroarrays. Sie scheinen zu einem Standardwerkzeug für die molekularbiologische Forschung und die klinische Diagnostik zu werden.^[2]

Die Entwicklung der Mikroarrays beginnt mit dem Southern Blot, dem ersten „Array“,^[4] und verläuft über die Einführung nichtporöser Trägermaterialien, insbesondere Glasoberflächen, bis hin zu photolithographisch hergestellten, miniaturisierten Arrays, die mehrere Millionen DNA-Fragmente enthalten können. Die häufigsten Anwendungen stellen zur Zeit Expressionsanalysen und Mutationsnachweise dar. Bei ersteren wird beispielsweise untersucht, wie die Zelle in ihrer Genexpression auf äußere Einflüsse reagiert, während letztere zur Diagnose von Erkrankungen oder zur Bestimmung der individuellen Unterschiede zwischen Personen dienen.

Eine Untersuchung der Gene reicht jedoch nicht aus, um biologische Pro-

1 Einleitung und Aufgabenstellung

zesse zu verstehen. Es kommt auf die Genprodukte an, d.h. die tatsächlich aus den Genen hergestellten Proteine, und ihre Wechselwirkungen untereinander und mit anderen Molekülen.^[5] Auch für diese Fragestellung wurden deshalb in den letzten Jahren erste Mikroarrays zur Untersuchung von Proteinen entwickelt. Mit einem Mikroarray fast des gesamten Hefeproteoms konnten beispielsweise Proteine identifiziert werden, die mit einem anderen Protein, in diesem Fall Calmodulin, wechselwirkten,^[6] während Antikörper-Mikroarrays gleichzeitig und schnell die Konzentrationen vieler Proteine messen lassen.^[7] Um die molekulare Erkennung der Proteine jedoch auf der Ebene einzelner Aminosäuren zu untersuchen, werden Peptid-Mikroarrays und andere Mikroarrays kleiner Moleküle eingesetzt.^[8,9] Die Information von solchen Arrays kleiner Moleküle ist bestens geeignet, Substrate und Inhibitoren für diagnostische und therapeutische Zwecke zu entwickeln und kann ganz allgemein einer parallelen Untersuchung vieler Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen dienen.^[10] Abgesehen von der Untersuchung biologischer Prozesse sind solche Arrays kleiner Moleküle allgemein einsetzbar, um die Wechselwirkungen kleiner Moleküle oder Peptide untereinander zu messen. Diese Wechselwirkungen können ebenfalls als Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen bezeichnet werden.^[11]

Im Vergleich zu DNA-Mikroarrays ergeben sich für Peptid-Mikroarrays oder Mikroarrays kleiner Moleküle jedoch zwei Schwierigkeiten. Erstens stellt die große Vielfalt an zu immobilisierenden Substanzen andere Anforderungen an die Oberflächenchemie. Und zweitens erfordern die zum Teil wesentlich geringeren Bindungsstärken der untersuchten Wechselwirkungen andere Messmethoden, vor allem da oft nicht nur das Vorhandensein von Liganden in der Analytlösung nachgewiesen, sondern auch die Bindungsstärke an den Rezeptor bestimmt werden soll. Mit einer einheitlichen Oberflächenchemie müssen sich also möglichst viele, strukturell unterschiedliche Rezeptoren stabil auf einer Oberfläche verankern lassen, ohne dass sich durch die Verankerung etwas an dem für die Wechselwirkung zuständigen Teil des Rezeptors ändert. Die Messung selber muss ohne die bei DNA-Mikroarrays üblichen Waschschriffe möglich sein, zumal die Messung der Bindungsstärke nur möglich ist, wenn die gebundenen Liganden sich im ständigen Austausch mit gelösten Liganden befinden.

In der Sensortechnik sind in den letzten Jahren eine Reihe von Methoden entwickelt worden, um die Bindung chemischer und biologischer Moleküle an oberflächenverankerte Rezeptoren zu untersuchen. Als Beispiel seien hier stellvertretend die reflektometrische Interferenzspektro-

metrie (RfS),^[12-16] die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)^[17-19] und die Abgeschwächte-Totalreflexion-Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR)^[20, 21] genannt. Alle drei Methoden erlauben es, den Bindungsvorgang an die Oberfläche direkt zu verfolgen. Sie nutzen zum Nachweis der Bindung physikalische Eigenschaften der Beschichtung, des Trägermaterials oder der Liganden, die sich bei der Anlagerung von Liganden verändern. Um eindeutige Messsignale zu erhalten, sind diese Methoden jedoch meist auf eine relativ große Oberfläche angewiesen, und lassen sich deswegen nur schwer in einem ähnlichen Ausmaß wie DNA-Mikroarrays miniaturisieren. Im Jahr 2002 präsentierten Wegner et al. erstmals die parallele Messung von Antikörper-Bindungskonstanten im Mikroarrayformat mit SPR.^[22]

Bisherige Miniaturisierungen wie die DNA-Mikroarrays nutzen deswegen Signale, die die Liganden selbst aussenden, vor allem über die Verknüpfung mit Fluoreszenzfarbstoffen.^[23] Sie verzichten jedoch auf die Beobachtung des Bindungsvorgangs. Die Liganden binden in diesen Fällen so fest, dass die Oberfläche im Anschluss an die Bindung ausgiebig gewaschen werden kann und erst im trockenen Zustand die Flecke bestimmt werden, an die Liganden gebunden haben. Selbst winzigste DNA-Mengen auf der Oberfläche ergeben auf diese Weise ausreichend viel Signal. Für die Messung von Bindungskonstanten ergeben sich jedoch zwei Nachteile. Erstens müssen die Liganden durch die Markierung mit einem Farbstoff chemisch verändert werden, so dass sich dadurch das Bindungsverhalten ändern kann. Zweitens ist die Lösung vor allem bei der Messung schwächerer Wechselwirkungen ohne Waschschrift voll von farbstoffmarkierten Liganden. Eine auf Fluoreszenz basierende Messmethode muss in diesem Fall unterscheiden können, ob die Fluoreszenz von gelösten oder von oberflächengebundenen Liganden stammt. Entweder dürfen nur Farbstoffe in Oberflächennähe zur Fluoreszenz angeregt werden oder die Fluoreszenz, die aus der Lösung stammt, muss durch eine geeignete Detektionsmethode ausgeblendet werden. Während die Oberflächenplasmonenfeld-verstärkte Fluoreszenz^[24, 25] ein Beispiel für selektive Anregung darstellt, bietet eine konfokale Optik die Möglichkeit, Fluoreszenz sensitiv an der Oberfläche zu detektieren.^[26]

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen oder zwischen Proteinen und Peptiden zu messen und dafür die Vorteile zu nutzen, die eine oberflächensensitive Detektion von Fluoreszenz bietet. Zu diesem Zweck sollte zuerst ein Herstellungsverfahren für Mikroarrays entwickelt werden, welches die Verankerung eines breiten Spektrums

1 Einleitung und Aufgabenstellung

an Substanzen und eine Optimierung der Mikroarrays hinsichtlich der zu entwickelnden Messmethode erlaubt. Zweitens sollten eine Messmethode und eine Auswerteroutine entwickelt werden, mit der aus den aufgenommenen Fluoreszenzbildern quantitative Aussagen über die Bindungskonstanten der untersuchten Rezeptor-Ligand-Systeme erhalten werden können. Dazu waren aus vielen etablierten Verfahren zur Bestimmung von Bindungskonstanten die geeigneten Komponenten auszuwählen, weiterzuentwickeln und auf die speziellen Anforderungen der konfokalen Fluoreszenzdetektion anzupassen. Und schließlich sollte untersucht werden, ob sich die so entwickelte Kombination aus Mikroarrays und quantitativer Auswertung für Fragestellungen der funktionellen Proteomanalyse anwenden ließ.

Zunächst erläutert deshalb Kapitel 2 die nötigen theoretischen Grundlagen zur Fluoreszenzmikroskopie und zur Messung von Bindungskonstanten. Darüber hinaus informiert es über die eingesetzten Rezeptor-Ligand-Systeme und die Grundlagen der Oberflächenchemie, die zum Einsatz kam. Kapitel 3 beschreibt dann, wie die Oberflächenchemie variiert wurde, um mit dem Fluoreszenzmikroskop optimale Aufnahmen für die in Kapitel 4 entwickelte Messmethode zu erhalten. Kapitel 4 führt neben der erwähnten Messmethode mehrere Anwendungen auf, für die sich die nach dem Protokoll des Kapitels 3 hergestellten Mikroarrays einsetzen lassen. Kapitel 5 schließlich fasst die erreichten Ergebnisse zusammen und bietet damit einen Ausblick, inwieweit diese Art der Mikroarrayherstellung und -untersuchung dazu beitragen kann, Biomoleküle und biologische Prozesse in der anfangs genannten Weise zu systematisieren.

2 Theorie zur Fluoreszenzmikroskopie mit Rezeptor-Ligand-Arrays

2.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Lumineszenz ist die Emission von Licht aus elektronisch angeregten Zuständen beliebiger Substanzen.^[27] Je nach Art des angeregten Zustands wird die Lumineszenz in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilt. Bei der Fluoreszenz findet die Lichtemission aus angeregten Singulettzuständen heraus statt. In einem Singulettzustand ist der Spin des in ein höheres Orbital angeregten Elektrons dem Spin des im Grundzustandsorbital verbleibenden, zweiten Elektrons entgegengesetzt. Dementsprechend ist die Rückkehr in den Grundzustand quantenmechanisch erlaubt und geht unter Emission eines Photons sehr schnell vonstatten. Die typische Fluoreszenzlebensdauer liegt im Nanosekundenbereich. So können Fluoreszenzfarbstoffe selbst in einem kurzen Beobachtungszeitraum mehrfach zur Emission angeregt werden. Im Gegensatz dazu findet bei der Phosphoreszenz die Lichtemission aus angeregten Triplettzuständen heraus statt. Aufgrund gleicher Spinausrichtung der Elektronen ist in diesem Fall der Übergang in den Grundzustand verboten und die typische Phosphoreszenzlebensdauer liegt im Bereich von Millisekunden bis Sekunden. Den Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und -emission für Fluoreszenz und Phosphoreszenz veranschaulicht das Jabłoński-Termschema (Abbildung 2.1). Die Lage der Energieniveaus, die für jede Substanz charakteristisch ist, bedingt das charakteristische Absorptionsspektrum der Substanzen. Der große Wellenlängenbereich des Absorptionsspektrums gelöster Substanzen resultiert aus den vielen möglichen, unterschiedlichen Energiedifferenzen, die bei der Anregung aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in die verschiedenen Schwingungsniveaus ν_n des angeregten Zustands S_1 auftreten können. Nach strahlungslosen Desakti-

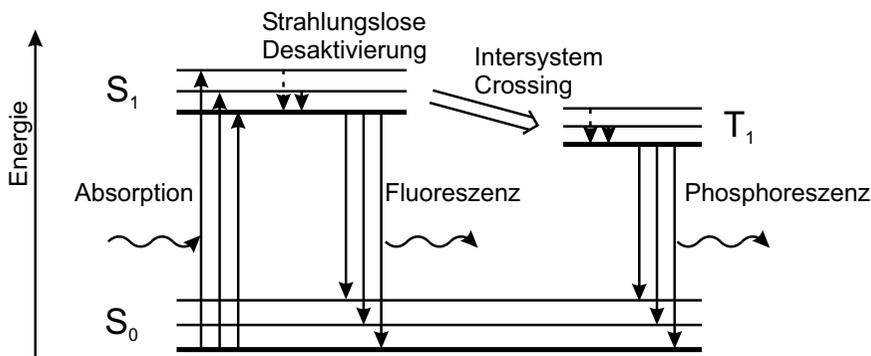


Abbildung 2.1: Jabłoński-Termschema.

vierungsvorgängen erfolgt die Emission in die verschiedenen Schwingungsniveaus ν_n des Grundzustandes mit sich anschließenden, strahlungslosen Desaktivierungsvorgängen. Auf diese Weise sind die Energiedifferenzen bei der Emission kleiner, so dass Licht geringerer Energie freigesetzt wird. Die vielen, energetisch leicht verschiedenen Schwingungsniveaus erklären, warum sich für die Emission ebenfalls ein Spektrum ergibt. Wegen der geringeren Energiedifferenzen ist das Emissionsspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben. Diese Verschiebung zwischen den Wellenlängen der Absorption und denen der Emission wird in der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie ausgenutzt, um das Anregungslicht auszublenden und selektiv das von der Probe ausgestrahlte Fluoreszenzlicht zu detektieren.

Für die Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen ergibt sich daraus, dass sie mit ihren spektralen Eigenschaften, insbesondere mit der oben erwähnten Wellenlängenverschiebung auf die Bauteile des Fluoreszenzmikroskops abgestimmt sein müssen. Weitere Kriterien für die Auswahl geeigneter Fluorophore sind u.a. die Fluoreszenzlebenszeit, die Quantenausbeute und die Stabilität gegenüber der Bleichung durch das Anregungslicht. Je nach Anwendung müssen neben den spektralen Eigenschaften aber auch andere stoffliche Eigenschaften berücksichtigt werden. Fluoreszenzfarbstoffe sind typischerweise aromatische Verbindungen. Zur Veränderung der spektralen Eigenschaften enthalten diese elektronenziehende und -schiebende Substituenten. So stehen über das große Spektrum an Substituenten zahlreiche

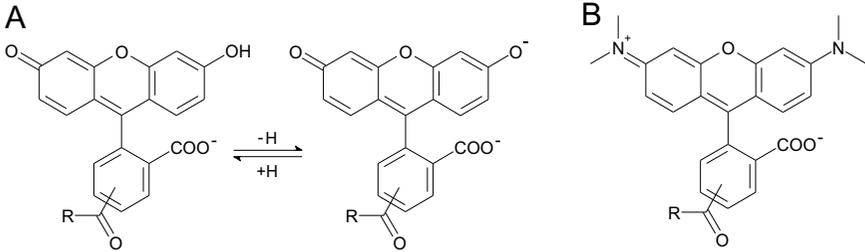


Abbildung 2.2: Strukturformeln der eingesetzten Fluorophore. (A) pH-Wert-abhängiges Gleichgewicht von 5(6)-Carboxyfluorescein. (B) 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin.

Fluorophore zur Auswahl, die beispielsweise unterschiedliche Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen, unterschiedliche Ladungen tragen oder eine Abhängigkeit der Wellenlängenverschiebung vom pH-Wert aufweisen. Ist eine Anbindung an zu markierende Moleküle gewünscht, müssen die Fluorophore zusätzlich noch funktionelle Gruppen enthalten, die diese Anbindung erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluorescein und Tetramethylrhodamin (Abbildung 2.2) für die fluoreszente Markierung von Peptidliganden ausgewählt. Weil die fluoreszenten Peptide komplett an der festen Phase synthetisiert werden sollten, mussten die Farbstoffe im Überschuss eingesetzt werden, so dass in diesem Fall die Verfügbarkeit einen weiteren Faktor darstellte. Trotz vieler Nachteile zählt Fluorescein nicht zuletzt wegen des geringen Preises zu den häufig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen.^[28, 29] In wässrigen Lösungen ist die Lage des Absorptionsmaximums vom pH-Wert abhängig. In schwach saurer Lösung liegt hauptsächlich die protonierte Form mit einem Absorptionsmaximum bei 435 nm und einer geringen Quantenausbeute vor. In neutraler bzw. alkalischer Lösung liegt das Anion mit einem Absorptionsmaximum bei 492 nm und einer hohen Quantenausbeute von 0,9 vor.^[30] Da der angeregte Zustand der protonierten Form instabil ist und sofort dissoziiert, findet die Fluoreszenzemission auch in saurer Lösung nur aus dem angeregten Zustand des Anions statt, so dass das Emissionsmaximum unabhängig vom pH-Wert bei einer Wellenlänge von ca. 520 nm liegt. Der zweite eingesetzte Farbstoff, Tetramethylrhodamin, liegt im Gegensatz zu Fluorescein zwitterionisch vor. Sein Absorptionsspektrum

ist im physiologischen Bereich näherungsweise nicht pH-abhängig.^[28] Bei pH 7,0 liegt das Absorptionsmaximum bei 553 nm, das Emissionsmaximum bei 576 nm.

Diese Farbstoffe könnten über reaktive funktionelle Gruppen auch zur Markierung von Proteinen eingesetzt werden. Vorteilhafter ist es jedoch in vielen Fällen, wenn die Proteine von Zellen bereits fluoreszent markiert hergestellt werden.^[31] Dazu wird die Gensequenz für das zu untersuchende Protein mit der Gensequenz eines weiteren Proteins fusioniert, bei dem sich nach der Faltung spontan ein Fluorophor bildet. Der prominenteste Vertreter ist GFP, das Grün Fluoreszierende Protein, das in der Qualle *Aequoria victoria* im Nordwestpazifik gefunden wurde. Es bildet eine fassartige Struktur aus, in deren Mitte drei Aminosäurereste zum eigentlichen Fluorophor reagieren.^[32] Durch genetische Veränderung des GFP sind über die Jahre eine Vielfalt an fluoreszierenden Proteinen entstanden, die nun verschiedene photophysikalische und chemische Eigenschaften abdecken. Sie unterscheiden sich beispielsweise in ihren spektralen Eigenschaften oder in ihrer pH- oder Ionensensitivität. In dieser Arbeit kam ein YFP, ein Gelb Fluoreszierendes Protein zum Einsatz, dessen Absorptionsmaximum bei 513 nm und dessen Emissionsmaximum bei 527 nm liegt.^[33]

2.2 Konfokale Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie interessiert sich für die Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen in den Proben bzw. für die Verteilung der Moleküle, die mit den Farbstoffen markiert sind. Sie unterliegt prinzipiell den gleichen optischen Gesetzen wie die Durchlichtmikroskopie und erreicht wie diese keine Auflösung auf molekularer Ebene. Da die zu untersuchenden Moleküle jedoch Fluoreszenzlicht aussenden, ist die Fluoreszenzmikroskopie im Gegensatz zur Durchlichtmikroskopie nicht auf einen Kontrast durch Lichtabsorption angewiesen. Es werden keine größeren Farbstoffmengen vorausgesetzt, um eine nennenswerte Lichtabschwächung zu beobachten. Fluoreszenzmikroskopie ist bei ausreichender Empfindlichkeit in der Lage, selbst die Position einzelner Moleküle aufgrund der ausgesandten Strahlung festzumachen. Die laterale Auflösung der Positionsbestimmung wird allerdings wie beim Durchlichtmikroskop durch die Wahl der Objektive über deren numerische Apertur beeinflusst.

Ein konventionelles Epifluoreszenzmikroskop unterscheidet sich nur we-

nig von einem Durchlichtmikroskop.^[34] Der Strahlengang vom Objekt zum Beobachter ist beispielsweise derselbe. Unterschiede bestehen jedoch in der Ausleuchtung der Probe. Während bei Durchlichtmikroskopen die Probe von der dem Objektiv entgegengesetzten Seite beleuchtet wird, geschieht dies bei einem epifluoreszenten Mikroskop von der Seite des Objektivs. Da die zur Fluoreszenz angeregten Moleküle in der Summe in alle Richtungen gleichmäßig Licht abstrahlen, strahlt ein Teil des Lichtes wieder zum Objektiv zurück und kann dort detektiert werden. Diese Bauweise reduziert gleichzeitig den durch das eingestrahelte Licht erzeugten Hintergrund sowie die zur Ausleuchtung und Detektion benötigte Optik, erfordert jedoch eine Aufteilung des Anregungs- und des Emissionsstrahlengangs. Über einen Farbteiler, einen dichroitischen Spiegel, wird das Licht der Anregungswellenlänge in das Objektiv reflektiert, während zurückgestrahltes Licht der Emissionswellenlänge diesen passiert und zur Detektionseinheit weitergeleitet wird. Um einzelne Farbstoffe spezifisch zu untersuchen, müssen demzufolge der Farbteiler und zusätzliche Farbfilter im vorausgehenden bzw. nachfolgenden Strahlengang auf die spezifischen Wellenlängen des jeweiligen Farbstoffes abgestimmt sein. Fluoreszenzmikroskope, die für mehrere Farbstoffe geeignet sind, enthalten deswegen mehrere Sätze an Spiegeln und Filtern, die entsprechend den zu untersuchenden Farbstoffen ausgewählt werden können.

Beim konventionellen Epifluoreszenzmikroskop dient in der Regel eine Quecksilberdampfampe als Lichtquelle, aus deren breiten Spektrum Filter den gewünschten Wellenlängenbereich für die Anregung auswählen. Mit dieser Lampe wird der gesamte, im Objektiv sichtbare Bereich des Objekts ausgeleuchtet. Sie eignet sich für flache Objekte oder dünne Schichten. Bei dickeren Objekten wird durch Fluoreszenz aus dem Volumen ober- und unterhalb der Fokusebene der Kontrast in der Fokusebene verringert. Diesen Nachteil umgeht ein konfokales Mikroskop.^[26] Es unterdrückt die Detektion von Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene und erreicht somit eine höhere axiale Auflösung. Das Prinzip eines konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Die Unterdrückung der störenden Fluoreszenz geschieht zum einen über eine Lochblende im Detektionsstrahlengang und zum anderen über eine punktförmige Beleuchtung. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird im Detektionsstrahlengang erneut gebündelt. Weil das Fluoreszenzlicht aus verschiedenen Ebenen stammt, liegen auch die Brennpunkte dieser erneuten Bündelung in verschiedenen Ebenen. Genau in der Ebene, die der Fokusebene des Objekts entspricht, d.h. der zur Objektebene konfo-

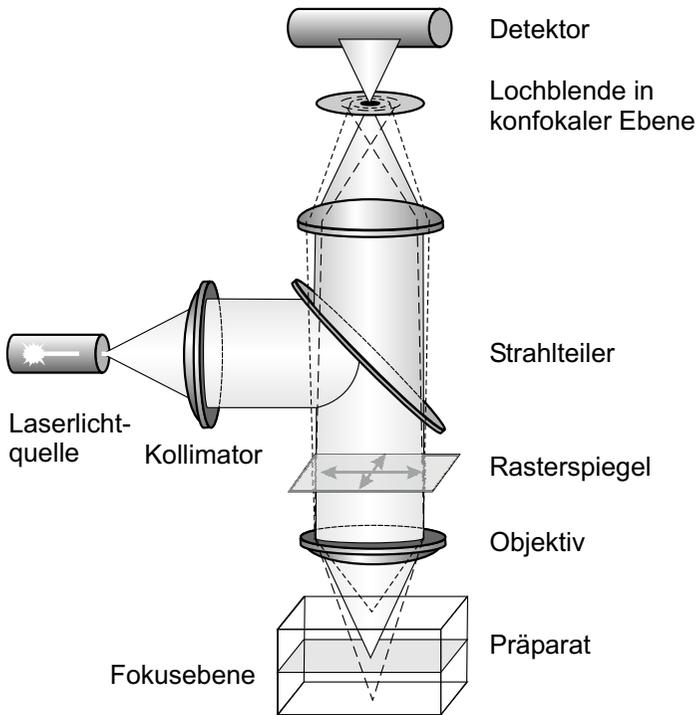


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips.

kalen Ebene, befindet sich die Lochblende. Diese lässt nur Licht durch, das von Fluorophoren emittiert wird, die in der Fokusebene angeregt werden, während das Licht der Fluorophore ober- und unterhalb der Fokusebene zum größten Teil ausgeblendet wird.

Diese Methode kann jedoch nicht mehr das gesamte Objekt gleichzeitig betrachten sondern nur noch einen einzigen Punkt. Um dennoch ein Bild der gesamten Probe zu erhalten, muss diese nun Punkt für Punkt abgerastert werden. Die Empfindlichkeit der Detektion kann somit weiter erhöht werden, wenn nur die Farbstoffe im jeweils betrachteten Punkt zur Fluoreszenz angeregt werden. Eine mögliche Realisierung stellt das in dieser Arbeit verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskop dar. Hier dient ein Laser als Lichtquelle für die Anregung. Über bewegliche Rasterspiegel wird

das Laserlicht der Reihe nach auf die gesamte Probe gelenkt. Das emittierte Licht passiert auf dem Rückweg dieselbe Ausrichtung des Rasterspiegels und gelangt somit immer zentriert auf die Lochblende und durch diese auf einen Photomultiplier. Dieser detektiert die auftreffenden Photonen ohne jegliche spektrale Information. Unter Berechnung der Spiegelbewegung wird im Computer Pixel für Pixel das Bild nach den Hell-Dunkel-Werten des Photomultipliers erzeugt. Aufgrund der zwischengeschalteten Farbfilter kann diesem Hell-Dunkel-Bild ein bestimmter Wellenlängenbereich und somit ein bestimmter Ausschnitt der Farbskala zugeordnet werden.

Die konfokale Mikroskopie ist die effizienteste Methode, um ein Objekt in optische Schnitte zu zerlegen und so die Verteilung der Fluoreszenz in zweidimensionalen Ebenen einer dreidimensionalen, fluoreszenten Probe zu erhalten. Für den Aufbau des Mikroskops gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten. Die häufigste Variante für konventionelle Durchlichtmikroskope ist die aufrechte Anordnung, bei der das Objekt von unten beleuchtet und mit den Objektiven von oben betrachtet wird. Die umgekehrte Anordnung wird dementsprechend als inverser Aufbau bezeichnet. Für das in dieser Arbeit verwandte Laser-Scanning-Mikroskop mit inversem Aufbau bedeutet das, dass die Objektive unterhalb der Probe angebracht waren und die Fluoreszenz von unten angeregt und detektiert wurde. Da der optimale Strahlengang in Objektiven darauf ausgelegt ist, dass sich zwischen den Objektiven und der Probe ein Deckgläschen befindet, bietet der inverse Aufbau eines Mikroskops also die Möglichkeit, bei einer geeigneten Halterung für Deckgläschen auf den Objektträger zu verzichten. Die zu untersuchenden Rezeptor-Ligand-Systeme befinden sich auf der Oberseite des Deckgläschens und sind so während der gesamten Messung frei zugänglich. Es kann jederzeit Lösung zugegeben und entnommen werden.

2.3 Mikroarrays auf Glasoberflächen

Ein Array ist laut Definition eine Anordnung von Elementen in einer oder mehreren Dimensionen. Die häufigste Umsetzung in der Biotechnologie besteht aus einer zweidimensionalen Anordnung von Substanzen auf einer festen Trägersubstanz. Wird der Array durch Pipettieren der zu verankernden Substanzen hergestellt, entsteht ein Muster aus runden Flächen, die durch die Tropfen der Substanzlösungen auf der Oberfläche entstehen. In miniaturisierter Form, d.h. wenn die Substanzflecken eine Dichte von mehr als

200 Flecken pro cm^2 erreichen, werden solche Arrays als Mikroarrays bezeichnet.^[5] Es gibt zwei prinzipiell unterschiedliche Methoden, Mikroarrays herzustellen. Entweder erfolgt die Synthese mit den Methoden der Festphasensynthese auf der Oberfläche selber^[35,36] oder fertig synthetisierte Substanzen werden in einem Schritt auf die Trägersubstanz gebracht.^[37-39] Die zweite Methode wird mit Hilfe verschiedener Techniken realisiert wie beispielsweise mit Stempeltechniken,^[40] mit der Ink-Jet-Technologie^[41] oder mit Nanopipettier-Techniken.^[42]

In dieser Arbeit wurde ein Pipettierroboter zur Herstellung von Mikroarrays eingesetzt. Mit dem Pipettierroboter sollten die fertig synthetisierten und vollständig charakterisierten Substanzen in einem einzigen Nanopipettierschritt auf der Oberfläche verankert werden. Dies stellt verschiedene Anforderungen an die Oberflächenchemie. Die Oberfläche muss so vorbehandelt sein, dass die funktionellen Gruppen der zu immobilisierenden Substanzen und der Oberfläche zu einander komplementär sind. Falls eine kovalente Anbindung erforderlich ist, muss darüber hinaus einer der beiden Reaktionspartner ausreichend reaktiv sein, damit eine Bindung ausgebildet wird. Bevor Tausende von Substanzen mit einer reaktiven, funktionellen Gruppe ausgestattet werden, die zudem noch den Pipettierschritt und eine eventuell längere Lagerung unbeschadet überstehen müssen, ist eine einheitlich voraktivierte Oberfläche die einfachere Variante. Allerdings reagiert bei der Mikrostrukturierung nur der Teil der Oberfläche ab, der von den Tropfen mit den gelösten Substanzen bedeckt war. Der andere Teil behält seine Reaktivität und könnte bei der späteren Anwendung stören. Die Oberfläche muss also so aktiviert sein, dass die restliche Oberfläche nach Anbindung der Substanzen ausreichend passiv in Bezug auf die Anforderungen der beabsichtigten Anwendung ist. Oder sie muss nach der Anbindung reaktiv genug sein, um in weiteren Reaktionsschritten die gewünschte Passivierung einzuführen. Darüber hinaus muss für die zu immobilisierenden Substanzen ein Lösungsmittel gefunden werden, das auf der reaktiven Oberfläche nicht verläuft und stabile Tropfen bildet, andererseits aber alle Substanzen in der gewünschten Konzentration zu lösen vermag. Die Apparatur des Pipettierroboters setzt in Bezug auf die verwendbaren Lösungsmitteln unter Umständen weitere Grenzen. Die angewandte Oberflächenchemie muss so reaktiv sein, dass die durch den Pipettierroboter bedingte Verweildauer der Tropfen auf der Oberfläche für die Ausbildung von kovalenten Bindungen ausreicht. Werden kleinste Tropfen pipettiert, trocknen diese innerhalb relativ kurzer Zeit ein. Wenn der Pipettierroboter jedoch ein Pipettieren in

einer Atmosphäre mit einer hohen Konzentration an Lösungsmitteldampf erlaubt, kann das Eintropfen verlangsamt werden und die Zeit, die für die Anbindung zur Verfügung steht, erhöht sich.

Die Wahl des Trägermaterials wird durch die Untersuchungsmethode bestimmt. SPR ist beispielsweise auf metallische oder metallisch beschichtete Träger angewiesen, während die Mikroskopie transparente Träger wie z.B. Glas erfordert.^[12] Diese Träger werden in einem oder mehreren Schritten so an ihren Oberflächen modifiziert, dass sie eine stabile Verankerung der gewünschten Substanzen ermöglichen. Die Reaktionsfähigkeit der SiO_2 -Oberfläche von Glaträgern ist stark von der Vorgeschichte des Materials beeinflusst. Abhängig von Produktionsprozess und Lagerung liegen an der Oberfläche beispielsweise Siloxanbindungen anstelle der für eine Silanisierung benötigten Silanolgruppen vor.^[43] Wichtig ist deshalb eine Vorbehandlung des Trägermaterials mit Basen und Säuren, um die Oberfläche von Verunreinigungen zu befreien und die Benetzbarkeit zu verbessern. Zusätzlich wird die Oberfläche angegriffen und es entstehen neue Silanolgruppen, so dass eine höhere Belegung erreicht werden kann. Frisch gereinigtes Glas kann eine Silanolgruppendichte von bis zu $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ aufweisen.^[44]

Auf Glaträgern beginnt die Modifikation meist mit einer Silanisierung, also der Reaktion zwischen den Silanolgruppen der Glasoberfläche und einem Organosilan, das hydrolysierbare funktionelle Gruppen wie Chlor- oder Alkoxy-Gruppen trägt. Organosilane können als Hybridverbindungen verstanden werden, die zwischen anorganischen und organischen Substanzen vermitteln können.^[45] Die Art und Funktionalität des Silans haben einen großen Einfluss auf die Struktur der Beschichtung. Die Modifizierung der Oberfläche mit Monoalkoxy- oder Monochlorsilanen führt zu Monoschichten, während Silane mit mehreren hydrolysierbaren funktionellen Gruppen zu quervernetzten Oberflächenbeschichtungen führen können. Eine sterische Hinderung der Alkylreste kann aber auch bei diesen Silanen eine Quervernetzung unterbinden.^[46]

Für den Bindungsmechanismus (Abbildung 2.4) der Silane wird angenommen, dass vor der eigentlichen Reaktion eine Hydrolyse des Silans stattfindet. Bei Einsatz von gelösten Silanen werden deshalb Lösungsmittel mit einem geringen, definierten Wasseranteil verwandt, um für die Hydrolyse genau den gewünschten Wasseranteil zur Verfügung zu stellen.^[47] Die Oberflächen tragen allerdings je nach Luftfeuchtigkeit bereits einen angelagerten Wasserfilm, der das zur Hydrolyse benötigte Wasser direkt auf der Oberfläche bereitstellt.^[48] Häufig wird deswegen auf den Einsatz von Lösungs-

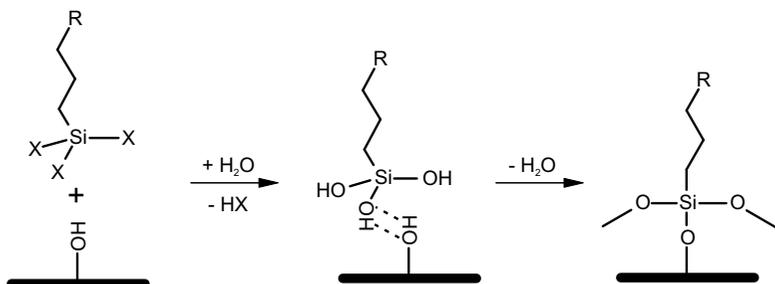


Abbildung 2.4: Reaktionsschema zur Beschichtung von Glasoberflächen mit Silanen.

mitteln verzichtet und das Silan in reiner Form verwandt.^[49] Im Anschluss an die Hydrolyse erfolgt die Kondensation der durch H-Brücken gebundenen Silane. Um sicherzustellen, dass alle möglichen Siloxanbindungen an die Oberfläche tatsächlich ausgebildet werden, arbeiten manche Autoren besonders bei Alkoxysilanen mit erhöhter Temperatur.^[50-52] Stabile Beschichtungen wurden aber auch ohne ein Arbeiten bei erhöhter Temperatur erhalten.^[49, 53] Die auf diese Weise eingebrachten funktionellen organischen Gruppen können in weiteren Reaktionsschritten zur endgültigen Belegung umgesetzt werden.

Die Auswahl der Silane wird durch die Art und Weise bestimmt, mit der die Substanzen des Mikroarrays auf der Oberfläche verankert werden sollen. Zur Verankerung ist jede Form geeignet, die stabile Wechselwirkungen liefert. Das Spektrum reicht von hydrophoben Wechselwirkungen wie in biologischen Membranen^[54] über starke, nicht-kovalente Wechselwirkungen wie zwischen Biotin und Streptavidin^[55] bis hin zu kovalenten Bindungen.^[36] Sobald die Glasoberfläche über die Silane mit funktionellen organischen Gruppen belegt ist, kann jede weitere Modifikation mit Methoden der organischen Chemie erfolgen. Dafür werden entweder Silane eingesetzt, die bereits reaktive Gruppen enthalten, oder die zu verankernden Substanzen werden mit ausreichend reaktiven, funktionellen Gruppen versehen. Falls sich auf beiden Seiten keine ausreichend reaktiven Gruppen einsetzen lassen, kann für die Verankerung auf eine breite Palette an bifunktionellen Linkern zurückgegriffen werden.^[56]

In dieser Arbeit wurde 3-Glycidioxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) für die Silanisierung eingesetzt. Für GOPTS wurde gezeigt, dass es in reiner

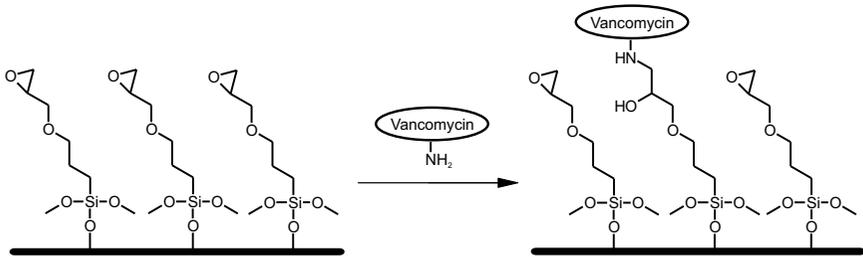


Abbildung 2.5: Reaktion einer Epoxy-Oberfläche mit einem Amin, in diesem Fall Vancomycin.

Form bei Raumtemperatur angewandt werden kann^[49, 57] und dass GOPTS, obwohl es ein Trialkoxysilan ist, stabile Monolagen ergibt.^[47, 50] Durch den Einsatz von GOPTS wird die Glasoberfläche mit Epoxygruppen belegt, die direkt mit einer Reihe von Nucleophilen reagieren. Darüber hinaus kann die Reaktivität der Epoxygruppen gegenüber unterschiedlichen Nucleophilen durch den pH gesteuert werden.^[56] Bei neutralem oder leicht saurem pH reagieren Epoxygruppen mit Thiolen und Aminen, während sie gegenüber Wasser stabil sind. Aus diesem Grund sollten Amine und Thiole, die aus wässrigen Lösungen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aufgetropft werden, auf der von den Tropfen benetzten Oberfläche an die Epoxygruppen anbinden, während die Reaktivität der Epoxygruppen auf der restlichen Oberfläche für weitere Modifizierungen erhalten bleibt (Abbildung 2.5, siehe auch Kapitel 3).

Der Bedarf nach einer weiteren Modifizierung der den Array umgebenden Oberfläche entsteht aus den möglichen Anforderungen einer späteren Anwendung. Wenn auf diesen Arrays beispielsweise lebende Zellen auf ihre Reaktion gegenüber den immobilisierten Substanzen getestet werden sollen, so muss die Beschichtung außerhalb der einzelnen Elemente des Arrays das Wachstum von Zellen verhindern. Für diesen Zweck eignet sich besonders Polyethylenglycol (PEG), das durch den effektiven Ausschluss anderer Polymere in wässriger Umgebung sehr geringe Wechselwirkungen mit Proteinen zeigt^[58–61] und damit eine effektive Abschirmung der Oberfläche gegenüber Zellwachstum erlaubt.^[62–66] Für die Anbindung auf epoxyfunktionalisierten Oberflächen können beispielsweise PEG-Verbindungen eingesetzt werden, die endständige Aminogruppe besitzen (Abbildung 2.6).^[67]

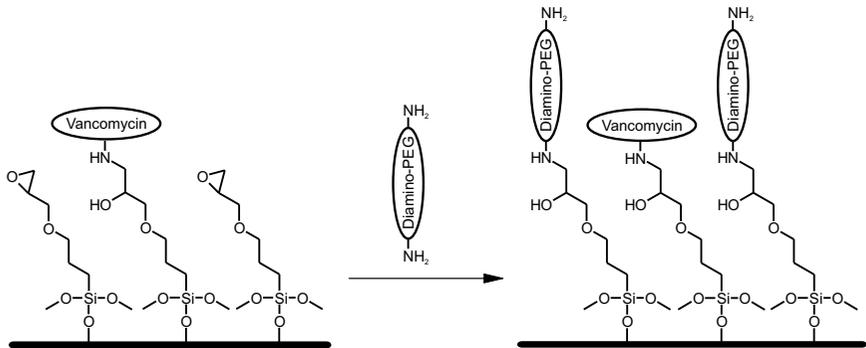


Abbildung 2.6: Absättigung der Epoxy-Oberfläche mit Diamino-PEG.

2.4 Rezeptoren und Liganden

Zur Herstellung von Mikroarrays können entweder die potenziellen Rezeptoren oder die Liganden auf der Oberfläche verankert werden. Die jeweiligen Bindungspartner – Liganden oder Rezeptoren – werden für die Messung dann in Lösung auf den Mikroarray gegeben. In dieser Arbeit kamen als Modellrezeptoren Vancomycin und ZAP-70 zum Einsatz, die beide spezifisch an bestimmte Peptidsequenzen binden.

2.4.1 Das Modellsystem Vancomycin

Vancomycin ist als wichtiges Antibiotikum Gegenstand intensiver Forschung. Es wurde erstmals Mitte der 50er Jahre aus einer Bodenprobe isoliert und wird vom Mikroorganismus *Amycolatopsis orientalis* gebildet.^[68] Die Struktur von Vancomycin wurde bis 1982 aufgeklärt und als zyklisches Glycopeptid identifiziert (Abbildung 2.7). Bis heute sind die Strukturen von über hundert Glycopeptidantibiotika aufgeklärt. Zwei Verbindungen dieser Gruppe befinden sich heute in der klinischen Anwendung, Vancomycin und Teicoplanin. Zusammen mit Gentamycin bilden sie in den Krankenhäusern gegenwärtig die letzte Widerstandslinie gegen Bakterien wie *Staphylococcus aureus*.

Vancomycin besteht aus einer Kette von sieben, teils nicht proteinogenen Aminosäuren, deren Seitenketten zu insgesamt drei Ringen vernetzt sind. Über eine Seitenkette sind zwei Zuckereinheiten ankondensiert. Die Biosyn-

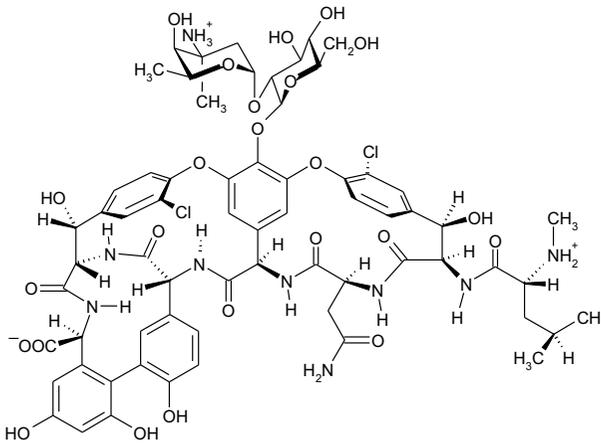


Abbildung 2.7: Strukturformeln von Vancomycin.

these ist über Knock-out-Mutanten aufgeklärt worden.^[69–72] Die *Amycolatopsis-orientalis*-Bakterien synthetisieren zuerst das lineare Heptapeptid. Danach werden der Reihe nach die Ringe zwischen den Resten 4–6, dann 2–4 und 5–7 geschlossen. Zum Schluss erfolgt die Glycosylierung am überbrückten Peptidgerüst.

Die Wirkung von Vancomycin als Antibiotikum beruht darauf, dass es an ein Zwischenprodukt der bakteriellen Zellwandsynthese bindet.^[73] Dieses als Mucopeptidvorstufe bezeichnete Peptid endet mit der Sequenz L-Lys-D-Ala-D-Ala und dient der Vernetzung mit benachbarten Peptidketten über seine Lysinseitenketten. Abbildung 2.8 A zeigt das Bindungsmodell mit gedehnten Wasserstoffbrückenbindungen, so wie es über Kernspinresonanz und Röntgenkristallographie ermittelt wurde. Für diese Bindung wurden mehrere Bindungskonstanten veröffentlicht (siehe auch Abschnitt 4.3), die mit verschiedenen Messmethoden bestimmt wurden.^[74–79] In Lösung beträgt die Dissoziationskonstante bei Raumtemperatur ungefähr 10^6 M^{-1} . Drei Effekte tragen zu dieser Affinität bei: erstens die Bindung des Carboxylatanions des C-terminalen D-Alaninrestes an drei Amid-NH-Gruppen, zweitens die Bildung zweier Amid-Amid-Wasserstoffbrückenbindungen und drittens die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alanin-Methylgruppen und Kohlenwasserstoffabschnitten des Vancomycins. Die Konfor-

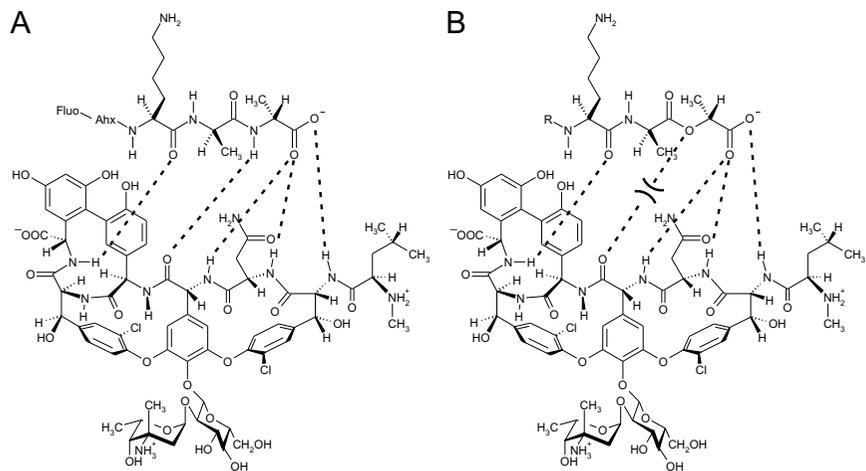


Abbildung 2.8: Wasserstoffbrückenbindungen bei der Wechselwirkung von Vancomycin mit (A) R-D-Ala-D-Ala und (B) R-D-Ala-D-Lactat.

mation der Vancomycin-Bindungstasche sorgt dafür, dass diese hohe Affinität nur für zwei C-terminale D-Alanine und nicht für Peptide mit den entsprechenden L-Enantiomeren erreicht wird. Die Bindung wird noch verstärkt, wenn zwei Vancomycine über das Peptidrückgrat dimerisieren können.^[68]

Inzwischen sind vancomycinresistente Bakterienstämme entstanden. Diese entziehen sich der Bindung von Vancomycin, indem die Vorstufen für die Zellwand nicht mehr auf D-Ala-D-Ala sondern auf D-Ala-D-Lactat enden. Die Carbonylgruppe des Vancomycins, die sonst eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer NH-Gruppe des Liganden ausbildet, wird stattdessen vom Sauerstoff des D-Lactats abgestoßen (Abbildung 2.8 B), wodurch die Bindung um den Faktor 1000 herabgesetzt wird.^[80]

Dieses Beispiel verdeutlicht, wie stark kleinste Änderungen im Bindungsbereich die Bindung beeinflussen können. Das N-terminale Ende des Liganden und die Lysinseitenkette liegen jedoch außerhalb der Bindungstasche. An diesen zwei Aminogruppen kann das Peptid verlängert und beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen werden, ohne dass der Bindungsbereich beeinträchtigt wird. Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass die

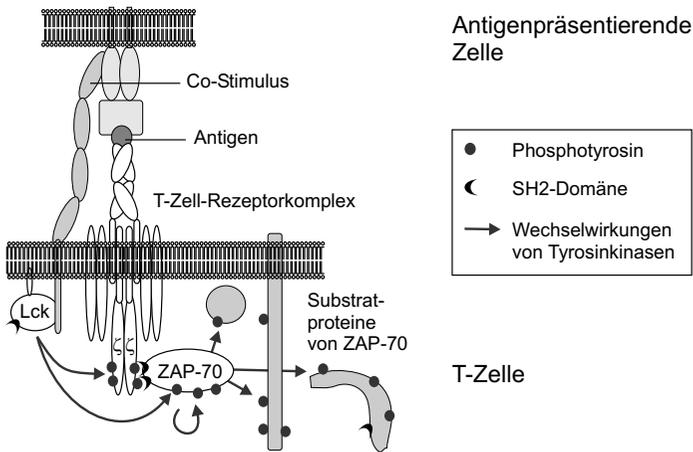


Abbildung 2.9: Schema der Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und ZAP-70.

damit eingeführten, zusätzlichen funktionellen Gruppen weitere Wechselwirkungen außerhalb der Bindungstasche ausbilden.

2.4.2 ZAP-70 in der Signaltransduktion von T-Zellen

Im Immunsystem haben T-Zellen die Aufgabe, infizierte oder veränderte Zellen zu finden. Erkennt eine T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor ein Antigen, wird ein Signal in den Zellkern geleitet, um über eine Änderung der Genexpression die T-Zell-Antwort zu regulieren. Die Signalweiterleitung geschieht über eine Reihe von Protein-Protein-Wechselwirkungen und enzymatischen Reaktionen. Eines der beteiligten Proteine ist ZAP-70. Sein Name (ζ -Kette-assoziiertes Protein) beinhaltet, dass es an die ζ -Kette des T-Zell-Rezeptors bindet, sobald dieser aktiviert ist.^[81] Durch diese Bindung wird ZAP-70 selber aktiviert, so dass es nun spezifisch Tyrosinreste seiner Zielproteine mit Phosphat verknüpfen kann und so wiederum die Zielproteine aktiviert (Abbildung 2.9). Aufgrund seiner Funktion, Proteine zu phosphorylieren, zählt es zur Familie der Proteinkinasen.

Für die Bindung des ZAP-70 an den T-Zell-Rezeptor sind zwei sogenannte SH2-Domänen in der aminoterminalen Hälfte des Proteins verantwortlich. SH2-Domänen binden jeweils spezifisch an einen phosphorylierten Tyro-

sinrest anderer Proteine oder Peptide. Wenn ein Protein oder Peptid zwei dieser Phosphotyrosine in einem geeigneten Abstand zueinander besitzt, können beide SH2-Domänen gleichzeitig binden und die Bindung wird verstärkt. Zusätzlich zum Abstand der Phosphotyrosine spielt die dazwischen liegende Peptidsequenz eine Rolle für die Stärke der Bindung.^[82] ZAP-70 bindet auf diese Weise hochspezifisch an die tyrosinbasierten Aktivierungsmotive von Immunorezeptoren (ITAM). Eines dieser ITAMs der ζ -Kette von T-Zell-Rezeptoren ist die Peptidsequenz NQL p YNELNLGRREE p YDVL. Sobald der T-Zell-Rezeptor an ein Antigen bindet, werden die zwei Tyrosine dieser Sequenz von der Tyrosinkinase Lck phosphoryliert und ZAP-70 kann binden.

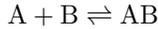
Es wird angenommen, dass in Zellen kontinuierlich Tyrosine durch Kinasen phosphoryliert und durch deren Gegenspieler, die Phosphotyrosinphosphatasen wieder dephosphoryliert werden.^[83] Auf diese Weise herrscht ein Gleichgewicht in der Zelle. Es liegt immer ein gewisser, wenn auch geringer Prozentsatz an phosphorylierten Tyrosinen vor. Erst durch die Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor wird das Gleichgewicht gestört, der Phosphorylierungsanteil nimmt zu und ZAP-70 bindet. Die Bindung von ZAP-70 an den T-Zell-Rezeptor kann jedoch auch ohne eine spezifische Erkennung des T-Zell-Rezeptors herbeigeführt werden, indem das Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsgleichgewicht anderweitig gestört wird. Häufig wird Pervanadat dazu eingesetzt.^[84] Es inhibiert aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Phosphat-Ion die Phosphatasen. Durch eine Stimulation der Zellen mit Pervanadat werden diese Gegenspieler der Kinasen ausgeschaltet und die Kinasen können die Tyrosinreste dauerhaft phosphorylieren. Über die Pervanadat-Stimulation wird so auch der T-Zell-Rezeptor phosphoryliert. Freies ZAP-70 wird dann durch die Bindung an den Rezeptor dem Zytoplasma entzogen.

2.5 Die Stärke von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

2.5.1 Messung von Bindungskonstanten im Gleichgewicht

In dem in Schema 1 gezeigten, allgemeinen Bindungsgleichgewicht

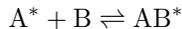
Schema 1



wird die Hinreaktion als Assoziation und die Rückreaktion als Dissoziation bezeichnet. Das Massenwirkungsgesetz definiert dementsprechend eine Assoziationskonstante K_a für die Hinreaktion und für die Rückreaktion, als Kehrwert der Assoziationskonstanten, eine Dissoziationskonstante $K_d = 1/K_a$. Außer über diese Gleichgewichtskonstanten kann die Bindungsstärke auch durch die bei der Bindung frei werdende freie Enthalpie ausgedrückt werden. In dieser Arbeit werden zur Charakterisierung von Bindungsstärken die Dissoziationskonstanten angegeben. Bindungsstärken aus Publikationen, die die Assoziationskonstante angeben, sind zur besseren Vergleichbarkeit in die Dissoziationskonstante umgerechnet worden. Wenn im folgenden weiterhin der Oberbegriff „Bindungskonstante“ verwendet wird, sei darauf hingewiesen, dass dem Ausdruck „größere Bindungskonstante“ für eine höhere Bindungsstärke ein kleinerer Wert der Dissoziationskonstanten entspricht. Wenn A und B in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ vorliegen bilden bei einer Dissoziationskonstanten von $K_d = 10^{-1} \text{M}$ beispielsweise nur 0,1 % der Moleküle einen Komplex. Bei $K_d = 10^{-4} \text{M}$ sind es 38 %, während bei $K_d = 10^{-7} \text{M}$ 97 % als Komplex vorliegen.

Um das Ausmaß der Bindung zwischen A und B zu messen, wird die Konzentrationsänderung des Komplexes AB beobachtet, während die Konzentrationen von A oder B variiert werden. Dazu muss eine physikalische Eigenschaft I gemessen werden, die spezifisch dem Komplex AB zugeordnet werden kann. Die fluoreszente Markierung der Liganden in dieser Arbeit sorgt zwar für einen fluoreszent markierten Komplex, die Fluoreszenz von Ligand und Komplex kann in dieser allgemeinen Form von Schema 1 jedoch zunächst nicht unterschieden werden. Durch die Anbindung des Rezeptors an die Oberfläche wird diese jedoch unterscheidbar (Schema 2):

Schema 2



A entspricht hier einem Rezeptor, beispielsweise Vancomycin, und B entspricht einem fluoreszenten Liganden. Der Asteriskus (*) kennzeichnet die auf der Oberfläche immobilisierten Verbindungen. Eine spezifische Detektion der Fluoreszenz an der Oberfläche erlaubt somit eine spezifische Detekti-

on des Komplexes. Die Fluoreszenz an der Oberfläche kann durch Subtraktion der Ligandenfluoreszenz von der Gesamtfluoreszenz berechnet werden und wird im Folgenden als Nettofluoreszenz bezeichnet.

Wenn die Gesamtkonzentration des Rezeptors A konstant bleibt, nimmt durch eine Zunahme an Ligand B auch der Komplex AB zu. Bei genügend großen Werten von [B] erfährt die gemessene Veränderung im allgemeinen jedoch keine weitere Steigerung mehr, weil A dann fast vollständig zu AB umgesetzt ist. Die Bindung von B an A hat dann die Sättigung erreicht. Bei einer sättigbaren Bindung ergibt sich zwischen der Konzentration des Komplexes [AB] und der Konzentration an freiem Liganden [B] folgende Beziehung:^[85]

$$[\text{AB}] = \frac{[\text{AB}]_{\text{max}} \cdot [\text{B}]}{K_{\text{dAB}} + [\text{B}]} \quad (2.1)$$

Eine Auftragung nach dieser Beziehung von [AB] bzw. der Änderung der zugeordneten Eigenschaft ΔI , in diesem Fall der Nettofluoreszenz, gegen die Konzentration an freiem Ligand [B] wird als Langmuirsche Adsorptionsisotherme bezeichnet, da sie die Bindung nur bei einer konstanten Temperatur beschreibt. Durch eine Kurvenanpassung der auf diese Weise aufgetragenen Messwerte an Gleichung 2.1 kann aus der Messung dann die Bindungskonstante ermittelt werden.

Komplizierter wird die Auswertung, wenn nur die Menge an zugegebenem Ligand B und nicht die nach erfolgter Bindung verbleibende Menge an freiem Ligand bekannt ist. Wenn in großen Volumina gearbeitet wird, kann die Konzentration an freiem Ligand [B] näherungsweise der über die zugegebene Gesamtmenge berechenbaren Konzentration gleichgesetzt werden. Bei kleinen Volumina tritt durch die Bindung an den Rezeptor jedoch eine deutliche Verarmung der Lösung an Ligand auf, so dass für die Konzentration an freiem Ligand [B] ein zu großer Wert angesetzt wird. In diesem Fall muss [B] unter Berücksichtigung des Massenerhalts zu

$$[\text{B}] = [\text{B}_0] - [\text{AB}] \quad (2.2)$$

berechnet werden. Die theoretische Anfangskonzentration vor der Bindung bzw. die theoretische Konzentration der gesamten im System vorhandenen Menge an B wird durch die tiefergestellte 0 indiziert. Wenn Gleichung 2.2 in die Gleichung 2.1 der Langmuirschen Adsorptionsisotherme eingesetzt wird, entsteht eine quadratische Gleichung. Unter der Berücksichtigung, dass die maximal mögliche Konzentration an Komplex $[\text{AB}]_{\text{max}}$ der gesamten im

2.5 Die Stärke von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

System vorhandenen Rezeptorkonzentration $[A_0]$ entspricht, ergibt sich die Lösung der quadratischen Gleichung zu

$$[AB] = \frac{1}{2} \left(D - \sqrt{D^2 - 4[A_0] \cdot [B_0]} \right) \quad (2.3)$$

mit

$$D = [A_0] + K_{d_{AB}} + [B_0] \quad (2.4)$$

Enthält das System zwei Liganden B und C, die um die Bindung an denselben Rezeptor A kompetieren, so müssen zwei Bindungsgleichgewichte berücksichtigt werden, wie sie in Schema 3 für einen immobilisierten Rezeptor gezeigt sind.

Schema 3



Dadurch erscheint in der Beziehung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme im Nenner ein weiterer Term, der um den Einfluss des kompetierenden Liganden korrigiert:^[85]

$$[AB] = \frac{[A_0] \cdot [B]}{K_{d_{AB}} + [B] + \frac{K_{d_{AB}}}{K_{d_{AC}}} [C]} \quad (2.5)$$

Auch hier muss für die Bestimmung der Bindungskonstanten durch die Auswertung der Messwerte mittels Kurvenanpassung berücksichtigt werden, dass die Lösung je nach experimentellem Aufbau an den Liganden verarmt.

2.5.2 Messung von Bindungskonstanten durch Kinetikmessungen

Eine weitere Möglichkeit, Bindungskonstanten zu bestimmen, bietet sich über die Messung kinetischer Größen.^[86] Sind die Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation k_a und Dissoziation k_d bekannt, so kann die Bindungskonstante über die Beziehung $K_d = k_a/k_d$ berechnet werden. Für die Assoziation des Liganden B an den Rezeptor A wird zunächst eine bimolekulare Reaktion zweiter Ordnung angenommen, für die Dissoziation eine monomolekulare Reaktion erster Ordnung. Daraus ergibt sich als Geschwindigkeitsgesetz für die Assoziation die Differenzialgleichung

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (2.6)$$

2 Theorie zur Fluoreszenzmikroskopie mit Rezeptor-Ligand-Arrays

Die Konzentration $[A]$ des immobilisierten Rezeptors kann auch als Konzentration der freien Oberflächenbindungsstellen und $[AB]$ als Konzentration der besetzten Bindungsstellen ausgedrückt werden. Wird für die Konzentration der momentan besetzten Bindungsstellen auf der Oberfläche $\Gamma(t)$ eingesetzt, entspricht Γ_{\max} der maximalen Konzentration $[AB]_{\max}$. Aus Gleichung 2.6 folgt daraus

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot (\Gamma_{\max} - \Gamma(t)) \cdot [B] - k_d \cdot \Gamma(t) \quad (2.7)$$

Bleibt die Konzentration des Liganden B in Oberflächennähe näherungsweise konstant, indem B jederzeit und ausreichend schnell an die Oberfläche nachgeliefert wird, und ändert sich nur die Konzentration der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche, entsteht eine Bindungsreaktion pseudoerster Ordnung und das Geschwindigkeitsgesetz vereinfacht sich zu

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot [B] \cdot \Gamma_{\max} - \underbrace{(k_a \cdot [B] + k_d)}_{k_{obs}} \cdot \Gamma(t) \quad (2.8)$$

Die konstante Ligandkonzentration und die Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation können zur observablen Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} zusammengefasst werden. Die Lösung der Differenzialgleichung ergibt sich damit zu

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (2.9)$$

Γ_{GG} entspricht der Oberflächenkonzentration an Komplexen im Gleichgewicht. Werden die der Konzentration $\Gamma(t)$ zugeordneten Messwerte wie die Nettofluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen, so lässt sich durch Kurvenanpassung mit diesem Geschwindigkeitsgesetz ein Wert für k_{obs} bei einer bestimmten Ligandkonzentration $[B]$ ermitteln. Wird k_{obs} gegen $[B]$ aufgetragen, lassen sich über den Zusammenhang

$$k_{obs} = k_a[B] + k_d \quad (2.10)$$

die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation bestimmen und damit die Bindungskonstante.

2.5.3 Bivalente Bindungen

Große Moleküle besitzen oft mehrere Stellen, die zu Bindungen geeignet sind. Sie können somit zeitgleich mehr als nur ein einziges anderes Molekül binden. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie als multivalent bezeichnet. Auch eine rezeptorbeschichtete Oberfläche kann mit solch einem Makromolekül verglichen werden. Denn durch die Verankerung der einzelnen Rezeptoren auf der Oberfläche entsteht de facto ein großer Rezeptor mit vielen identischen, unabhängigen Bindungsstellen. Für die einzelnen Bindungen zu monovalenten Liganden gelten die in den vorigen Abschnitten aufgestellten Beziehungen. Eine andere Betrachtung ergibt sich, wenn an die rezeptorbeschichtete Oberfläche ein bivalenter Ligand bindet. Formal kann die bivalente Bindung in zwei monovalente Bindungen zerlegt werden, deren Bindungsstärke jeweils der für monovalente Liganden bestimmten Bindungsstärke entspricht.^[87] Dennoch kann daraus nicht ohne weiteres die Bindungsstärke der bivalenten Bindung abgeleitet werden.

Wenn die bivalente Bindung als ein Prozess betrachtet wird, bei dem zuerst die eine und dann die andere, monovalente Bindung geknüpft werden, lassen sich die folgenden zwei Bindungskonstanten formulieren:^[88]

$$K_{d1} = \frac{[A^*][B]}{[AB^*]} \quad K_{d2} = \frac{[A^*][AB^*]}{[A_2B^*]} \quad (2.11)$$

Daraus lässt sich eine allgemeine Beziehung ableiten, die in die Form einer Langmuirschen Adsorptionsisotherme gebracht werden kann:^[88]

$$\Gamma = \frac{\alpha \Gamma_{\max} [B]}{K_{d_{bi}} + [B]} \quad (2.12)$$

mit

$$\alpha = \frac{K_{d2} + [A^*]}{K_{d2} + 2[A^*]} \quad (2.13)$$

und

$$K_{d_{bi}} = \frac{K_{d1} K_{d2}}{K_{d2} + 2[A^*]} \quad (2.14)$$

Der Ausdruck $K_{d_{bi}}$ in Gleichung 2.12 kann als Dissoziationsparameter für die Gesamtbindung interpretiert werden. Er variiert in Abhängigkeit von der Rezeptordichte auf der Oberfläche. Bei einer vorgegebenen Dichte ist $K_{d_{bi}}$ eine Konstante und beeinflusst somit nicht die Form der Langmuirschen Adsorptionsisothermen. Der Parameter α variiert ebenfalls in

Abhängigkeit von der Dichte. Wenn die Rezeptordichte für eine bivalente Anbindung aller Liganden ausreicht, beträgt er 0,5 und steigt auf 1,0 für eine ausschließlich monovalente Bindung. Bei einer konstanten Rezeptordichte kann also durch eine Kurvenanpassung wie in Abschnitt 2.5.1 ein $K_{d_{bi}}$ als Dissoziationskonstante der Gesamtbindung experimentell ermittelt werden. Der für die Rezeptordichte ermittelte Wert weicht jedoch um $1/\alpha$ von der tatsächlichen Rezeptordichte ab. Wenn die Rezeptordichte und die Bindungskonstante K_{d1} der monovalenten Bindung bekannt sind, könnte daraus K_{d2} bestimmt werden. Im Unterschied zu K_{d1} und $K_{d_{bi}}$ hat K_{d2} die Einheit mol/m^2 .

Wie aus Gleichung 2.11 ersichtlich gilt für die erste Bindung dasselbe Gleichgewicht wie für einen monovalenten Liganden. Für die zweite Bindung kommen zusätzliche Effekte ins Spiel. Erstens sorgt bei der Bindung an eine starre Oberfläche die durch die erste Bindung geschaffene räumliche Nähe dafür, dass die Wahrscheinlichkeit einer zweiten Bindung steigt, bzw. der Entropieverlust geringer ist. Zweitens muss berücksichtigt werden, wie viele weitere Bindungsstellen für den bereits einfach gebundenen Liganden erreichbar sind. Kriterien hierfür sind die räumliche Anordnung der zwei Bindungsstellen innerhalb des Liganden, d.h. deren Abstand und die Flexibilität der verbindenden Molekülstruktur, sowie die Anordnung und der Abstand der Rezeptoren auf der Oberfläche. Ein zu großer Abstand zwischen den Rezeptoren kann eine bivalente Bindung verhindern.

3 Herstellung von Mikroarrays

Aufbauend auf den theoretischen Grundlagen aus Kapitel 2 beschreibt Kapitel 3 die Herstellung der für die Messung benötigten Arrays und die Optimierung der Herstellung in Bezug auf die Detektion von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und in Bezug auf Zellresistenz. Im Vorgriff auf Kapitel 4 stellt Abschnitt 3.1 zunächst dar, wie die fertigen Arrays mit Ligand inkubiert wurden und wie die Güte der Beschichtung mit Hilfe des Bildkontrastes bestimmt werden konnte. Denn bei den in den folgenden Abschnitten vorgestellten Optimierungsschritten wurde diese Methode zur Überprüfung der hergestellten Mikroarrays angewandt. Zur Optimierung wurden die einzelnen Arbeitsschritte der Arrayherstellung der Reihe nach unabhängig voneinander variiert. Da der Bildkontrast nur für fertige Arrays überprüft werden konnte, wurden während der Variation eines Schrittes alle anderen Schritte mit den bis dahin ermittelten, optimalen Bedingungen ausgeführt. Am Ende wurden alle optimierten Einzelschritte zu einem optimierten Gesamtprotokoll zusammengesetzt.

3.1 Beschichtungskontrolle mit fluoreszenten Liganden

Ziel der Arrayherstellung war es, im Fluoreszenzmikroskop bei Inkubation mit fluoreszenten Liganden einen maximalen Bildkontrast zwischen den rezeptorbeschichteten Flecken und dem nichtfunktionalisierten Teil der Oberfläche zu erzeugen. Dazu sollten die zugänglichen Bindungsstellen auf den Flecken maximiert und die unspezifische Bindung an die umgebende Oberfläche minimiert werden. Als Modellrezeptor wurde Vancomycin eingesetzt und auf epoxyfunktionalisierten Oberflächen immobilisiert^[89] (siehe Abschnitte 3.2 und 3.3). Zur Kontrolle der Oberflächenchemie wurde zusätzlich das Peptid Fluo-Ahx-KAA über dessen Lysinseitenkette immobilisiert.^[90]

Ohne einen fluoreszenten Liganden konnte nur an dem mit Referenzpeptid beschichteten Fleck Fluoreszenz detektiert werden. Die vancomycinbe-

3 Herstellung von Mikroarrays

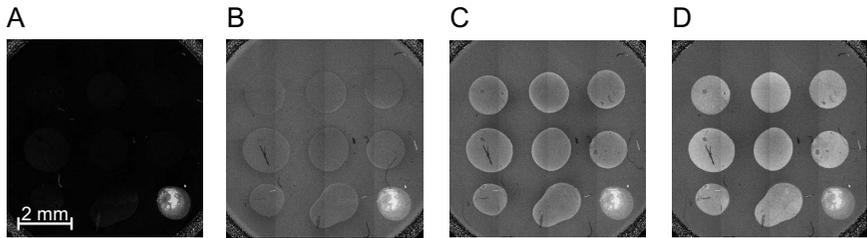


Abbildung 3.1: Bindung eines fluoreszenzmarkierten Ligandpeptids an vancomycinbeschichtete Flecken. Der Fleck in der rechten, unteren Ecke ist Fluo-Ahx-KAA, die anderen acht Flecke sind Vancomycin. (A) Deckgläschen ohne Ligandlösung. (B)-(D) Deckgläschen während der Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM) in Phosphatpuffer (150 µl), (B) direkt nach Zugabe der Lösung, (C) 5 min später, (D) 20 min später. Die Bilder wurden nach einem lückenlosen Abrastern des Deckgläschens aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt.

schichteten Flecken waren nicht sichtbar (Abbildung 3.1 A). Nach Zugabe des fluoreszenz markierten Ligandpeptids Fluo-Ahx-Kaa trat jedoch innerhalb von Sekunden vor einer homogenen Fluoreszenz, die von den gelösten Ligandmolekülen ausgestrahlt wurde, das Vancomycinmuster hell hervor. Die Fluoreszenz der vancomycinbeschichteten Flecken wurde heller, bis sie einen gleichbleibend hellen Endwert erreichte (Abbildung 3.1, B-D). Dieses Erreichen einer konstanten Fluoreszenzintensität entsprach der erwarteten Einstellung eines Bindungsgleichgewichts. Das Fluoreszenzbild zeigte sowohl für die vancomycinbeschichteten Flecke als auch für die des fluoreszenten Kontrollpeptids scharfe Ränder. Die Durchmesser der Flecke entsprachen dabei dem Durchmesser, den die Tropfen der Rezeptorlösung während der Inkubation auf dem Deckgläschen bedeckten.

Mit diesen Experimenten konnte überprüft werden, inwiefern sich die Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen eignet. Es stellte sich heraus, dass eine Unterdrückung von Fluoreszenz außerhalb des Fokus' nötig war. Nur so konnte die Fluoreszenz an der Glasoberfläche von der Fluoreszenz der gelösten Liganden unterschieden werden. Die benötigte axiale Auflösung wurde durch die konfokale Detektion innerhalb des inversen Mikroskops erreicht. Darüber hinaus ließ der inverse Aufbau eine einfache Probenhandhabung zu. Für die Messungen in

3.1 Beschichtungskontrolle mit fluoreszenten Liganden

diesem Kapitel wie auch in allen Abschnitten des Kapitels 4 wurden die Deckgläschen in einer selbst angefertigten, offenen Inkubationskammer befestigt. Diese gewährte während der Beobachtung jederzeit freien Zugang auf die beschichtete Oberseite der Deckgläschen, so dass durch Pipettieren von Hand nach Belieben Ligandlösung zugegeben oder entfernt werden konnte. Für aufrechte Mikroskope müssten die Mikroarrays in einer geschlossenen Durchflusskammer befestigt werden, da hier keine offene Inkubationskammer benutzt werden kann.

In allen Experimenten dieser Arbeit wurden die Ligandlösungen mit einer Pipette direkt auf die Arrays gegeben, bzw. einer bereits auf dem Array vorhandenen Lösung hinzugefügt. Erstens wird bei solch einer direkten Zugabe im Vergleich zu Messungen im Durchfluss der Verbrauch an Ligand minimiert, und zweitens würden Messungen im Durchfluss erfordern, dass auch für breite Arrayflächen ein einheitlicher Fluss der Liganden über die gesamte Fläche gewährleistet werden kann. Bei der direkten Zugabe kann dagegen nach jeder Zugabe die Einstellung des Gleichgewichts abgewartet werden, bis alle Punkte des Arrays der gleichen Ligandkonzentration ausgesetzt sind. Die für eine homogene Verteilung durch Diffusion benötigte Zeit kann mit manuellem Mischen verringert werden (Abschnitt 4.3). Alternativ können auch Methoden wie Mischen durch Schallwellen eingesetzt werden.^[91, 92]

Um die Qualität der Beschichtung für verschiedene Herstellungsprotokolle zu vergleichen, wurden die Deckgläschen mit einer 36 nM Lösung von Fluo-Ahx-Kaa in Phosphatpuffer inkubiert. Nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts wurde ein Bild des jeweiligen Arrays aufgenommen und der Bildkontrast zwischen den hellen Flecken, d.h. dem Signal, und dem Hintergrund mit Hilfe der Kontrastfunktion (Gleichung A.3) quantifiziert. Diese Funktion gibt unabhängig von den Aufnahmeparametern die Unterschiede zwischen Signal und Hintergrund wieder. Ohne Kontrast nimmt sie den Wert „0“ an, bei maximalem Kontrast den Wert „1“. Nichtsdestotrotz wurden für alle Aufnahmen im Rahmen der Beschichtungsoptimierung die gleichen Aufnahmeparameter gewählt. Der Lochblendendurchmesser entsprach mit 4 Airy-Einheiten zwar nicht einer strikt konfokalen Messung, doch wurde die Messung durch die geringfügige Öffnung der Lochblende weniger anfällig für Defokussierungen z.B. durch Unebenheiten der Deckgläschen. Für das Vancomycinsystem wurde mit diesen Aufnahmebedingungen für ein optimiertes Beschichtungsprotokoll ein maximaler Kontrastwert von ungefähr 0,4 erreicht (siehe Abschnitt 3.3). Mit kleineren Durchmessern der Loch-

3 Herstellung von Mikroarrays

blende ließe sich die Auflösung entlang der optischen Achse und somit der Bildkontrast noch steigern. Dies sollte auch bei kleineren Bindungskonstanten die Detektion von Wechselwirkungen ermöglichen.

Mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop konnte also die Struktur der Vancomycinbeschichtung auf dem Deckgläschen detailliert sichtbar gemacht werden. Wie auch bei den fluoreszenten Kontrollflecken wurde nicht nur die grobe Struktur des Vancomycinarrays sichtbar sondern auch die im Rahmen der mikroskopischen Auflösung wahrnehmbaren Ungleichmäßigkeiten innerhalb einzelner Flecke. Mit einem geeigneten Liganden lässt sich somit der Erfolg der Rezeptorbeschichtung im Mikroskop direkt sichtbar machen und kann optisch ausgewertet werden. Zur besseren quantitativen Vergleichbarkeit der Flecken wurde ein Wert für die Heterogenität ermittelt. Diese wurde durch die Kovarianz der zugehörigen Bildpixel eines Flecks ausgedrückt.

3.2 Silanisierung von Glasoberflächen

Als Ausgangspunkt für die Herstellung der Arrays wurde wegen ihrer Einfachheit eine von Piehler et al.^[49] veröffentlichte Methode gewählt. Sie beschreibt die Herstellung von gereinigten und silanisierten Glasoberflächen durch Inkubation mit reinem GOPTS bei Raumtemperatur. Als Trägersubstanz für die Arrays wurden runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Dicke von 0,17 mm eingesetzt.

Es stellte sich heraus, dass bereits der auf die Reinigung der Deckgläschen mit alkalischem Detergens erfolgende Aktivierungsschritt mit Piranhalösung, bzw. der anschließende Übergang zur Silanisierung der für die Reproduktion entscheidende Schritt war. Während alle weiteren Schritte zwar den resultierenden Bildkontrast beeinflussten, ein Bild des Arrays aber immer zu sehen war, entschied die Aktivierung mit Piranhalösung, ob ein Array überhaupt entstehen konnte und somit überhaupt ein Bild zu sehen war. Die Ursachen könnten einerseits in einer unterschiedlich starken Aktivierung der Oberfläche liegen, beispielsweise durch kleinste Abweichungen bei der Zusammensetzung der Piranhalösung oder bei der Dauer oder Art der Inkubation wie mit oder ohne Ultraschallbad. Andererseits könnten leicht voneinander abweichende Bedingungen beim Übergang zur Silanisierung für eine unterschiedlich schnelle Desaktivierung der Glasoberflächen gesorgt haben.

3.2 Silanisierung von Glasoberflächen

So brachte die Erhöhung des Anteils an Wasserstoffperoxid einen ersten, kleinen Gewinn in Bezug auf Reproduzierbarkeit. Im Vergleich zum Protokoll von Piehler et al. wurde mit einer Mischung der Piranhalösung von konz. H_2SO_4 zu 30 % v/v H_2O_2 von 6:5 gearbeitet. Dieser Effekt mag gering sein gegenüber dem später festgestellten, viel höheren Einfluss der Luftfeuchtigkeit. Dennoch wurde diese Mischung beibehalten.

Eine größere Rolle spielte der Übergang von der Piranhabehandlung zur Silanisierung. Nach dem Abspülen der Piranhalösung waren die aktivierten Deckgläschen bis zur Inkubation mit Silan der Raumluft ausgesetzt. Verunreinigungen der Luft konnten sich anlagern oder die Luftfeuchtigkeit konnte die Menge des an der Oberfläche absorbierten Wassers beeinflussen.^[44] Beispielsweise war anfangs die Reproduzierbarkeit der Arrays im Winter signifikant geringer, was an der geringeren Luftfeuchtigkeit der beheizten Raumluft liegen könnte. Die Lösung des Problems bestand darin, den Übergang von der Piranhalösung zur Silanisierung zu minimieren. Anfangs wurden die Deckgläschen grob mit Wasser gespült und trockneten teilweise bereits an Luft, bevor sie der Reihe nach einzeln nochmals mit Wasser gespült und vollständig getrocknet wurden. Erst wenn alle Deckgläschen getrocknet waren, erfolgte die Beschichtung mit Silan. Im optimierten Protokoll wurden die Deckgläschen nach dem groben Abspülen der Piranhalösung in Wasser gelagert. Danach wurden sie wie im früheren Protokoll einzeln mit Wasser gespült und getrocknet. Allerdings wurden sie anschließend sofort mit Silan beschichtet, noch bevor das nächste Deckgläschen aus dem Wasser genommen wurde.

Für den Prozess der Silanisierung selber wurde der Einfluss der Beschichtungsdauer auf den Bildkontrast untersucht. Die Deckgläschen wurden 1 h, 3 h, 5 h oder 24 h bei Raumtemperatur mit reinem GOPTS inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges GOPTS mit Aceton abgewaschen, bevor die weiteren Beschichtungsschritte folgten. Längere Inkubationszeiten verstärkten den Bildkontrast. Ab einer Silanisierungsdauer von ungefähr 5 h war kein weiterer Anstieg mehr zu verzeichnen (Abbildung 3.2). Nach 5 h scheint die Anzahl der für Amine zugänglichen Epoxygruppen offensichtlich ein Maximum erreicht zu haben. Eine dreidimensionale Vernetzung von GOPTS konnte nicht beobachtet werden. Sogar nach einer Silanisierungsdauer von 8 Tagen konnte überschüssiges Silan durch Spülen mit Aceton komplett entfernt werden und die Deckgläschen erschienen vollständig transparent. Für diese extreme Bedingung einer achttägigen Silanisierung wurde ungefähr der selbe Bildkontrast wie für Silanisierungszeiten von 5 h und 24 h erzielt. Die

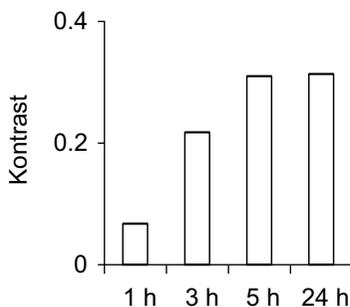


Abbildung 3.2: Einfluss der Silanisierungsdauer auf den resultierenden Bildkontrast bei Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM). Nach den verschiedenen Beschichtungszeiten mit GOPTS wurden die Deckgläschen mit Vancomycin (1 mM, 16 h) und Diamino-PEG beschichtet.

fehlende Polymerisation stand im Gegensatz zu den Erfahrungen mit anderen Trimethoxysilanen. Beispielsweise wurden die Deckgläschen nach einer einstündigen Behandlung mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan trübe und undurchsichtig, was auf eine dreidimensional vernetzte, polymerisierte Schicht schließen lässt. Für eine optimale Beschichtung wurden im Folgenden Silanisierungszeiten von mindestens 5 h gewählt.

3.3 Erzeugung des Arrays

Auf die epoxyfunktionalisierte Glasoberfläche konnten im nächsten Schritt sofort die für den Array beabsichtigten Substanzen aufgebracht werden. Zur Herstellung einer Oberflächenstruktur mit unterschiedlichen Funktionalitäten wurde die Form des Auftropfens gewählt. Erstens ermöglichte dies, den Beschichtungsprozess durch Pipettieren von Hand auf einfache Weise zu optimieren. Zweitens war der Pipettierschritt des ermittelten, optimalen Protokolls, wie erwartet, mit Hilfe eines Pipettierroboters problemlos miniaturisierbar. Dabei wurden die Lösungen, die die zu immobilisierenden Substanzen enthielten, direkt auf die silanisierten Deckgläschen aufgetropft. Während die Tropfen auf der Oberfläche verweilten, fand an den benetzten Flächen die Reaktion zwischen den Epoxygruppen und den nukleophilen Gruppen der zu immobilisierenden Substanzen statt. Der fertige Array spie-

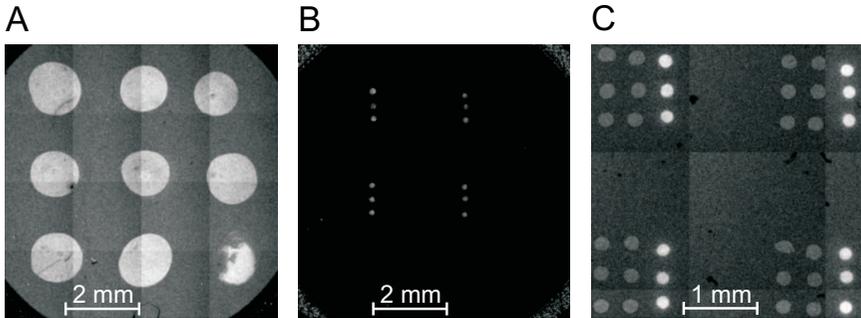


Abbildung 3.3: Größenvergleich von (A) einem manuellen Array und (B, C) einem Mikroarray, (C) zeigt einen Ausschnitt aus (B). Bei (A) ist der rechte untere Fleck mit Fluo-Ahx-Kaa beschichtet, bei (B) bzw. (C) jeweils die rechte Spalte jedes der vier 3×3 Arrays. Die übrigen Flecke sind Vancomycin. Die Vancomycinflecke wurden in (A) und (C) nach Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (100 nM) sichtbar.

gelte dann das Muster wieder, mit dem die Tropfen aufgebracht wurden, wobei an jeder dieser Stellen ein ungefähr kreisrunder Fleck der aufgetragenen Substanz entstand. Abbildung 3.3 zeigt den Größenvergleich zwischen einem von Hand erzeugten Array und einem mit dem Roboter hergestellten Mikroarray.

Zur Immobilisierung wurden wässrige Puffer als Lösungsmittel gewählt. Wässrige Lösungen bildeten auf der GOPTS-Oberfläche stabile Tropfen, während bei organischen Lösungsmitteln wie DMF oder Dimethylsulfoxid bereits $1 \mu\text{l}$ ausreichte, um die gesamte Fläche eines Deckgläschens von 12 mm Durchmesser zu benetzen. Das Volumen der Tropfen und der Abstand der Tropfen auf der Oberfläche war nur durch die Technik des Pipettierens begrenzt. Beim Pipettieren von Hand wurden typischerweise 3×3 Tropfen mit einem Volumen von $0,3 \mu\text{l}$ pro Tropfen aufgebracht. Das Eintrocknen der Tropfen wurde verhindert, indem die Deckgläschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert wurden. Sobald die Deckgläschen wieder der normalen Luftfeuchtigkeit ausgesetzt wurden, verdampfte das Lösungsmittel. Auf diese Weise konnte die Inkubationsdauer der Tropfen auf der Oberfläche auf mehrere Stunden ausgedehnt werden.

Das Tropfenvolumen des Pipettierroboters lag bei 400 pl pro Tropfen.

3 Herstellung von Mikroarrays

Bei diesen miniaturisierten Arrays wurde typischerweise ein Tropfenabstand von 300 μm oder 400 μm auf der Oberfläche gewählt, wobei an jedem Punkt des Arrays 3 Tropfen abgegeben wurden, um die beschichtete Fläche zu erhöhen. Das Pipettieren erfolgte in der Inkubationskammer des Roboters bei einer Luftfeuchtigkeit von 80 %, dem maximal möglichen Wert. Unter diesen Bedingungen waren die Tropfen zwar bereits nach einer Viertelstunde eingetrocknet, doch reichte diese Zeit für eine Beschichtung aus (siehe unten).

Die Reaktion der Epoxygruppen sollte über den pH-Wert gesteuert werden können.^[56] Thiole sollten bereits im neutralen Bereich reagieren und Amine sollten einen leicht alkalischen pH-Wert benötigen, um nicht protoniert vorzuliegen, während Wasser erst im stärker alkalischen Bereich ausreichend deprotoniert sein sollte, um als Hydroxid-Ion mit der Epoxygruppe zu reagieren. Um eine Reaktion der Epoxygruppen mit Wasser zu minimieren, wurde deshalb untersucht, wie nahe der pH-Wert am neutralen Bereich liegen darf, damit eine Anbindung der Amine noch stattfindet. Dazu wurden Vancomycin und die Kontrollpeptide Fluo-Ahx-KAA bzw. TAMRA-Ahx-KAA in Phosphatpuffern mit pH 7,0 und pH 8,0 gelöst und auf die silanisierten Deckgläschen aufgebracht. Es zeigte sich, dass pH 8,0 für die Beschichtung ausreichte, während bei pH 7,0 keine Immobilisierung von Vancomycin oder der Kontrollpeptide erreicht werden konnte.

Die für die Beschichtung benötigte Vancomycinkonzentration wurde ermittelt, indem die wässrige Stammlösung in Phosphatpuffer (pH 8,0) auf die Endkonzentrationen von 1 mM bis 10 nM verdünnt wurde. Die Kontrollpeptide wurden mit denselben Konzentrationen wie die des Vancomycins unter denselben Bedingungen immobilisiert. Mit Hilfe der verschiedenen Vancomycinkonzentrationen sollte für den Array einerseits eine optimale Oberflächendichte an Rezeptoren für die Anbindung von Liganden erreicht werden und andererseits eine möglichst einheitliche Beschichtung innerhalb eines Flecks. Die Homogenität bzw. Heterogenität wurde wie oben beschrieben über die Kovarianz ermittelt. Ausgehend von einer maximal möglichen Oberflächenbelegung mit monodentat angebondenen Silanen von 4,6 Molekülen/ nm^2 (vergleiche Abschnitt 2.3) und einem Tropfenvolumen von 0,3 μl , was einer beschichteten Kreisfläche von etwa 1 mm Durchmesser entspricht, ist eine ungefähr 20 μM Vancomycinlösung für eine vollständige Oberflächenbelegung erforderlich. Selbst unter der Berücksichtigung, dass die Oberflächenbelegung wegen der Molekülgröße von Vancomycin unterhalb von 4,6 Molekülen/ nm^2 liegen wird, sollte eine 1 μM Lösung nicht

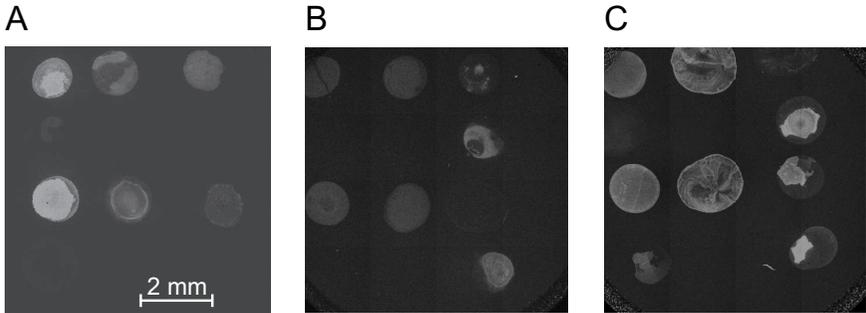


Abbildung 3.4: Arrays mit Konzentrationsreihen von (A) Fluo-Ahx-KAA und (B, C) Vancomycin. Die erste und dritte Reihe wurden von links nach rechts jeweils mit Lösungen zu 1 mM, 100 μ M und 10 μ M beschichtet, die zweite und vierte mit 1 μ M und 100 nM sowie bei (B) und (C) mit Fluo-Ahx-KAA (1 mM) als Kontrolle. (B) und (C) wurden für die Aufnahme zur Sichtbarmachung der Vancomycinbeschichtung mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM) inkubiert.

für vollständige Belegung ausreichen. Im Gegensatz dazu sollte mit einer 100 μ M Lösung eine vollständige Belegung stattfinden, selbst wenn nur ein Bruchteil der Moleküle mit der Oberfläche reagiert.

Das Ergebnis der Konzentrationsreihe entsprach diesen Erwartungen. Zwischen den Flecken, die mit den 1 mM und den 100 μ M Vancomycinlösungen beschichtet waren, konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Fähigkeit, Liganden zu binden, festgestellt werden. Die höhere Konzentration ergab jedoch die in sich homogeneren Flecken (Abbildungen 3.4 und 3.5).

Bei einer Konzentration von 1 μ M waren die Flecke im allgemeinen kaum sichtbar. 10 μ M Vancomycinlösungen ergaben Flecke mit einem mittleren Helligkeitswert. Geringere Konzentrationen als 1 μ M ergaben keine sichtbaren Flecke mehr, selbst bei Inkubationszeiten von bis zu 16 h. Fluo-Ahx-KAA und TAMRA-Ahx-KAA zeigten dieselbe Konzentrationsabhängigkeit. Offensichtlich war die 10 μ M Konzentration zu gering, um eine vollständige Oberflächenbelegung zu erreichen. Insgesamt gesehen lieferten die Lösungen, die die Flecke mit der höchstmöglichen Rezeptordichte erzeugten, die besten Ergebnisse.

Die Inkubationszeit der Tropfen auf der Oberfläche spielte hinsichtlich des

3 Herstellung von Mikroarrays

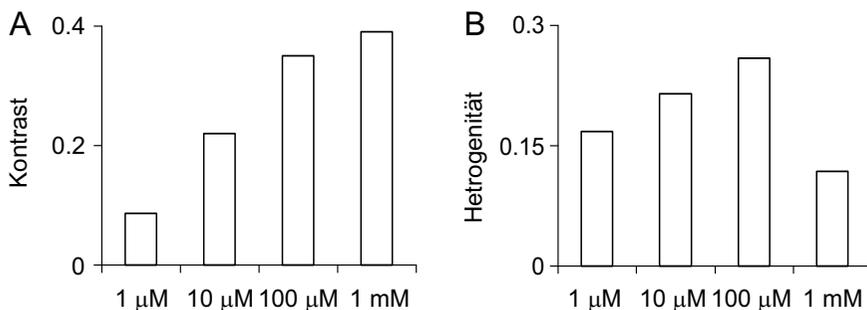


Abbildung 3.5: Einfluss der Vancomycinkonzentration auf (A) den resultierenden Bildkontrast und (B) die Heterogenität der resultierenden Flecke bei Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM). Für die 1 mM Lösung ergab sich der größte Kontrast und die geringste Heterogenität, d.h. die resultierenden Flecke waren hell und homogen zu sehen.

Bildkontrastes keine große Rolle (Abbildung 3.6). Eine Inkubationsdauer von 3 h war bei den von Hand pipettierten Arrays für eine wirksame Immobilisierung mit 1 mM oder 100 μ M Lösungen völlig ausreichend. Kürzere Zeiten wurden in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Wie die mit dem Pipettierroboter hergestellten Mikroarrays zeigten, erfolgte die Anbindung über die Epoxygruppen bereits innerhalb weniger Minuten. Im Folgenden wurden für die Erzeugung des Arrays deshalb Substanzlösungen von mindestens 50 μ M in Phosphatpuffer pH 8,0 eingesetzt. Die Inkubationszeiten betragen weniger als eine Stunde.

3.4 Absättigung der umgebenden Oberfläche

Im letzten Schritt der Oberflächenbeschichtung wurden die noch verbleibenden, reaktiven Epoxy-Gruppen auf der Oberfläche abgesättigt. Einerseits sollten dadurch Auswaschungsspuren unterbunden werden, die ansonsten beim Abspülen der Arrays auftraten (Abbildung 3.7), indem überschüssige Substanz auf der noch reaktiven Oberfläche außerhalb der Flecken kovalent anband. Andererseits sollte sich durch eine geeignete Absättigung die unspezifische Anlagerung der Liganden bei den folgenden Messungen verringern lassen. Zusätzlich zur Absättigung durch Wasser wurde der Einfluss

3.4 Absättigung der umgebenden Oberfläche

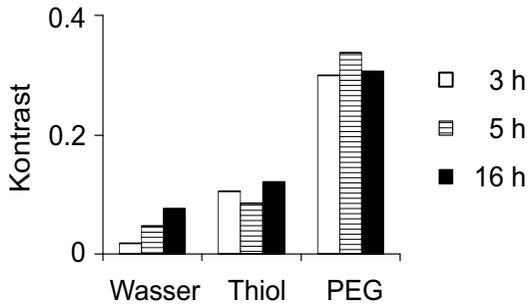


Abbildung 3.6: Einfluss verschiedener Vancomycin-Inkubationszeiten im Vergleich zu verschiedenen Absättigungsprotokollen auf den resultierenden Bildkontrast bei Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM).

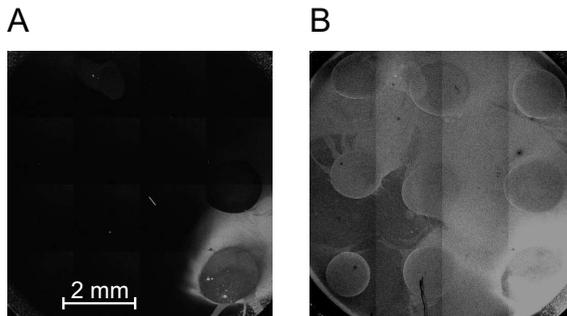


Abbildung 3.7: Auswaschungsspuren nach Abspülen der Arraybeschichtung ohne vorherige Absättigung der restlichen Oberfläche. Der rechte, untere Fleck ist Fluo-Ahx-KAA, die anderen sind Vancomycin. (A) zeigt den trockenen Array, (B) denselben Array während der Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa, um auch die Auswaschungsspuren der Vancomycinbeschichtung sichtbar zu machen.

3 Herstellung von Mikroarrays

von zwei weiteren Verbindungen auf den Bildkontrast untersucht. Sobald alle Tropfen des Arrays eingetrocknet waren, wurden die Deckgläschen entweder mit Diamino-PEG, mit Ethanthiol oder mit Wasser inkubiert. In allen Fällen blieben die scharfen Ränder der Flecken erhalten. Bei der Inkubation mit Wasser konnten Auswaschungsspuren, wie oben beschrieben, nicht immer verhindert werden. Bei Diamino-PEG und Ethanthiol dagegen konnte kein Auswaschen von Substanzen aus den Flecken heraus beobachtet werden. Offensichtlich blieb die eingetrocknete Substanz, die nicht immobilisiert worden war, auf der Oberfläche adsorbiert. Oder sie ging nur langsam wieder in Lösung und diffundierte langsam im Vergleich zur Absättigung der Epoxygruppen. Überschüssiges Ethanthiol und Diamino-PEG wurden nach der Absättigung der Oberfläche mit DMF bzw. mit Wasser abgespült. Mit diesem Waschschritt wurden gleichzeitig alle überschüssige Substanz und die Puffersalze, die während der Absättigung eingetrocknet auf dem Deckgläschen verblieben waren, abgespült. Nach diesem Spülschritt war die Beschichtung abgeschlossen und die Deckgläschen konnten bei Raumtemperatur und Raumluft gelagert werden. Die Messung erfolgte dann innerhalb von zwei Wochen. In diesem Zeitraum konnten keine Veränderungen der Messwerte für die Bindungsstudien beobachtet werden.

Die Absättigung der Oberfläche hatte auf die Erhöhung des Bildkontrasts den größten Einfluss im Vergleich zu den anderen untersuchten Parametern. Den höchsten Kontrast ergab die Absättigung mit Diamino-PEG (Abbildung 3.6). Ohne die PEG-Schicht war selbst bei sonst optimalen Parametern nur ein vergleichsweise geringer Kontrast zu sehen. Die Erhöhung des Bildkontrastes war vor allem auf die verringerte Fluoreszenz außerhalb der Flecken zurückzuführen, d.h. die unspezifische Anlagerung von Liganden an die nichtfunktionalisierte Oberfläche wurde verringert. Wie die Versuche in Abschnitt 3.5 nahelegen, ist diese Verringerung nicht speziell auf Diamino-PEG sondern ganz allgemein auf die PEG-Einheit zurückzuführen. Andere PEG-Verbindungen, die eine geeignete nukleophile Endgruppe zur Öffnung des Epoxids besitzen, sollten mit ähnlichem Erfolg einsetzbar sein.

3.5 Zellresistente Arrays

Mikroarrays könnten sich neben der Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen auch dafür einsetzen lassen, in irgendeiner Form die Reaktion von lebenden Zellen auf die immobilisierten Substanzen auszulesen.

Auf diese Weise könnten beispielsweise geeignete Auslösersubstanzen für gewisse Wirkungen gefunden werden. Damit die Reaktion der Zellen eindeutig einer bestimmten Substanz zugeordnet werden kann, sollte bei solchen zellulären Arrays zwischen den einzelnen Punkten des Arrays kein Zellwachstum möglich sein. Die Oberfläche außerhalb der Arraypunkte sollte demzufolge nicht nur die unspezifische Anlagerung von Liganden verhindern, sondern auch die Anhaftung adhärenter Zellen erschweren oder sogar vollständig unterbinden.^[93]

Die besten Ergebnisse wurden bisher im allgemeinen mit Verbindungen erzielt, die mit mehreren Ethylenglykol-Einheiten enden.^[64–66] In dieser Arbeit wurden deswegen ein Diamino-PEG und ein Monoamino-PEG getestet. Das verwendete Diamino-PEG (eigentlich ein Block-Copolymer) liegt bei Raumtemperatur flüssig vor und ist dadurch einfacher handhabbar, während das Monoamino-PEG erst gelöst werden musste. Beide können über eine Aminogruppe auf die Epoxy-Oberfläche binden, unterscheiden sich jedoch in dem Ende, das die Oberfläche nach der Beschichtung den Zellen präsentiert. Beim Monoamino-PEG werden die Ethylenglykol-Einheiten mit einem Methylether abgeschlossen, während beim Diamino-PEG eine verzweigte Aminopropyl-Einheit den Abschluss bildet.

Bereits das Diamino-PEG reichte aus, um die Anlagerung von Zellen zu verringern. Wurden die Diamino-PEG-beschichteten Deckgläschen in Petrischalen mit den Zellen inkubiert, blieben große Flächen unbewachsen und auf den anderen Flächen ließen sich die Zellen meist leicht abwaschen. Die besseren Ergebnisse wurden jedoch mit Monoamino-PEG erzielt. Bereits mit bloßem Auge war in der Zellkulturschale das von den Zellen bewachsene Muster des Mikroarrays erkennbar, wobei das Wachstum auf den Kontrollflecken mit Fluo-Ahx-KAA weit weniger dicht war. Die restliche Fläche der Deckgläschen war vollkommen frei von Zellen. Für die Mikroskopie wurde das Nährmedium abgewaschen und die mit den Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden mit HBS-Puffer inkubiert. Bei diesem Waschschrift wurden zusätzlich noch manche Zellen entfernt, die nur lose an die Oberfläche gebunden hatten. Die Zellen, die auf dem mit Fluo-Ahx-KAA beschichteten Kontrollfleck gewachsen waren, dünnten so teilweise weiter aus. Abbildung 3.8 zeigt, dass Monoamino-PEG bestens geeignet war, das Zellwachstum zu unterbinden. Trotz der höheren Zellresistenz von Monoamino-PEG-beschichteten Oberflächen wurde jedoch für die in Kapitel 4 beschriebenen Messungen aufgrund seiner leichteren Handhabbarkeit Diamino-PEG gewählt.

3 Herstellung von Mikroarrays

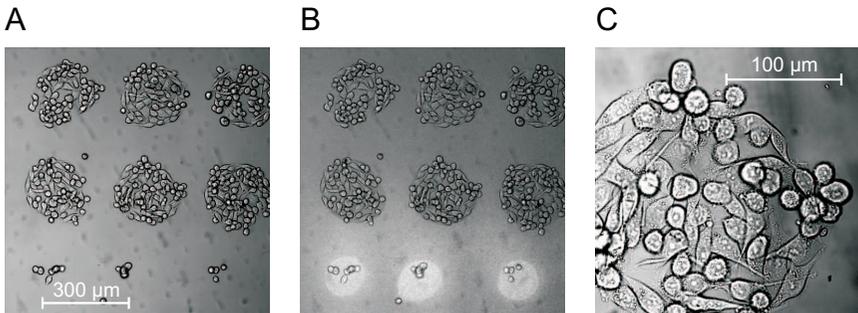


Abbildung 3.8: (A, B) Mit Zellen bewachsener Mikroarray. Die zwei oberen Reihen wurden mit Vancomycin beschichtet, die untere Reihe mit Fluo-Ahx-KAA. Die Absättigung erfolgte mit Monoamino-PEG. (C) Vergrößerung des mittleren Flecks aus (A). (A) und (C) zeigen die Zellen im Durchlicht, bei (B) ist der Fluorescein-Kanal überlagert.

Der spärliche Bewuchs auf den Kontrollflecken deutet darauf hin, dass auch die Substanzen des Mikroarrays selber einen verringerten Bewuchs hervorrufen können. Eine andere Erklärung für den spärlichen Bewuchs könnte sein, dass die für die Beschichtung mit Fluo-Ahx-KAA gewählte Konzentration zwar optisch gleichmäßige Flecke erzeugt, jedoch keine vollständige Belegung. Innerhalb des Flecks würden dann freie Epoxygruppen verbleiben, an denen Monoamino-PEG anbinden kann und so die Zellanhaftung innerhalb des Flecks erschwert.

Auch nach der Inkubation mit Zellen war der Mikroarray noch für die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen einsetzbar (Abbildung 3.9). Durch eine Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa als Ligand konnte weiterhin die Vancomycinbeschichtung sichtbar gemacht werden. Die von den Zellen bewachsene Fläche deckte sich genau mit der vancomycinbeschichteten Fläche. Unter vielen Zellen ist allerdings nur eine verringerte Fluoreszenz zu sehen (siehe auch Abbildung 3.10). Eine Möglichkeit wäre, dass fest angewachsene adhärenente Zellen die darunter befindlichen Vancomycinmoleküle abschirmen und so die Anlagerung vermindern. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Ligand zwar bindet, aber von den Zellen verdaut und aufgenommen wurde. In einem weiteren Experiment wurde der Array deshalb mit dem längeren Peptid P1 (siehe Tabelle A.2) inkubiert. Dieses

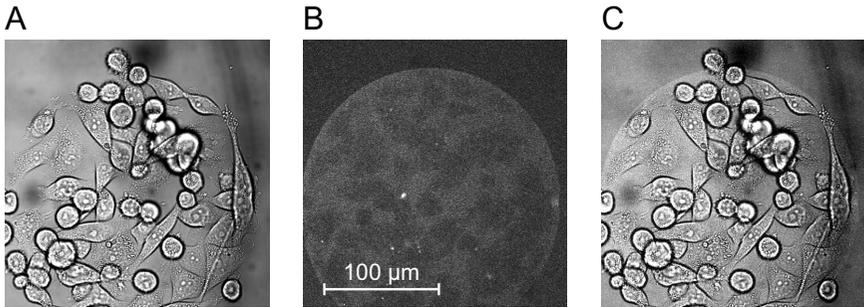


Abbildung 3.9: Mit Zellen bewachsener Vancomycinleck während der Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (200 nM). (A) zeigt den Durchlichtkanal, (B) den Fluo-Kanal und (C) die Überlagerung. Für eine optimale Darstellung wurden die Kanäle in (A) und (C) bzw. (B) und (C) unabhängig voneinander in Kontrast und Helligkeit optimiert.

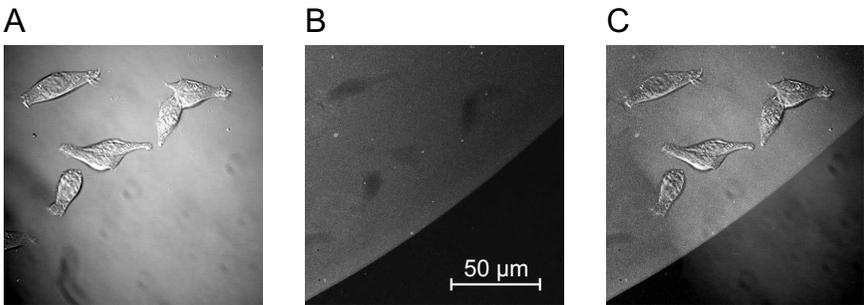


Abbildung 3.10: Adhärente Zellen am Rande eines vancomycinbeschichteten Flecks bei Inkubation mit dem fluoreszenten Peptid P1 in (A) Durchlichtkanal, (B) Fluoresceinkanal und (C) deren Überlagerung. Die adhärenten Zellen bedecken die Vancomycinbeschichtung teilweise so dicht, dass sich dort kein Ligand anlagern kann.

3 Herstellung von Mikroarrays

enthielt N-terminal neben der Sequenz Kaa noch die Importsequenz RQIKI-WFQNRRMKWK, die für eine schnelle Aufnahme des Peptids in die Zelle sorgen sollte,^[94] sowie eine weitere Sequenz, die in der Zelle abgespalten werden kann^[95] und an der das Peptid über die Lysinseitenkette mit Fluorescein markiert war. P1 sollte von den Zellen gut aufgenommen werden und der Peptidteil mit dem Fluorophor sollte nach der Abspaltung der Importsequenz die Zelle nicht wieder verlassen können. In den Zellen auf den Vancomycinflecken konnte jedoch wie auch bei Fluo-Ahx-Kaa keine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass die dunklen Flächen auf den Vancomycinflecken nicht auf einen Verdau der Liganden zurückzuführen waren, sondern dass diese Flächen unter den adhären Zellen für die Liganden unzugänglich waren. Sollen die Zellen in zellulären Mikroarrays mit Substanzen auf der Oberfläche in Kontakt treten, müssten diese Substanzen demzufolge bereits vor der Inkubation mit Zellen auf die Oberfläche gebracht werden.

4 Messungen auf Mikroarrays

Nachdem Kapitel 3 beschrieben hat, wie die ersten, im Fluoreszenzmikroskop kaum sichtbaren Arrays zu Mikroarrays mit hohem Bildkontrast optimiert wurden, folgen in Kapitel 4 mögliche Anwendungen dieser Arrays und Mikroarrays. Bereits Abschnitt 3.1 hat dargestellt, dass die konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit ihrer lateral und axial aufgelösten Detektion der Fluoreszenz zur Sichtbarmachung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen prinzipiell geeignet war. Abschnitt 4.1 knüpft daran an und beschreibt, inwieweit die beobachteten Bilder die Spezifitäten der untersuchten Wechselwirkung widerspruchsfrei wiedergaben. Ausgehend von dieser Voruntersuchung folgten im Anschluss daran die Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieser Kombination aus Mikroarray und Fluoreszenzmikroskopie für verschiedene Fragestellungen. Insbesondere gehörten dazu Kinetikmessungen, die Messung von Bindungskonstanten fluoreszenter und nichtfluoreszenter Liganden, die Überprüfung der Rezeptordichte und die Übertragung auf Fragestellungen der funktionellen Proteomanalyse.

4.1 Untersuchung spezifischer Bindungen mit konfokaler Detektion

In Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durch die Zugabe von Fluo-Ahx-Kaa auf einen vancomycinbeschichteten Array ein Bild der Vancomycinbeschichtung erzeugt werden konnte. Da aus dieser Kombination von Mikroarray und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie mehrere Anwendungen entwickelt werden sollten, musste zunächst überprüft werden, inwieweit sich aus den aufgenommenen Mikroskopiebilder tatsächlich Informationen über die spezifische Bindung von Fluo-Ahx-Kaa an Vancomycin gewinnen ließen oder inwieweit unspezifische Anlagerungseffekte bei der Entstehung des Bildes überwogen. Insbesondere sollte sich in den Bilddaten die Reversibilität, die Kompetierbarkeit und die Spezifität der Bindung erkennen lassen.

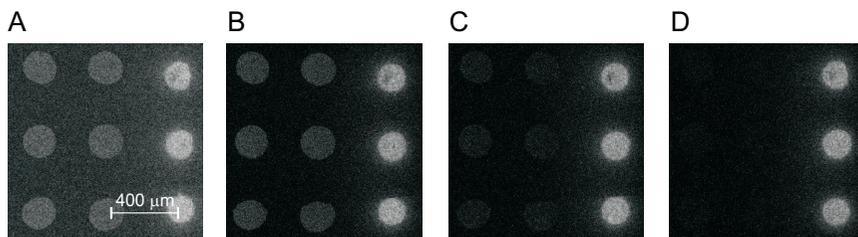


Abbildung 4.1: Reversibilität der Bindung von Fluo-Ahx-Kaa. Die linke und mittlere Spalte des Mikroarrays sind Vancomycinflecke, die rechte Spalte enthält Fluo-Ahx-KAA als Kontrollflecke. (A) Fluoreszenz im Gleichgewicht bei Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM) in Phosphatpuffer. (B, C) Der gleiche Mikroarray nach dem Austausch der Ligandlösung gegen Phosphatpuffer (1 ml), (B) direkt nach Pufferzugabe, (C) 5 min später und (D) nach fünfmaligem Austausch des Puffers.

Im Tripeptid Kaa sind die freie, terminale Carboxygruppe sowie das Peptidrückgrat und die Seitenketten der zwei benachbarten D-Alanine an der molekularen Erkennung beteiligt. In den fluoreszenten Analoga umfassen der jeweilige Fluorophor zusammen mit dem Abstandhalter Ahx jedoch mehr als die Hälfte des Molekulargewichts. Diese zusätzlichen strukturellen Bestandteile könnten die molekulare Erkennung dieser kleinen Moleküle gravierend beeinflussen. Für die Kompetierbarkeit und die Spezifität der Bindung wurde deshalb der Beitrag der einzelnen strukturellen Bestandteile der fluoreszent markierten Ligandanaloge zur Bindung untersucht. Dazu wurde zum einen die Bindung des fluoreszenten Peptids in Konkurrenz mit unmarkierten Peptiden gemessen, zum anderen wurden sowohl der Peptidteil als auch die Fluorophore variiert.

Die Umkehrbarkeit der Bindung wurde durch den Austausch der Ligandlösung gegen Phosphatpuffer (1 ml, pH 7,0) bestätigt (Abbildung 4.1). Im Phosphatpuffer dissoziierte Fluo-Ahx-Kaa wieder, bis sich ein neues Gleichgewicht entsprechend der noch im System befindlichen Menge an Ligand eingestellt hatte. Abbildung 4.2 A zeigt, wie sich die Dissoziationskurve während einer Zeitdauer von 20 min asymptotisch dem neuen Gleichgewichtswert nähert. Abbildung 4.2 B zeigt dieselbe Kurve für einen Mikroarray. Wegen der viel kleineren vancomycinbeschichteten Flächen hatte weniger Ligand binden können, so dass sich nach der Verdünnung mit Phosphat-

4.1 Untersuchung spezifischer Bindungen mit konfokaler Detektion

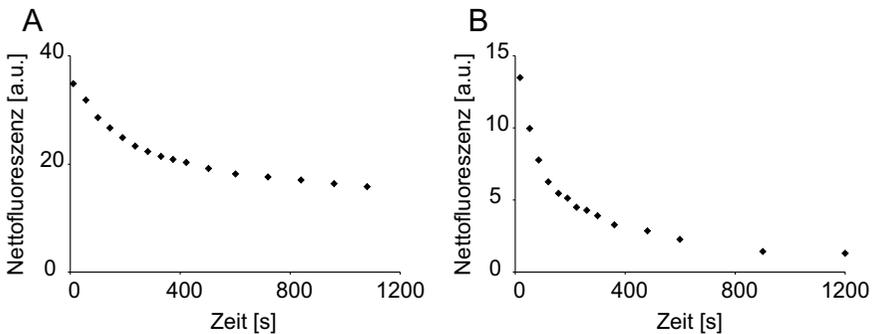


Abbildung 4.2: Dissoziationskurven. Ein von Hand vancomycinbeschichteter Array (A) bzw. ein Mikroarray (B) wurden mit Fluo-Ahx-Kaa (36 nM) inkubiert. Nach Gleichgewichtseinstellung wurde die Ligandlösung entfernt und durch Phosphatpuffer (1 ml) ersetzt. Anschließend wurde auf den Arrays in einer Zeitreihe die Nettofluoreszenz gemessen.

puffer ein wesentlich kleinerer, neuer Gleichgewichtswert einstellte. Durch wiederholten Austausch des Puffers konnte eine vollständige Dissoziation des Liganden beobachtet werden (Abbildung 4.1 D).

Die Bindung von Fluo-Ahx-Kaa (36 nM) konnte durch Konkurrenz mit Ac-Kaa (100 μ M) verhindert werden. Im Vergleich dazu war bei gleichzeitiger Inkubation mit Ac-AYA (100 μ M) keine Inhibition der Bindung von Fluo-Ahx-Kaa (36 nM) erkennbar. Wenn die Arrays mit einer Lösung des Peptids Fluo-Ahx-KAA (100 nM) inkubiert wurden, das die beiden Alanine als L-Isomere enthält, konnte keine Wechselwirkung beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Bindungsart des Peptidteils, d.h. die Wechselwirkung von Vancomycin mit der Peptidsequenz D-Ala-D-Ala durch die zusätzliche Fluorescingruppe und den Abstandhalter Ahx nicht beeinträchtigt wurde. Allerdings deutet der hohe Überschuss an nicht markiertem Liganden, der für die Konkurrenz benötigt wurde, darauf hin, dass die Fluorescingruppe sehr wohl zusätzliche zwischenmolekulare Wechselwirkungen beisteuert.

Um auszuschließen, dass diese Beobachtungen nur auf Fluorescein als fluoreszente Markierung zutreffen, wurde der analoge, TAMRA-markierte Ligand TAMRA-Ahx-Kaa synthetisiert. TAMRA wurde wegen seiner unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften ausgewählt. Während Fluo-

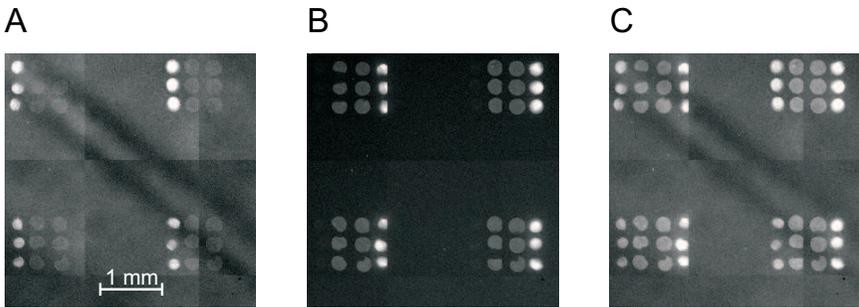


Abbildung 4.3: Mehrkanalaufnahme eines Mikroarrays bei Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa und TAMRA-Ahx-Kaa (je 100 nM). Die linke Spalte jedes 4×3 -Arrays wurde mit TAMRA-Ahx-KAA, die rechte mit Fluo-Ahx-KAA und die mittleren wurden mit Vancomycin beschichtet. (A) zeigt den TAMRA-Kanal, (B) den Fluo-Kanal und (C) die Überlagerung. Der TAMRA-Kanal in (A) ist im Vergleich zu (C) aufgehellt. Die dunklen Streifen im TAMRA-Kanal sind auf Interferenzerscheinungen wegen einer leichten Verkipfung des Deckgläschens zurückzuführen.

rescein negativ geladen ist, liegt TAMRA zwitterionisch vor. Bei der Inkubation eines Vancomycinarrays mit einer Lösung von TAMRA-Ahx-Kaa (100 nM) wurden ebenfalls helle Vancomycinflecke sichtbar. Wurde ein Vancomycinarray dagegen direkt mit TAMRA oder Fluo inkubiert, war keine Wechselwirkung sichtbar. Auch die Bindung von TAMRA-Ahx-Kaa konnte bei gleichzeitiger Inkubation mit Ac-Kaa (100 μ M) kompetiert werden. Die gleichzeitige Inkubation eines Mikroarrays mit einem äquimolaren Gemisch aus TAMRA-Ahx-Kaa und Fluo-Ahx-Kaa (jeweils 100 nM) zeigte in beiden Farbkanälen genau das gleiche Vancomycinmuster (Abbildung 4.3). Da die intensiven Kontrollflecke im jeweils anderen Kanal nicht zu detektieren waren, kann ausgeschlossen werden, dass die Signale auf den Vancomycinflecken auf ein Übersprechen der Fluoreszenzkanäle zurückzuführen war. Die Signale auf den Vancomycinflecken weisen somit eindeutig darauf hin, dass beide Liganden an Vancomycin binden. Um den Einfluss der beiden Fluorophore auf die Bindung der Peptidsequenz exakt vergleichen zu können, war jedoch eine Bestimmung der Bindungsstärke der Liganden mit Hilfe von Bindungstitrationen nötig (Abschnitt 4.3). Insgesamt ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die molekulare Erkennung der verschiede-

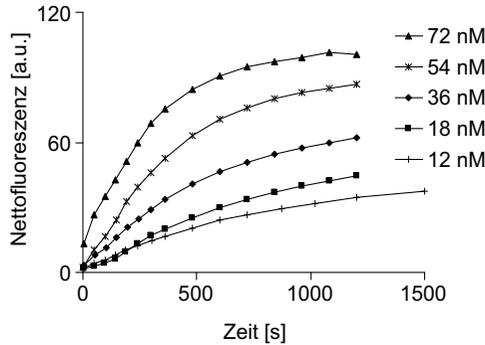


Abbildung 4.4: Intensität der Nettofluoreszenz gegen die Zeit

nen Ligandanaloga allein auf die Peptidsequenz zurückzuführen ist. Weder die Farbstoffe für sich noch ein farbstoffmarkiertes Peptid mit einer anderen Sequenz zeigten eine beobachtbare Bindung an Vancomycin. Allerdings verstärkten die Farbstoffe die Bindung, sobald über die Peptidsequenz eine molekulare Erkennung vorlag.

4.2 Kinetikmessungen

Wenn vancomycinbeschichtete Arrays mit Fluo-Ahx-Kaa-Lösungen inkubiert wurden (Abbildung 3.1), konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenz im Laufe der Zeit zunahm. Im folgenden Abschnitt soll deshalb aufgezeigt werden, inwieweit mit den Vancomycinarrays eine Messung kinetischer Größen möglich war. Dazu wurden die vancomycinbeschichteten Deckgläschen mit Fluo-Ahx-Kaa-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert (12 nM bis 72 nM) und eine Zeitreihe der Oberflächenfluoreszenz aufgenommen. Die gemittelte Nettofluoreszenz F auf den Vancomycinflecken jedes Bildes wurde gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.4).

Die Anlagerung konnte mit einer Assoziationskinetik erster Ordnung beschrieben werden. Dazu wurde angenommen, dass die ermittelte Nettofluoreszenz $F(t)$ der Konzentration $\Gamma(t)$ der gebildeten Komplexe an der Oberfläche proportional ist:

$$F(t) = a \cdot \Gamma(t) + F_0 \quad (4.1)$$

4 Messungen auf Mikroarrays

Theoretisch sollte die Proportionalität einer Ursprungsgeraden entsprechen. Dennoch wurde durch die Einführung von F_0 ein möglicherweise abweichender Achsenabschnitt der Nettofluoreszenz berücksichtigt, der sich trotz der Subtraktion des Hintergrunds aufgrund von leichten Unebenheiten des Deckgläschens oder aufgrund von Inhomogenitäten der Beschichtung ergeben konnte. Mit dieser Proportionalität folgte aus Gleichung 2.9 die zur Kurvenanpassung benutzte Gleichung

$$F(t) = (F_{GG} - F_0) (1 - e^{-k_{obs}t}) + F_0 \quad (4.2)$$

Die Auswertung der für die verschiedenen Konzentrationen ermittelten k_{obs} nach Gleichung 2.10 ergab für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_a Werte im Bereich von $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Obwohl sich die einzelnen Kurven gut durch die Geschwindigkeitsgleichung erster Ordnung annähern ließen, liegen die Werte weit entfernt von der für die Assoziation in Lösung veröffentlichten Geschwindigkeitskonstanten von $k_a = 2,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[96] Der Grund liegt in der bei der Herleitung (siehe Abschnitt 2.5.2) gemachten Annahme, dass sich die Konzentration an freiem Ligand [B] in der oberflächennahen Lösung über die Zeit nicht ändert. Nach Abschnitt 3.3 waren nicht mehr als 60 pmol Vancomycin an der Oberfläche immobilisiert, wenn von Hand acht Vancomycinflecken pipetiert wurden. Die für die Inkubation verwandten Ligandlösungen enthielten jedoch bei den eingesetzten kleinen Volumina weniger als 60 pmol Liganden. Die Lösung der allgemeinen Differenzialgleichung 2.7 erfordert demzufolge eine Berechnung der Konzentrationsabnahme an freiem Ligand. Außerdem wurde in einem statischen System gearbeitet. Ohne Rühren war der Massentransport an die Oberfläche durch Konvektion und Diffusion begrenzt. Die Kombination aus kleiner Ligandmenge und hoher Assoziationsgeschwindigkeit mit hoher Bindungskonstanten bewirkte, dass zur Erreichung des Gleichgewichts fast alle Liganden an die Oberfläche diffundieren mussten und dort „sofort“ gebunden wurden. Die gemessenen Kinetikkurven gaben also ausschließlich die Kinetik von Konvektion und Diffusion wieder. Beim beschriebenen Versuchsaufbau reichten für alle Konzentrationen 10–20 min aus, um das Gleichgewicht zu erreichen.

Mit Fluoreszenzmikroskopie kann also durchaus der zeitliche Verlauf einer Bindung beobachtet werden. Solange die Bindungskinetik im gleichen Zeitrahmen wie die Aufnahmegeschwindigkeit liegt, könnten so kinetische Daten gewonnen werden. Die Auswertung eines statischen Systems erfordert

allerdings speziell für kleine Probenvolumina eine komplexe Datenanalyse, die den Effekt des Massentransports und der Ligandverarmung berücksichtigen muss.^[97,98] Alternativ erlaubt das Mikroskop den Einbau von passenden Flusszellen, die in vieler Hinsicht die Auswertung kinetischer Daten vereinfachen.^[99]

4.3 Bindungstitrationen auf Vancomycin

Wie sich Abbildung 4.4 entnehmen lässt, stellen sich für verschiedene Ligandkonzentrationen unterschiedliche Gleichgewichtswerte ein. Dies legt eine Messung von Bindungskonstanten über die Gleichgewichtskonzentrationen nahe. Nach Abschnitt 2.5.1 müssen dazu auf einem Array, bei dem die Rezeptoren auf der Oberfläche immobilisiert sind, die Konzentrationen des Rezeptor-Ligand-Komplexes für verschiedene Ligandkonzentrationen gemessen werden.

Um Bindungskonstanten für fluoreszent markierte Liganden zu messen, wurden deshalb Bindungstitrationen durchgeführt. Dazu wurden die Deckgläschen, die mit dem Rezeptorarray und fluoreszenten Kontrollflecken beschichtet waren, in eine Halterung eingespannt und mit Phosphatpuffer inkubiert. Durch schrittweise Zugabe von konzentrierter Ligandlösung zum vorgelegten Phosphatpuffer wurde die Ligandkonzentration über dem Array nach und nach erhöht. Die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts, die im ungerührten System mehr als 10 min beträgt, wurde durch Mischen auf weniger als 4 min reduziert (Abbildung 4.5). Auf jedem Deckgläschen wurden für die einzelnen Rezeptorflecke jeweils getrennt die Gleichgewichtswerte für die verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Sollte eine Kurvenanpassung folgen, dann wurden die Gleichgewichtswerte der gleich beschichteten Flecken gemittelt, und die Kurvenanpassung wurde für die gemittelten Werte durchgeführt. Eine Auftragung der gemessenen Nettofluoreszenz gegen die zugegebene Ligandkonzentration zeigt einen fast linearen Anstieg der Gleichgewichtsfluoreszenz am Anfang, bis die Bindung ab einer gewissen Konzentration eine Sättigung erreicht. (Abbildung 4.6).

Die gemessenen Bindungskurven wurden auf Basis der Langmuirschen Adsorptionsisotherme ausgewertet. Um die Oberflächenkonzentration des Rezeptors und des Komplexes und die Volumenkonzentration des Liganden besser vergleichen zu können, wurden alle Gleichungen auf die im gesamten System zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandene Stoffmenge n zurückgeführt.

4 Messungen auf Mikroarrays

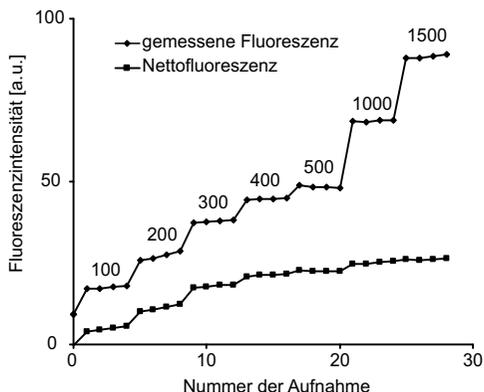


Abbildung 4.5: Bindungstitration mit TAMRA-Ahx-Kaa. Die eingetragenen Zahlen zeigen die Ligandkonzentrationen (in nM) über dem Array an. Die Aufnahmen wurden jeweils 1, 2, 3 und 4 min nach Zugabe gemacht. Innerhalb der ersten Minute wurde die Lösung durchmischt.

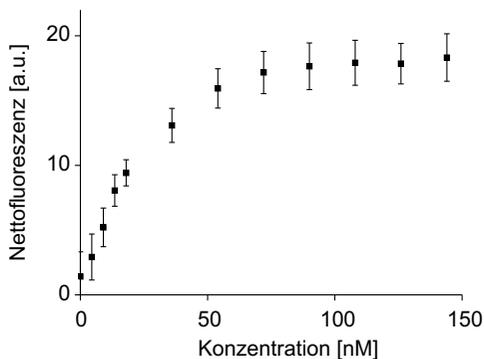


Abbildung 4.6: Bindungstitration eines vancomycinbeschichteten Deckgläschens mit Fluo-Ahx-Kaa. Die Nettofluoreszenz des jeweiligen Gleichgewichtszustandes ist gegen die zugegebene Ligandkonzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen den ausgewerteten Flecken innerhalb des Arrays.

4.3 Bindungstitrationen auf Vancomycin

Die tiefgestellte 0 als Index bei Substanzen bezieht sich auf die vor Einstellung der Bindung vorhandene Menge im System, d.h. auf die Gesamtmenge oder maximal mögliche, frei vorliegende Menge. Wenn die Oberflächenkonzentration Γ des Komplexes in Gleichung 4.1 durch $\frac{n_{AB^*}}{A}$ ersetzt wird, kann die konstante Beschichtungsfläche A in die Proportionalitätskonstante gezogen werden.

$$F = a' \cdot n_{AB^*} + F_0 \quad (4.3)$$

Bei hohen Konzentrationen geht die Nettofluoreszenz in die Sättigung über:

$$F_{\max} = a' \cdot n_{AB^*,\max} + F_0 \quad (4.4)$$

Die maximal mögliche Menge an Komplex $n_{AB^*,\max}$ entspricht der Menge an immobilisiertem Rezeptor $n_{A_0^*}$. Damit kann a' durch die Kombination der Gleichungen 4.3 und 4.4 eliminiert werden und für die Beziehung zwischen der Nettofluoreszenz F und der Menge n an Komplex AB^* ergibt sich

$$F = \frac{F_{\max} - F_0}{n_{A_0^*}} \cdot n_{AB^*} + F_0 \quad (4.5)$$

Das für eine Kurvenanpassung benötigte n_{AB^*} kann mit Hilfe der Langmuir'schen Adsorptionsisotherme (Gleichung 2.1) aus der Menge an zugegebenem Ligand berechnet werden. In der Isotherme tauchen die Oberflächenkonzentrationen auf beiden Seiten so auf, dass sich die beschichtete Oberfläche A herauskürzt. Wird die Ligandkonzentration $[B]$ durch $\frac{n_B}{V}$ ersetzt, so kann die Verarmung der Lösung an Ligand B über den Massenerhalt $n_B = n_{B_0} - n_{AB^*}$ (analog zu Gleichung 2.2) berücksichtigt werden. Dadurch ergibt sich für die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme die modifizierte Gleichung

$$n_{AB^*} = \frac{n_{A_0^*} \left([B_0] - \frac{n_{AB^*}}{V} \right)}{K_{d_{AB^*}} + \left([B_0] - \frac{n_{AB^*}}{V} \right)} \quad (4.6)$$

Die Lösung der quadratischen Gleichung ergibt sich dann zu

$$n_{AB^*} = \frac{1}{2} \left(D - \sqrt{D^2 - 4n_{A_0^*}V[B_0]} \right) \quad (4.7)$$

mit

$$D = n_{A_0^*} + VK_{d_{AB^*}} + V[B_0] \quad (4.8)$$

Mit dieser Lösung für n_{AB^*} wurde Gleichung 4.5 für die Kurvenanpassung benutzt. Die modifizierte Langmuir'sche Adsorptionsisotherme war sehr gut

4 Messungen auf Mikroarrays

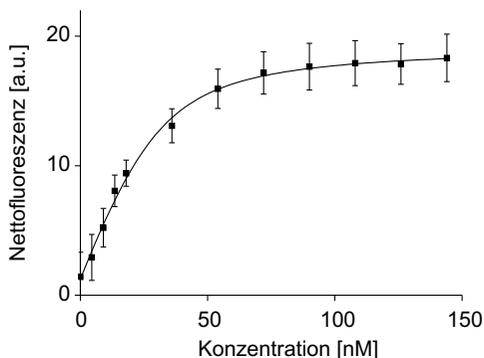


Abbildung 4.7: Ergebnis der Kurvenanpassung mit einer modifizierten Langmuirschen Adsorptionsisotherme für die Messwerte aus Abbildung 4.6.

geeignet, um die Messwerte zu beschreiben (Abbildung 4.7). Mit Hilfe der Anpassung konnten so Werte für die Dissoziationskonstante ($K_{d_{AB^*}}$) und die immobilisierte Menge an Rezeptor (n_{A^*}) bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf diese Weise Bindungskonstanten für die Bindung von Fluo-Ahx-Kaa und von TAMRA-Ahx-Kaa an Vancomycin ermittelt. Mit beiden Liganden wurden auf je drei Deckgläschen Bindungstitrations durchgeführt. Die Deckgläschen waren von Hand mit einem Array aus acht Tropfen einer 1 mM Vancomycinlösung und einem Tropfen des entsprechenden Kontrollpeptids beschichtet worden und wurden mit dem $5 \times$ Objektiv vermessen. Der Mittelwert dieser drei Messungen ergab für Fluo-Ahx-Kaa einen K_d -Wert von $4,6 \pm 3,4 \times 10^{-9}$ M und für TAMRA-Ahx-Kaa einen K_d -Wert von $3,8 \pm 2,2 \times 10^{-8}$ M. Der relativ große Fehler beruht auf der Variation zwischen den einzelnen Messungen. Vermutlich waren vor allem Beschichtungsunterschiede zwischen den verschiedenen Chargen der Deckgläschenbeschichtung dafür verantwortlich. Denn die Kurven einer einzelnen Messung ließen sich in Bezug auf die K_d -Werte gut anpassen. Die in Abbildung 4.7 gezeigte Messung ergab beispielsweise einen K_d -Wert von $8,6 \pm 2,9 \times 10^{-9}$ M. Der Fehler einer einzelnen Messung konnte in späteren Messungen, wie sie im Rahmen der Untersuchung bivalenter Liganden durchgeführt wurden (Abschnitt 4.5), teilweise auf weniger als 10 % verkleinert werden. Durch eine höhere Reproduzierbarkeit der Beschichtung sollten

4.3 Bindungstitrationen auf Vancomycin

Tabelle 4.1: Ausgewählte Bindungskonstanten von Kaa an Vancomycin, die mit verschiedenen Methoden gemessen wurden. Bei den zwei letzten Beispielen wurde Ac-Kaa über die Lysinseitenkette auf der Oberfläche immobilisiert.

Messmethode	eingesetzte(r) Ligand(en)	K_d [μM]
UV-Differenzspektroskopie ^[74]	Ac-K(Ac)aa/Ac-K(Dansyl)aa	1,0
UV-Differenzspektroskopie ^[75]	Ac-K(Ac)aa/Ac-K(Dansyl)aa	21
Fluoreszenzspektroskopie ^[76]	Ac-K(Ac)aa/Ac-K(Fluo)aa	1,1
SPR ^[77]	Docosanoyl-K(Ac)aa	0,71
SPR ^[78]	Ac-Kaa	0,37
RfS ^[79]	Ac-Kaa	0,13

sich demzufolge die oben angegebenen Gesamtfehler verringern lassen.

Aus den Kurvenanpassungen konnten darüber hinaus Werte für die immobilisierte Menge an Vancomycin $n_{A_0^*}$ erhalten werden. Wenn die gesamte mit Vancomycin beschichtete Oberfläche der acht Flecken mit 10 mm^2 genähert wurde, ergab sich so eine Rezeptordichte auf der Oberfläche von $1,3$ Molekülen/ nm^2 . Diese Zahl entspricht der Oberflächenbelegung, die durch die Beschichtung mit Vancomycinlösungen unterschiedlicher Konzentrationen abgeschätzt wurde (Abschnitt 3.3). Im Gegensatz zu K_d ließ sich $n_{A_0^*}$ nur zuverlässig bestimmen, wenn die gemessenen Werte kaum von der theoretischen Kurve abwichen, da die Werte für $n_{A_0^*}$ bei der Kurvenanpassung empfindlich auf kleinste Abweichungen reagierten. Andererseits beeinflusst $n_{A_0^*}$ jedoch kaum die anderen Parameter bei der Kurvenanpassung. So änderten sich die anderen Parameter nur unwesentlich, wenn bei der Kurvenanpassung feste Werte für $n_{A_0^*}$ vorgegeben und innerhalb mehrerer Größenordnungen variiert wurden. Selbst wenn die Kurvenanpassung physikalisch nicht sinnvolle Werte für $n_{A_0^*}$ lieferte, ergaben sich für die anderen Parameter trotzdem Werte in der richtigen Größenordnung.

Für das Vancomycinsystem wurden mehrere Bindungskonstanten veröffentlicht, die mit verschiedenen Messmethoden bestimmt wurden.^[74-79] Da die einzelnen Messmethoden zur Bestimmung molekularer Wechselwirkungen unterschiedliche Anforderungen an die untersuchten Objekte stellten, kamen jeweils leicht modifizierte Liganden zum Einsatz (Tabelle 4.1). Die veröffentlichten K_d -Werte reichen von $0,13\ \mu\text{M}$ ^[79] bis $21\ \mu\text{M}$,^[75] wobei die

meisten bei $\approx 1 \mu\text{M}$ liegen. Falls sowohl Vancomycin als auch der Ligand in Lösung vorliegen, befinden sich die veröffentlichten Bindungskonstanten im mikromolaren Bereich. Verglichen damit zeigten die fluoreszenten Liganden eine um ungefähr zwei Größenordnungen stärkere Bindung an das immobilisierte Vancomycin. Die stärkere Bindung könnte durch die Immobilisierung eines der Bindungspartner erklärt werden. Ein Vergleich mit SPR- oder RfS-Daten, bei denen das Tripeptid verankert war und Vancomycin in Lösung vorlag, zeigt jedoch, dass immer noch ein Unterschied von mehr als einer Größenordnung bleibt. Diese Erhöhung der Bindungsstärke legt einen Einfluss der Fluorophore nahe. Ein weiteres Argument dafür ist, dass die K_d -Werte für die Fluo- und TAMRA-markierten Peptide um eine Größenordnung voneinander abweichen. Obwohl die Fluorophore selber nicht in einem messbaren Ausmaß an die vancomycinbeschichtete Oberfläche binden, steuern sie im Zusammenhang des gesamten Moleküls offensichtlich zusätzliche Wechselwirkungsstellen bei. Für eine farbstoffabhängige Zunahme der Bindungsstärke spricht auch die große Menge an unmarkiertem Peptid, die nötig war, um die Bindung des markierten Liganden signifikant zu kompetieren.

4.4 Konkurrenztitration auf Vancomycin

Die bisher vorgestellte Methode der Bindungstitration kann die Bindungsstärke von Liganden auf einem Array aus Rezeptoren nur messen, wenn ein fluoreszentes Analogon des Liganden existiert. Dabei darf der Fluorophor keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Spezifität der Bindung besitzen, da sonst die Bindung des Fluorophors und nicht die des untersuchten Liganden gemessen würde. Für die Suche nach neuen Ligandmolekülen und um die Bindungskonstante von unmarkierten Liganden zu bestimmen, ist deshalb eine Konkurrenztitration nötig. Hierbei wird die Bindung eines bereits bekannten, fluoreszenten Referenzliganden gemessen, während die zu untersuchende, unmarkierte Verbindung ebenfalls in der Lösung vorliegt. Je stärker diese um die gleichen Bindungsstellen konkurriert, desto mehr wird die Bindung des Referenzliganden abgeschwächt.

In Konkurrenz von Fluo-Ahx-Kaa mit dem unmarkierten Ligandpeptid Ac-Kaa wurde so eine Bindungskonstante von Ac-Kaa gemessen. Für die Bestimmung der Bindungskonstante diente die zuvor für das fluoresceinmarkierte Peptid gemessene Bindungskonstante als Referenz. Die Deckgläschen,

4.4 Konkurrenztitration auf Vancomycin

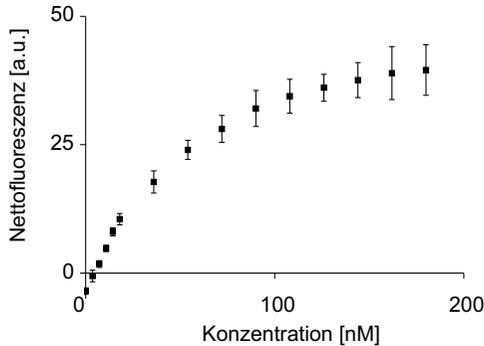


Abbildung 4.8: Konkurrenztitration eines vancomycinbeschichteten Deckgläschens mit Fluo-Ahx-Kaa. Dieses war mit Ac-Kaa (10 μM) in Phosphatpuffer vorinkubiert. Die Nettofluoreszenz des jeweiligen Gleichgewichtszustandes ist gegen die zugegebene Ligandkonzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen den ausgewerteten Flecken innerhalb des Arrays.

die mit dem Rezeptorarray und fluoreszenten Kontrollflecken beschichtet waren, wurden in eine Halterung eingespannt und mit einer Lösung von Ac-Kaa (10 μM) in Phosphatpuffer inkubiert. Analog zu den Bindungstitrationen wurde nun nach und nach die Lösung mit Fluo-Ahx-Kaa zugegeben. Wie erwartet stieg die Nettofluoreszenz im Gleichgewicht langsamer an als ohne kompetierenden Liganden (Abbildung 4.8).

Die Auswertung erfolgte ebenfalls auf Basis der Langmuirschen Adsorptionsisotherme. Im folgenden bezeichnet B wie im vorangehenden Abschnitt einen fluoreszenten Liganden, C bezeichnet den unmarkierten. Wenn die Titration mit B in Gegenwart eines kompetierenden Liganden C durchgeführt wird, verringert dieser Ligand die Anzahl an freien Rezeptoren, so dass die Assoziationsgeschwindigkeit von B verlangsamt wird. Dadurch ändert sich die Langmuir-Isotherme zu

$$n_{AB^*} = \frac{n_{A_0^*} [B]}{K_{d_{AB^*}} + [B] + \frac{K_{d_{AB^*}}}{K_{d_{AC^*}}} [C]} \quad (4.9)$$

Unter Berücksichtigung der Verarmung an Ligand B, ergibt die Lösung von

4 Messungen auf Mikroarrays

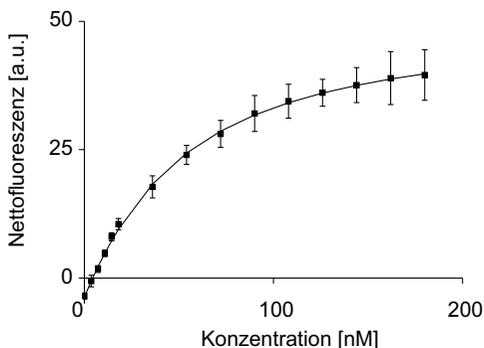


Abbildung 4.9: Ergebnis der Kurvenanpassung mit einer modifizierten Langmuirschen Adsorptionsisotherme für die Messwerte aus Abbildung 4.8.

Gleichung 4.9 ebenfalls Gleichung 4.7, wobei sich D jedoch zu

$$D = n_{A_0^*} + V K_{d_{AB^*}} + V [B_0] + V \frac{K_{d_{AB^*}}}{K_{d_{AC^*}}} [C] \quad (4.10)$$

berechnet. Mit dieser Lösung für n_{AB^*} und für D wurde Gleichung 4.5 für die Kurvenanpassung benutzt. Für $K_{d_{AB^*}}$ wurde der Wert eingesetzt, der zuvor durch Bindungstitrationen mit dem fluoreszenten Liganden bestimmt wurde. Die modifizierte Langmuirsche Adsorptionsisotherme war sehr gut geeignet, um die Messwerte zu beschreiben (Abbildung 4.9). Mit Hilfe der Kurvenanpassung konnten so Werte für die Dissoziationskonstante des unmarkierten Liganden ($K_{d_{AC^*}}$) und die immobilisierte Menge an Rezeptor ($n_{A_0^*}$) bestimmt werden.

Wenn für $K_{d_{AB^*}}$ der in Abschnitt 4.3 bestimmte Wert für Fluo-Ahx-Kaa eingesetzt wird, ergibt sich durch die Kurvenanpassung ein K_d -Wert von $2,3 \pm 1,5 \times 10^{-6}$ M für den unmarkierten Liganden. Der Wert, der mit der Konkurrenztitration auf einem Vancomycinarray bestimmt wurde, lag somit im selben Bereich wie die Literaturwerte (Tabelle 4.1). Darüber hinaus steht der Unterschied zwischen den Bindungskonstanten des markierten und des unmarkierten Liganden in Übereinstimmung mit dem hohen Überschuss an Ac-Kaa, der in Abschnitt 4.1 für eine wirksame Konkurrenz benötigt wurde.

4.5 Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden

Es könnte sein, dass sich bei der Auswertung der Konkurrenztitration mit Hilfe einer zuvor in Bindungstitrationen bestimmten Bindungskonstante ein und derselbe Fehler gerade aufhebt. Dennoch legt diese Übereinstimmung nahe, dass auch die bei der direkten Bindungstitration in Abschnitt 4.3 gemessenen Werte die Bindungskonstanten der fluoreszenten Liganden richtig oder wenigstens in der richtigen Größenordnung wiedergeben. Die Ergebnisse der beiden Abschnitte zeigen somit, dass mit konfokaler Detektion die Bindung von Liganden an eine Rezeptorbeschichtete Oberfläche verfolgt werden kann. Es lassen sich Bindungskurven aufnehmen und es lassen sich Bindungskonstanten bestimmen. Das Potenzial dieser Methode liegt darin, dass sie völlig flexibel hinsichtlich der Gestaltung und Herstellung der Mikroarrays ist. Sie lässt sich problemlos miniaturisieren und eröffnet somit die Perspektive, zeitgleich viele Rezeptoren im Mikroarray gegen einen Liganden zu testen. Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt, dass die vorgestellte Auswertemethode Bindungskonstanten im richtigen Größenordnungsbereich liefert. Für eine exaktere Bestimmung von Bindungskonstanten steht allerdings eine weitere Optimierung noch aus. Die Mikroarrays müssten mit anderen Messmethoden noch zuverlässiger hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit überprüft werden. Auch müsste diskutiert werden, inwiefern bei der Auswertung weitere Faktoren zu berücksichtigen sind. Beispielsweise legt eine leichte Abnahme der Nettofluoreszenz auf dem Kontrollfleck im Laufe der Messung nahe, eine Bleichkorrektur aufzunehmen. Im Hinblick auf den schnellen Ligandenaustausch am Vancomycin und die geringe Abnahme am Kontrollfleck wurde in diesen beiden Abschnitten darauf verzichtet. Wie der nächste Abschnitt zeigt, könnte die Bleichung aber durchaus ins Gewicht fallen.

4.5 Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden

Es konnte gezeigt werden, dass mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Bindungskonstanten an einer Rezeptorbeschichteten Oberfläche ermittelt werden können. Um die Anwendbarkeit auf Mikroarrays mit vielen verschiedenen Rezeptoren zu gewährleisten, sollte deswegen im nächsten Schritt untersucht werden, ob sich auf einem Mikroarray tatsächlich simultan verschiedene Bindungskurven aufnehmen lassen. Eine Möglichkeit wäre,

4 Messungen auf Mikroarrays

verschiedene Rezeptoren einzusetzen, die denselben Liganden mit bekannten, unterschiedlichen Bindungskonstanten binden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass nur ein einziger Rezeptor jedoch in unterschiedlicher Dichte auf der Oberfläche immobilisiert wird. Wird auf solch einem Mikroarray ein bivalenter Ligand eingesetzt, sollten sich für ein und denselben Rezeptor in Abhängigkeit von der Rezeptordichte zwei verschiedene Bindungskurven ergeben. Prinzipiell sollte ein bivalenter Ligand stärker binden als ein monovalenter Ligand. Unterhalb einer kritischen Dichte sind die einzelnen Rezeptormoleküle auf der Oberfläche jedoch im Mittel zu weit von einander entfernt, als dass ein bivalenter Ligand mit beiden Bindungsstellen gleichzeitig binden kann. In diesem Fall sollte die Bindungskurve des bivalenten Liganden der eines monovalenten Liganden ähneln. Um zu überprüfen, ob verschiedene Bindungskurven auf einem Array gemessen werden können, wurde in dieser Arbeit die zweite Möglichkeit gewählt. Denn dieser Aufbau bietet gleichzeitig eine neue Möglichkeit, Mikroarrays zu charakterisieren. Wenn für einen bivalenten Liganden in Abhängigkeit von der Rezeptordichte die zugehörigen Bindungskurven bestimmt sind, könnten bivalente Liganden auf Oberflächen, bei denen die Rezeptordichte unbekannt ist, dazu eingesetzt werden, um Aussagen über die Rezeptordichte auf der Oberfläche zu treffen.

Als Modellsystem diente wieder Vancomycin. Dementsprechend musste ein Molekül synthetisiert werden, das zweimal die C-terminale Peptidsequenz D-Ala-D-Ala enthält.^[100] Auf das N-terminale L-Lysin wurde hier verzichtet, da die Hauptbindungsaffinität in der Erkennung des N-acylierten Dipeptids liegt^[68] (siehe auch Abbildung 2.8). Für die Synthese wurde an fester Phase ein Peptid mit Lysin als Verzweigungsstelle aufgebaut. Nach Umpolung der freien Aminogruppen mit Bernsteinsäureanhydrid konnten fertige D-Ala-D-Ala-Einheiten ankondensiert werden. Durch eine orthogonale Schutzgruppenstrategie ließ sich über eine weitere Aminogruppe ein Fluorophor einführen, in diesem Fall Fluorescein (Abbildung 4.10). Nach Entschützung, Abspaltung und Aufreinigung mit HPLC konnte so ein bivalenter Ligand für Vancomycin mit hoher Reinheit werden (Abbildungen 4.11 und 4.12). Wichtig war vor allem eine kurze Aktivierungszeit mit Pfp-Trifluoracetat (Schritt 5 in Abbildung 4.10), da die C-Termini bei längerer Pfp-Aktivierung mit dem Amidstickstoff der Bernsteinsäurepeptidbindung zum Bernsteinsäureimid zyklisierten, was zu einer verringerten Ausbeute führte.^[100]

Für die Herstellung unterschiedlicher Vancomycindichten wurden die in

4.5 Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden

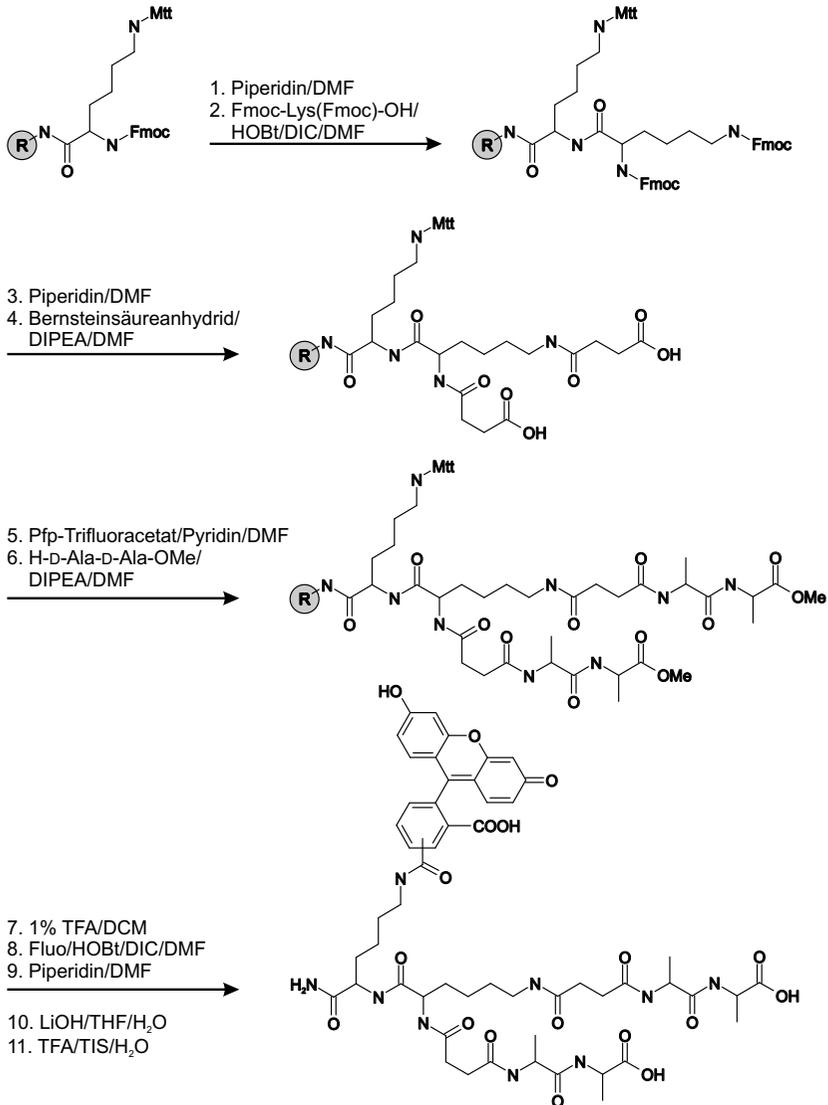


Abbildung 4.10: Reaktionsschema der Synthese des bivalenten Liganden^[100]

4 Messungen auf Mikroarrays

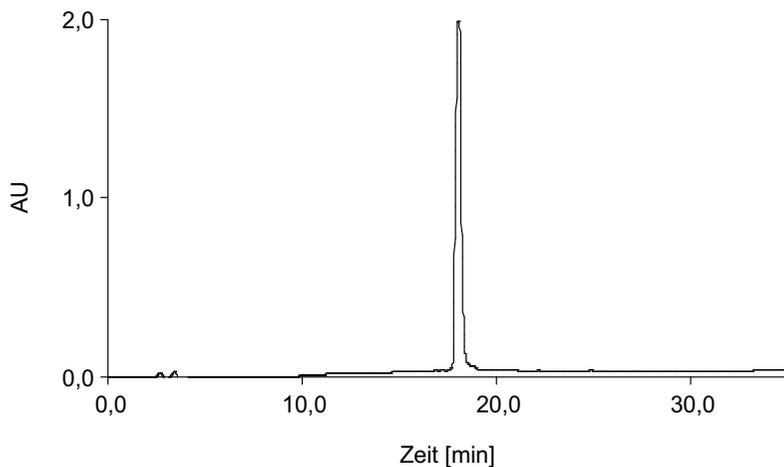


Abbildung 4.11: HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 214 \text{ nm}$) des bivalenten Vancomycinliganden bei einem Gradienten von 10 % auf 100 % ACN in 35 min.

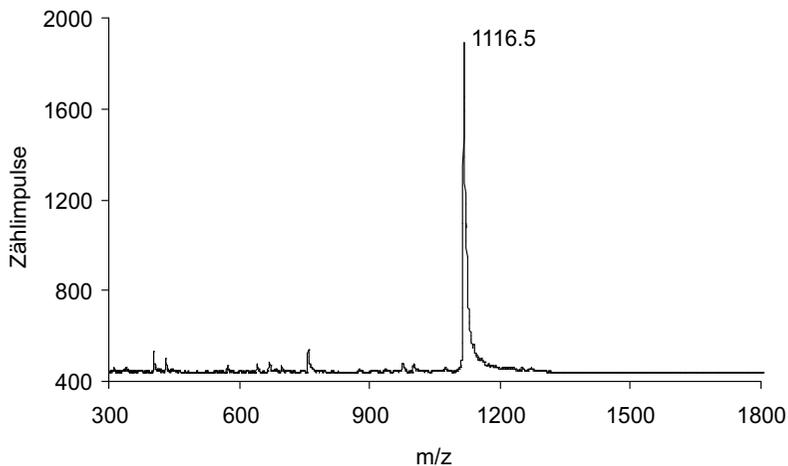


Abbildung 4.12: MALDI-MS-Spektrum des gereinigten, bivalenten Vancomycinliganden (berechnete Masse: 1116,2 m/z).

4.5 Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden

Abschnitt 3.3 aufgeführten Erkenntnisse über die für die Beschichtung nötigen Konzentrationen aufgegriffen. Nach diesen Ausführungen sollte eine $100\ \mu\text{M}$ Konzentration für eine vollständig belegte Oberfläche ausreichen, während mit einer $1\ \mu\text{M}$ Konzentration keine vollständige Belegung erreicht werden kann. Wird ein Mikroarray hergestellt, bei dem für die einzelnen Flecke verschiedene Vancomycinlösungen verwandt werden, deren Konzentrationen in diesem Bereich liegen, sollte für den bivalenten Liganden sowohl eine monovalente Bindung als auch eine stärkere Bindung zu beobachten sein. Bei der stärkeren Bindung sollte bereits für niedrigere Ligandkonzentrationen als bei einer monovalenten Bindung eine Sättigung der vancomycinbeschichteten Flecke eintreten. Die Flecke, die mit Vancomycinlösungen höherer Konzentration hergestellt waren, sollten demzufolge stärker gekrümmte Bindungskurven ergeben als die Flecke, die aus Vancomycinlösungen geringerer Konzentration hergestellt waren.

Die Optimierung der Oberflächenbeschichtung zeigte jedoch auch, dass durch eine geringe Vancomycinkonzentration nicht ohne weiteres eine gleichmäßige Beschichtung mit vereinzelt Vancomycinmolekülen erhalten wurde. Die beobachteten Inhomogenitäten (Abbildung 3.4) deuteten an, dass in einzelnen Bereichen des Flecks fast gar kein Vancomycin immobilisiert wurde, während es in anderen Bereichen in hoher Dichte vorlag. Die für eine vollständige Beschichtung unzureichende Vancomycinkonzentration hatte offensichtlich zu einer Oberfläche geführt, auf der sich innerhalb eines Flecks dicht beschichtete Bereiche inselartig mit nahezu unbeschichteten Teilen abwechselten.

Um die Homogenität zu erhöhen, wurde die $100\ \mu\text{M}$ Vancomycinlösung deshalb nicht in Phosphatpuffer verdünnt sondern in verschiedenen Verhältnissen mit einer $100\ \mu\text{M}$ Lösung von Aminoethanol (in Phosphatpuffer) gemischt. Durch den Zusatz eines Amins stand so eine von der Verdünnung des Vancomycins unabhängige Konzentration an Aminogruppen für die Anbindung an die Oberfläche zur Verfügung. Es sollte sich trotz eines abnehmenden Vancomygingehalts immer eine vollständige Absättigung der Epoxygruppen ergeben und somit eine relativ gleichmäßige Verteilung des Vancomycins auf der Oberfläche. Die Verdünnung der Vancomycinlösung mit Aminoethanol wird im Folgenden über das prozentuale Mischungsverhältnis der beiden $100\ \mu\text{M}$ Lösungen angegeben. Dabei bleibt zu beachten, dass diese Prozentzahl wahrscheinlich nicht die tatsächliche Zusammensetzung auf der Oberfläche widerspiegelt. Einerseits kann das Gemisch vor der Immobilisierung aufgrund des höheren Dampfdrucks des Aminoethanols an

4 Messungen auf Mikroarrays

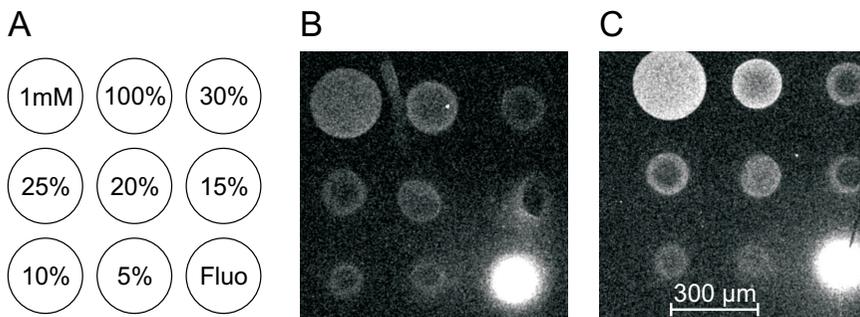


Abbildung 4.13: Zwei Mikroarrays mit Vancomycinflecken unterschiedlicher Dichte. (A) Beschichtungsschema der Mikroarrays (Fluo: Fluo-Ahx-KAA), (B) Inkubation mit Fluo-Ahx-Kaa (4 nM), (C) Inkubation mit dem bivalenten Liganden (4 nM). Bei (C) sind größere Helligkeitsunterschiede zwischen den verschiedenen Vancomycinflecken zu sehen als bei (B). Der größere Fleck für die 1 mM Vancomycinlösung ergab sich durch den Einfluss der zehnfach höheren Konzentration auf das Ausbreitungsverhalten des Lösungstropfens.

Aminoethanol verarmen, andererseits dürfte die geringe Größe von Aminoethanol im Vergleich zu Vancomycin eine schnellere Assoziationskinetik für Aminoethanol und somit einen geringeren Prozentsatz für Vancomycin an der Oberfläche ergeben als es dem Prozentsatz in der Lösung entspricht. Um einen exakten Zusammenhang zwischen der zur Beschichtung eingesetzten Konzentration und der resultierenden Anzahl der Vancomycinmoleküle pro Fläche zu erhalten, müsste eine molekular aufgelöste Charakterisierung der Oberfläche erfolgen. Für die untersuchte Fragestellung stand jedoch nicht die gezielte Herstellung einer bestimmten Vancomycinkonzentration auf der Oberfläche im Vordergrund. Die Verdünnungsreihe sollte lediglich sicherstellen, dass auf manchen Flecken keine Möglichkeit zu einer bivalenten Bindung gegeben war, um dadurch unterschiedliche Bindungskurven zu erzeugen. Im Gegensatz zu den Verdünnungsreihen in Phosphatpuffer wurden so für alle Vancomycinkonzentrationen relativ homogene Flecken erhalten. Sie zeigen lediglich eine gleichmäßige Aufkonzentrierung des Vancomycins gegen den Rand hin (Abbildung 4.13).

Die Untersuchung der Ligandbindung an die Mikroarrays erfolgte mit

4.5 Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden

Hilfe von Bindungstitrationen. Auf allen Vancomycinflecken ließen sich sowohl für Fluo-Ahx-Kaa als auch für den bivalenten Liganden Bindungskurven aufnehmen. Wie zu erwarten war, erreichte die Nettofluoreszenz auf Flecken mit größerer Vancomycindichte einen höheren Sättigungswert bei hohen Ligandkonzentrationen. Für den Vergleich der Bindungsstärke waren jedoch die Krümmungen der Kurven entscheidend und nicht die Endwerte. Um die Krümmungen eindeutig beurteilen und besser vergleichen zu können, wurden die Kurven auf ihren jeweiligen Mittelwert normalisiert. Dieses Verfahren ist robust gegenüber Ausreißern und vermeidet eine asymptotische Bestimmung des Endwerts. Zur Normalisierung wurde aus allen Messwerten einer Kurve der Mittelwert gebildet und jeder Messwert durch diesen Mittelwert geteilt. In der so entstandenen Kurvenschar sollten Kurven gleicher Krümmung den identischen Verlauf aufweisen. Dies war im Rahmen der Messgenauigkeit für den monovalenten Liganden Fluo-Ahx-Kaa bei allen eingesetzten Vancomycindichten der Fall (Abbildung 4.14 A). Für die normalisierte Kurve, die auf den mit einer 1 mM Vancomycinlösung beschichteten Flecken gemessen wurde und die somit einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen der Abschnitte 4.3 und 4.4 bietet, ergab die Kurvenanpassung der abgebildeten Bindungstitration beispielsweise einen K_d -Wert von $3,0 \pm 0,4 \times 10^{-9}$ M.

Für den bivalenten Ligand war bereits auf den bei der Bindungstitration aufgenommenen Bildern zu sehen, dass die Helligkeit auf den Vancomycinflecken hoher Dichte schneller zunahm als bei Fluo-Ahx-Kaa. So zeigte sich für den bivalenten Liganden bei niedrigen Ligandkonzentrationen ein größerer Helligkeitsunterschied zwischen den Vancomycinflecken unterschiedlicher Dichte als für Fluo-Ahx-Kaa (Abbildung 4.13). Die schnellere Helligkeitszunahme spiegelte sich in den normalisierten Bindungskurven darin wieder, dass die Kurven eine steilere Anfangssteigung besaßen, früher die Sättigung erreichten und somit stärker gekrümmt waren (Abbildung 4.14 B). Um eine Bindungskonstante für den bivalenten Liganden zu ermitteln, wurde auch hier beispielhaft die abgebildete, normalisierte Kurve für den mit einer 1 mM Vancomycinlösung beschichteten Fleck ausgewertet. Da der Abfall der Kurve im Sättigungsbereich auf eine Bleichung zurückzuführen sein könnte, wurden die Messwerte für die Ligandkonzentrationen 40 nM, 50 nM und 60 nM bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Während bei Fluo-Ahx-Kaa die Bleichung der Liganden an der Oberfläche vermutlich über einen schnellen Austausch der gebundenen Liganden mit ungebleichten Liganden aus der Lösung kompensiert werden konnte, war dieser Aus-

4 Messungen auf Mikroarrays

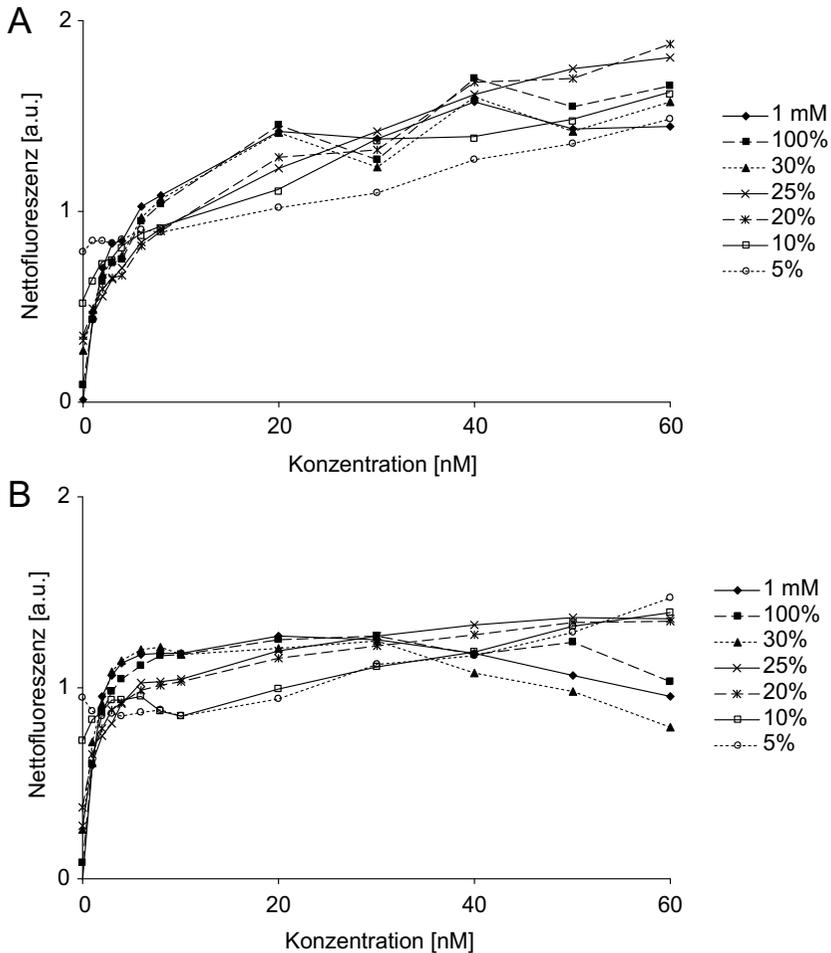


Abbildung 4.14: Bindungstitrations auf mit unterschiedlichen Vancomycinkonzentrationen beschichteten Deckgläschen mit (A) Fluo-Ahx-Kaa und (B) dem bivalenten Liganden. Die Nettofluoreszenz der einzelnen Flecken ist auf den Mittelwert der jeweiligen Kurve normalisiert aufgetragen. Die hohen Anfangswerte bei den geringen Vancomycindichten resultieren aus der durch die Normalisierung bedingten Verstärkung einer auf allen Flecken auftretenden, leichten Hintergrundfluoreszenz.

4.5 Messung der Rezeptordichte mit bivalenten Liganden

tausch bei der bivalenten Anbindung offensichtlich verlangsamt. Ohne diese drei Messwerte lieferte die Kurvenanpassung für den bivalenten Liganden einen K_d -Wert von $3,0 \pm 0,7 \times 10^{-10}$ M. Die Bindung des bivalenten Liganden war also um eine Größenordnung stärker als die von Fluo-Ahx-Kaa.

Aus der Kurvenschar ließ sich aber gleichzeitig entnehmen, dass diese stärkere Bindung nur bei den Flecken mit hoher Vancomycindichte auftrat. Im Gegensatz zu der für Fluo-Ahx-Kaa gemessenen Kurvenschar wiesen die für den bivalenten Liganden gemessenen Kurven auf den Flecken mit geringerer Dichte einen Kurvenverlauf auf, der in jeder Messung reproduzierbar in der in Abbildung 4.14 B gezeigten Weise von den Kurven auf den Vancomycinflecken hoher Dichte abwich. Am Anfang stiegen zwar alle Kurven relativ steil an, doch am weiteren Verlauf der Kurven war zu erkennen, dass auf den Flecken mit geringer Vancomycindichte (5 % und 10 %) bei 60 nM noch keine Sättigung erreicht war und die Kurven weiter anstiegen. Diese Steigung entsprach in etwa der Steigung der Kurvenschar, die für Fluo-Ahx-Kaa erhalten wurde (Abbildung 4.14 A). Auf den mit 20 % und 25 % Vancomycin beschichteten Flecken ergab sich ein Kurvenverlauf, der zwischen diesen beiden Extremen lag. Es wurden auf den Vancomycinflecken geringerer Dichte somit zwar keine Bindungskurven gemessen, die genau dem Kurvenverlauf der monovalenten Fluo-Ahx-Kaa-Bindung entsprachen, doch ließen die unterschiedlichen Kurvenverläufe eindeutige Rückschlüsse auf Bindungen verschiedener Bindungsstärken zu. Die tendenziellen Unterschiede in der Bindungsstärke entsprachen den Erwartungen.

Eine zufriedenstellende Kurvenanpassung der Kurven auf den Vancomycinflecken geringer Dichte war mit der in Abschnitt 4.3 hergeleiteten Funktion nicht möglich. Der zugrunde liegende Bindungsmechanismus geht von einem einheitlichen Bindungsprozess auf einer homogen mit Rezeptoren beschichteten Oberfläche aus. Für eine quantitative Auswertung der Bindungskurven des bivalenten Liganden auf diesen Flecken und für eine Bestimmung von Bindungskonstanten müssten für die Funktion zur Kurvenanpassung weitere Faktoren berücksichtigt werden. Beispielsweise könnte die steile Anfangssteigung in Kombination mit dem sich anschließenden, dem monovalenten Liganden entsprechenden, weiter ansteigenden Kurvenverlauf darauf hindeuten, dass bei diesen Flecken trotz einer geringen Vancomycindichte innerhalb der ausgewerteten Flächen Bereiche existierten, in denen die Vancomycindichte für eine bivalente Bindung ausreichte. Die Auswertung der Kurven müsste deshalb berücksichtigen, dass sich unter dieser Annahme die einzelnen Kurven aus der Überlagerung zweier unterschiedli-

cher Bindungsvorgänge zusammensetzen.

Ein weiteres Problem für eine zufriedenstellende Kurvenanpassung liegt in der bei der Herleitung der Funktion angewandten, rechnerischen Behandlung der Ligandverarmung. Diese Problematik betrifft nicht nur das Modellsystem mit dem bivalenten Liganden sondern ganz allgemein Mikroarrays, bei denen sich an den einzelnen Arraypunkten unterschiedliche Bindungsstärken ergeben. Die zur Berechnung der Bindungskonstanten nötige Konzentration an freiem Ligand wird in Abschnitt 4.3 mit Hilfe der Daten des Rezeptorflecks berechnet, für den auch die Bindungskonstante bestimmt werden soll. Es wird also nur ein einziger Prozess der Ligandverarmung berücksichtigt, nämlich die Anbindung an die im System vorhandenen Bindungsstellen mit genau dieser Bindungsstärke. Die Funktion ist für einen Rezeptorfleck somit nur anwendbar, wenn im ganzen System keine anderen Prozesse auftreten, die zu einer Ligandverarmung der Lösung führen, oder wenn diese vernachlässigbar sind. Für die stärkste Bindung im System, beispielsweise die bivalente Kurve auf den 1 mM Vancomycinflecken sollte diese Kurvenanpassung demzufolge in guter Näherung anwendbar sein. Darauf deutet auch das Ergebnis der Kurvenanpassung (siehe oben) hin. Bezüglich der Flecke mit schwächeren Bindungen reicht diese Korrektur jedoch nicht aus.

Wenn die Konzentration an freiem Ligand im Gleichgewichtszustand nicht gemessen werden kann, sondern über die Ligandzugabe berechnet werden soll, müssten somit für Mikroarrays, bei denen auf jedem Fleck eine andere Bindungskonstante erwartet wird, zur Berechnung der Ligandverarmung alle Bindungsgleichgewichte und deren Bindungskonstanten berücksichtigt werden. Für die Kurvenanpassung würde dies bedeuten, dass die Kurven höchstens in der Reihenfolge von der stärksten zur schwächsten Bindung näherungsweise einzeln der Reihe nach ausgewertet werden könnten. In die Auswertung einer schwächeren Bindung müsste die Ligandverarmung durch jede bereits bestimmte, stärkere Bindung einfließen. Für eine genauere Bestimmung der Bindungskonstanten müssten jedoch in einer algorithmischen Kurvenanpassung für jede Kurve die aktuellen Werte aller anderen Kurven mit einbezogen werden.

Mit dem entwickelten Verfahren der Bindungstitration und der sich anschließenden quantitativen Auswertung bis hin zur Auftragung von Bindungskurven ließ sich also für den bivalenten Liganden auf jedem Fleck des Mikroarrays eine für diesen Fleck spezifische Bindungskurve messen. Die erhaltene Kurvenschar erlaubte durch einen qualitativen Vergleich der Kur-

venverläufe Rückschlüsse auf die relativen Bindungsstärken. Mit Bindungstitrationen sollten sich somit auf beliebigen Mikroarrays für jeden Fleck spezifische Bindungskurven messen und relative Bindungsstärken für die jeweilige Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung erhalten lassen. Mit Hilfe eines geeigneten Kurvenanpassungsalgorithmus sollte auch eine weitere Auswertung der Kurven hin zu Bindungskonstanten für jede einzelne Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung möglich sein. Da die Bindungskurven reproduzierbar für eine bestimmte Vancomycindichte charakteristisch waren, können mit Hilfe des bivalenten Ligand außerdem Rückschlüsse über Belegungsdichten gewonnen werden. So könnten mit diesem System neue Beschichtungsprotokolle hinsichtlich der Rezeptordichte und Homogenität einer Beschichtung überprüft und optimiert werden.

4.6 Bindungsstudien mit Zellysat

In den vorigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass sich mit den hergestellten Mikroarrays Rezeptor-Ligand-Bindungen spezifisch und quantitativ untersuchen lassen. Die Experimente wurden wie für physikalisch-chemische Messungen üblich unter Bedingungen durchgeführt, bei denen sich der Ligand in einer definierten Lösung befand. Eine Anwendung in der Bioanalytik erfordert jedoch häufig Messungen in komplexen Stoffgemischen. In einem weiteren Schritt sollte deshalb gezeigt werden, dass sich die hergestellten Mikroarrays in Kombination mit konfokaler Detektion auch dazu eignen, die Wechselwirkung eines Proteins mit seiner Zielstruktur im komplexen Gefüge aller Proteine einer Zelle zu untersuchen. Als Modellsystem wurde die Bindung von ZAP-70 an eine Peptidsequenz mit phosphorylierten Tyrosinresten ausgewählt. An dieselbe Peptidsequenz ohne Phosphorylierung sollte keine Bindung stattfinden.

In einem Mikroarray wurden neben einer fluoreszenten Kontrolle sowohl Peptide mit der phosphorylierten (P2) als auch mit der entsprechenden nicht phosphorylierten Sequenz (P3) immobilisiert. ZAP-70 kam im Gegensatz zu den Peptidliganden der vorigen Abschnitte nicht in aufgereinigter Form zum Einsatz sondern als Bestandteil des komplexen Proteingemisches, das nach der Lyse von Zellen erhalten wurde. Für die Messung wurden die beschichteten Deckgläschen in die Halterung eingespannt und mit frisch hergestelltem Zellysat inkubiert. Die für die Lyse eingesetzten Zellen überexprimierten ZAP-70 als Fusionsprotein mit YFP. Als fluoreszente

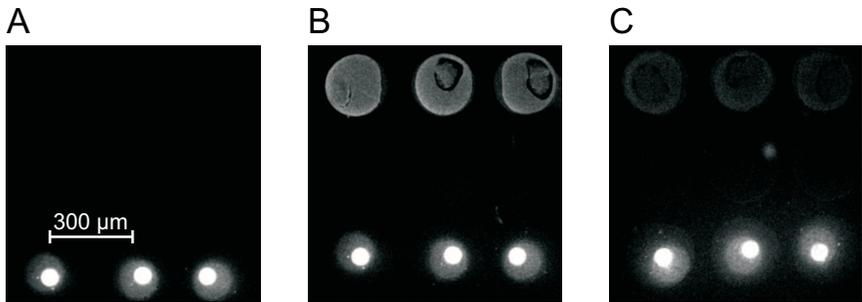


Abbildung 4.15: 3×3 -Mikroarrays während der Inkubation mit (A) Lysepuffer, (B) Lysat von unstimulierten Zellen und (C) Lysat von per- vanadatstimulierten Zellen. Die drei Zeilen der Arrays wurden mit den Peptiden P2 (oben), P3 (Mitte) und Fluo-Ahx-KAA (unten) beschichtet.

Kontrolle wurde wie bei den Vancomycinarrays Fluo-Ahx-KAA verwendet, da Fluorescein auch mit der für YFP optimalen Wellenlänge von 514 nm ausreichend gut anregbar ist. Eine Durchmischung des Zellysats auf dem Mikroarray durch wiederholtes Pipettieren beschleunigte die Diffusion des YFP-markierten ZAP-70 an die Oberfläche und somit die Bindung.

Bereits 1 min nach Zugabe des Zellysats auf den Mikroarray traten die P2-beschichteten Flecke hell vor dem Hintergrund hervor, während auf P3 keine Bindung beobachtbar war (Abbildung 4.15 B). Wenn dem Lysepuffer während der Lyse der Zellen bereits gelöstes P2 ($1 \mu\text{M}$) zugesetzt wurde, konnte die Bindung an die P2-beschichteten Flecke vollkommen kompetiert werden. Die hohe Nettofluoreszenz auf den P2-beschichteten Flecken im Gegensatz zu der fehlenden Helligkeitszunahme auf den Flecken mit P3 oder auf den Flecken mit P2 bei Konkurrenz mit gelöstem P2 wies eindeutig darauf hin, dass eine spezifische Bindung beobachtet werden konnte. Eine unspezifische Anlagerung von ZAP-70-YFP an die Peptidsequenzen spielte höchstens eine untergeordnete Rolle. Dies bedeutet, dass die Peptidsequenzen in ausreichendem Maße für die bindenden Domänen von ZAP-70 zugänglich waren. Mikroarrays, die nach dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll hergestellt waren, ließen sich also dazu einsetzen, Bindungen selbst im hochkomplexen Gemisch eines Zellysats zu beobachten, in dem weitere Proteine oder sonstige Moleküle spezifisch oder unspezifisch um die Bindung konkurrieren konnten. Außerdem zeigte der hohe Kontrast zwi-

schen den P2-beschichteten Flecken und dem PEG-beschichteten Hintergrund, dass die PEG-Beschichtung gegenüber einem Protein wie ZAP-70 ausreichend gut die unspezifische Anlagerung verhindern konnte. In Kombination mit den Ergebnissen für eine zellresistente Beschichtung in Abschnitt 3.5 und in Kombination mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu proteinresistenten PEG-Beschichtungen^[58-61] liegt die Vermutung nahe, dass eine nach dem Protokoll dieser Arbeit hergestellte PEG-Beschichtung in der Lage ist, allgemein die unspezifische Anlagerung von Proteinen stark zu vermindern.

Der Versuchsaufbau mit ZAP-70 diente gleichzeitig dazu, die Anwendungsmöglichkeiten der Mikroarrays auf Fragestellungen der Zellbiologie zu erweitern. Mit Hilfe von Antikörpermikroarrays^[7] wird bereits untersucht, wie die Anzahl der Proteine in der Zelle im Laufe des Zellzyklus' oder als Reaktion auf äußere Einflüsse schwankt. In der funktionellen Proteomanalyse ist zusätzlich von Interesse, wie sich aufgrund von äußeren Einflüssen das Verhältnis von Proteinen in ihrer gebundenen und ungebundenen Form ändert. Dadurch könnte ermittelt werden, welche Proteine an der Weiterleitung von Signalen beteiligt sind. Wird die Zelle beispielsweise zu einem Zeitpunkt lysiert, bei dem ZAP-70 an den T-Zell-Rezeptor bindet, ist die Zelle an freiem ZAP-70 verarmt. Für die Bindung an die Oberfläche steht dann weniger ZAP-70 zur Verfügung als beim entsprechenden Kontrolllysats. Durch die direkte Untersuchung des Zelllysats sollte es somit möglich sein, die Reaktion der Zelle auf äußere Faktoren sichtbar zu machen.

Um diese unterschiedlichen Ausgangssituationen zwischen freiem und gebundenem ZAP-70 herbeizuführen, wurde ein Teil der Zellen vor der Lyse mit Pervanadat stimuliert, während der andere Teil wie beim vorigen Versuch nur in HBS suspendiert wurde. Durch die Pervanadatstimulation sollte ZAP-70 an den T-Zell-Rezeptor binden und daher im Lysat nur in komplexierter Form ohne freie Bindungsstelle vorliegen. Wie oben beschrieben, traten die P2-beschichteten Flecke bei der Inkubation mit dem Lysat unstimulierter Zellen hell vor dem Hintergrund hervor. Bei der Inkubation mit dem Lysat stimulierter Zellen war dagegen kaum eine Helligkeitszunahme zu verzeichnen (Abbildung 4.15 C). Die Flecke blieben allerdings auch nicht vollkommen dunkel, wie es der Fall war, wenn bei der Lyse unstimulierter Zellen freies, kompetierendes P2 zugesetzt wurde. Im Lysat der stimulierten Zellen liegt demzufolge noch bindefähiges ZAP-70 vor, jedoch deutlich weniger als bei den unstimulierten Zellen.

Durch einfache Zugabe von Zelllysats auf einen Mikroarray lassen sich

4 Messungen auf Mikroarrays

so Aussagen über die zum Zeitpunkt der Lyse in den Zellen vorhandenen, bindefähigen Proteine treffen. Ändert sich die Anzahl an bindefähigen Proteinen durch äußere Stimulation, kann dies sichtbar gemacht werden, noch bevor die Zelle ihr Expressionsmuster ändert und oligonukleotidbasierte Mikroarrays oder Antikörpermikroarrays in der Lage sind, Informationen zu liefern. Dadurch eröffnet sich über proteinbindende Mikroarrays eine einfache Analysemöglichkeit, die Reaktion von Zellen auf äußere Einflüsse zu messen. So könnten Peptidmikroarrays in Kombination mit einem Nachweis der bindenden Signaltransduktionsproteine beispielsweise mit Hilfe von fluoreszenten Antikörpern dazu eingesetzt werden, ein Muster der bindefähigen Proteine zu erzeugen und über eine Veränderung des Musters in Folge äußerer Einflüsse die molekularen Wechselwirkungen in Zellen zu verfolgen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mikroarrays erlauben mit Hilfe einer geeigneten Auslesemethode die gleichzeitige Untersuchung vieler Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. In dieser Arbeit wurde eine einfache Prozedur entwickelt, mit der sich beliebige Mikroarrays aus Thiolen oder Aminen herstellen ließen. Diese Mikroarrays konnten erfolgreich für verschiedene Fragestellungen eingesetzt werden, in denen die Bindung fluoreszent markierter Liganden an immobilisierte Rezeptoren untersucht wurde. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass mit konfokaler Detektion im Mikroarrayformat Bindungskonstanten gemessen werden können.

Das optimierte Protokoll zur Herstellung der Mikroarrays bietet alternativ zu anderen publizierten Protokollen^[37, 101, 102] eine neue Möglichkeit, in nur drei Schritten aus gängigen Substanzklassen Mikroarrays für Protein- und Zelluntersuchungen zu erzeugen. Der Silanisierungsschritt aktivierte die Glasoberfläche bereits so, dass direkt das Aufpipettieren der gelösten Thiole oder Amine folgen konnte. Die Spezifität der molekularen Erkennung wurde bei den untersuchten Substanzen durch eine Immobilisierung nach diesem Protokoll nicht beeinträchtigt. Mit nur einem einzigen weiteren Schritt konnte zusätzlich die unspezifische Anlagerung von Liganden oder Zellen außerhalb der Substanzflecken des Mikroarrays verringert werden. Das Zellwachstum konnte so auf die einzelnen Flecke des Mikroarrays eingegrenzt werden. Mit diesem einfachen, kostengünstigen Protokoll entstanden bei minimiertem Verbrauch an Thiolen oder Aminen innerhalb von 24 h vielseitig anwendbare Mikroarrays.

Das konfokale Fluoreszenzmikroskop erwies sich als gut geeignet, Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen auf den Mikroarrays in Anwesenheit einer fluoreszenten Ligandlösung zu untersuchen. So ließ sich ein möglicher Einsatz dieser Kombination aus konfokaler Mikroskopie und Mikroarrays für vier unterschiedliche Fragestellungen aufzeigen. Erstens ließ sich die Anbindung der Liganden über die Zeit verfolgen. Beim gewählten Modell-

5 Zusammenfassung und Ausblick

system konnte allerdings nur die Konvektion an die Oberfläche beobachtet werden, da die Assoziationskinetik um Größenordnungen schneller war. Zweitens konnten Bindungskonstanten bestimmt werden, indem das Bindungsgleichgewicht zwischen fluoreszenten D-Ala-D-Ala-Liganden und immobilisiertem Vancomycin bei unterschiedlichen Konzentrationen vermessen wurde. Wenn in Konkurrenz gearbeitet wurde, konnte selbst für einen unmarkierten Liganden eine Bindungskonstante für die Bindung an immobilisiertes Vancomycin bestimmt werden. Drittens ließen sich mit Hilfe von bivalenten Liganden Aussagen über die Rezeptordichte auf der Oberfläche treffen. Viertens konnte die Kompatibilität mit Fragestellungen der funktionellen Proteomanalyse aufgezeigt werden. Selbst bei Inkubation mit einem unaufgereinigten Zellysat konnten die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen spezifisch untersucht werden. Es konnte sichtbar gemacht werden, dass das untersuchte Protein ZAP-70 in Abhängigkeit von einer vorangegangenen Stimulation der Zellen in unterschiedlichem Ausmaß in einem bindefähigen Zustand vorlag.

Anhand der Ligandbindung an Vancomycin, die für die ersten drei Fragestellungen als Modellsystem diente, konnten die Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung einer konfokalen Detektion für die oben genannten Fragestellungen aufgezeigt werden. Werden die Wechselwirkungen mit Hilfe fluoreszenter Liganden untersucht, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Helligkeitsunterschiede im konfokalen Fluoreszenzmikroskop quantitativ mit der Bindungsstärke und der Konzentration der Liganden in Beziehung setzen lassen. Die konfokale Detektion erlaubte somit die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen direkt in Lösung ohne zusätzliche Waschschritte. Dadurch ließen sich beispielsweise im Gegensatz zu den starken Bindungen auf DNA-Mikroarrays Bindungen mit Bindungskonstanten im oberen nanomolaren Bereich untersuchen. Die auf Mikroarrays angepasste Messmethode der Bindungstitration und die dafür entwickelte Auswerterroutine waren gut geeignet, um auf den Mikroarrays Bindungskonstanten zu bestimmen. Es wurde nicht bestimmt, wie hoch die Bindungsstärke mindestens sein muss, damit eine Bindung detektiert werden kann. Die Grenze dürfte nach den Erfahrungen mit Vancomycin bei Bindungskonstanten im unteren mikromolaren Bereich liegen. Dass sich parallel verschiedene Bindungskonstanten messen lassen, wenn unterschiedliche Rezeptoren immobilisiert sind, kann aus den Ergebnissen mit dem bivalenten Liganden geschlossen werden. Die Detektion mit dem Mikroskop erlaubte eine beliebige Gestaltung der Mikroarrays. Die Miniaturisierung sollte nur

durch die optische Auflösung der Mikroskopie begrenzt sein. Die angewandte Methode der Bindungstitration minimiert, verglichen mit Durchfluss-Messsystemen, den Probenverbrauch, der für die Messung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen nötig ist. Allerdings erfordert sie eine komplexe Datenverarbeitung, solange nicht mit anderen Messmethoden die Konzentration an freien Liganden im Gleichgewicht gemessen wird. Die Ergebnisse mit den Zellysaten deuten darauf hin, dass die hergestellten Mikroarrays selbst in komplexen Mischungen eine spezifische Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in Lösung zulassen. Eine Bestimmung von Bindungskonstanten würde wegen der kompetitiven Bindungssituation jedoch zu geringe Werte liefern.

Aufgrund dieser Eigenschaften wäre es denkbar, dass Bindungstitrationen mit fluoreszenten Liganden und die Detektion mit einer konfokalen Optik in der Wirkstoffsuche eingesetzt werden, um im großen Maßstab Rezeptor- oder Ligandbibliotheken auf gute Bindungspartner zu durchsuchen. Mit Hilfe von geeigneten, fluoreszenten Referenzliganden müssten in einer kompetitiven Titration die untersuchten Moleküle nicht einmal fluoreszent markiert werden. Zweitens könnte die Reaktion von Zellen auf eine Substanzbibliothek untersucht werden. Durch die Unterbindung des Zellwachstums außerhalb der Substanzflecken kann jede adhärente Zelle nur mit der Substanz eines einzigen Flecks in Kontakt kommen. Wenn sich die Reaktion der Zelle in ein fluoreszentes Signal umwandeln läßt, könnte so in miniaturisierter Form die Wirkung vieler Substanzen eindeutig ausgelesen werden. Und schließlich erfüllt die vorgestellte Kombination alle Anforderungen, um in der funktionellen Proteomanalyse eingesetzt zu werden. Durch einfache Inkubation eines Mikroarrays mit Zellysat könnte an jedem Fleck für das dort bindende Protein bestimmt werden, in welchem Ausmaß das jeweilige Protein in einem Zellysat in bindefähigem Zustand vorliegen. In Kombination mit einer vorangehenden Stimulation der Zellen, könnte so auf einfache Weise untersucht werden, wie sich das Muster aus gebundenen und ungebundenen Proteinen in der Zelle durch eine Stimulation verändert. Die Bindung der in der Zelle ungebunden vorliegenden Proteine an den Mikroarray könnte beispielsweise über fluoreszent markierte Antikörper sichtbar gemacht werden.

Die nach diesem Protokoll hergestellten Mikroarrays und die aufgezeigten Eigenschaften einer konfokalen Detektion könnten also sowohl eingesetzt werden, um im ersten Schritt Bindemotive für Proteine zu finden, als auch, um im zweiten Schritt den aktuellen Bindungsstatus der Proteine bei der

5 Zusammenfassung und Ausblick

Reaktion der Zellen auf unterschiedliche Reize zu untersuchen. Sie könnten dazu beitragen, über die Aufklärung solcher Bindemuster die komplexen Wechselwirkungen der Proteine einer Zelle zu verstehen.

A Methoden

A.1 Chemikalien und Lösungen

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Aldrich (Steinheim) und Merck (Darmstadt) bezogen (sämtliche verwendete Lösungsmittel in p. a. Qualität). Für die HPLC wurden Acetonitril (Lichrosolv) und Trifluoressigsäure (Uvasol) von Merck (Darmstadt) und Wasser aus einer Millipore Milli-Q 185 Filtrationsanlage (Millipore, Eschborn) verwendet. Funktionalisierte Polystyrol-Harze stammten von NovaBiochem (Heidelberg) und Rapp Polymere (Tübingen), Monoamino-PEG ebenfalls von Rapp Polymere. Die Aminosäurederivate wurden von Novabiochem (Heidelberg) geliefert, H-D-Ala-D-Ala-OMe-HCl von Bachem (Heidelberg). Trypsin wurde von Biochrom (Berlin) als Lösung von Trypsin (0,5 %) und EDTA (0,2 %) in zehnfach konzentriertem PBS bezogen. BSA und Glucose stammte von Sigma (Deisenhofen), Penicillin/Streptomycin von Boehringer (Mannheim) und Vancomycin von Fluka (Neu-Ulm). Das Zellkulturmedium Iscoves modified DMEM mit Glutamax (HEPES gepuffert) sowie alle weiteren Zusätze für die Zellkulturmedien wurden von GibcoBRL (Eggenstein) verwendet. HBS, dem direkt vor Gebrauch Glucose (5 mM) und BSA (0,1 % w/v) zugesetzt wurden, enthielt HEPES (10 mM), NaCl (135 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (1 mM) und CaCl₂ (1 mM) in Millipore Wasser, eingestellt auf pH 7,4.

A.2 Festphasensynthese

A.2.1 Harze und Harzbelegung

Für die Synthese von Peptiden mit C-terminaler Carboxygruppe wurden TCP-Harz oder 2-Chlortritylchlorid-Harz verwendet, für Peptide mit C-terminaler Amidgruppe Rink-Amid-Harz. Das 2-Chlortritylchlorid-Harz musste vor dem ersten Zyklus mit der ersten Aminosäure vorbelegt werden,

A Methoden

während die anderen Harze direkt eingesetzt werden konnten. Das Harz wurde für die Vorbelegung mit trockenem DCM gewaschen und, bezogen auf die Stoffmenge an aktiven Gruppen auf dem Harz, mit Fmoc-Aminosäure (3 eq), DIPEA (6 eq) und soviel DCM versetzt, dass sich der Ansatz gut schütteln ließ. Nach 2 h Kupplungsdauer wurde abfiltriert und dreimal mit DCM gewaschen. Nicht umgesetzte, reaktive Gruppen wurden durch Schütteln mit Methanol (10 eq) und DIPEA (10 eq) in DCM abgesättigt. Nach Abfiltrieren wurde jeweils dreimal mit DCM, Methanol und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Belegung des Harzes mit Fmoc-Aminosäure wurde mit UV/Vis-Spektroskopie (Lambda 5 UV/Vis-Spektrometer, Perkin-Elmer, Überlingen) überprüft. Trockenes Harz (10 mg) wurde in einem 10 ml-Meßkolben mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF (500 µl) 30 min lang geschüttelt. Danach wurde mit DMF auf 10 ml aufgefüllt. Als Referenz für die Hintergrundkorrektur wurde in einem zweiten 10 ml-Messkolben die entsprechende Piperidinlösung ohne Harz angesetzt. Das UV-Spektrum des gebildeten N-(9-Fluorenylmethyl)-piperidinadduktes enthält zwischen 250 nm und 320 nm drei Maxima mit den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{267} = 17\,500 \text{ cm}^2/\text{mol}$, $\varepsilon_{289} = 5\,800 \text{ cm}^2/\text{mol}$ und $\varepsilon_{301} = 7\,800 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Die Harzbelegung x [mmol/g] ergibt sich aus der gemessenen Extinktion E_λ bei Verwendung von 1 mm-Küvetten nach der Formel

$$x = \frac{100\,000 \cdot E_\lambda}{(\varepsilon_\lambda \cdot \text{Einwaage Harz (mg)})} \quad (\text{A.1})$$

als Mittelwert der drei Maxima.

A.2.2 Peptidsynthese

Die Peptidsynthese wurde an einem Peptidsynthesizer (RSP 5032, Tecan, Hombrechtlikon, Schweiz; Software Syro von MultiSynTech, Bochum) automatisiert durchgeführt. Als Reaktoren wurden Einwegspritzen mit Filterfritte verwendet, die in zwei Syntheseblöcken mit Absaugvorrichtung für je 48 Peptide angeordnet waren, so dass parallel 96 verschiedene Peptide synthetisiert werden konnten. Die Standard-Syntheseyklen sind Tabelle A.1 zu entnehmen, alle Angaben beziehen sich auf eine Ansatzgröße von 15 µmol an reaktiven Gruppen. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren an das Harz erfolgte in 10-fachem Überschuss mit DIC/HOBt-Aktivierung. Für eine Fluoreszenzmarkierung wurde das Harz zweimal mit HOBt, DIC und

Tabelle A.1: Standard-Synthesesyklus

Operation	Reagenz	Volumen [μ l]	Zeit [min]
Quellen	DMF	500	10
Entschützen	Piperidin/DMF (1:1)	250	15
Waschen	DMF	500	9×1
Kupplung	0,5 M Fmoc-Aminosäure/HOBt in DMF	300	50
	1 M DIC in DMF	150	
Waschen	DMF	500	3×1

Fluo oder TAMRA (von allem je 5 eq, bezogen auf die freien Aminogruppen auf dem Harz) in DMF (400 μ l) versetzt und jeweils 20 h unter Lichtausschluß geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgesaugt, das Harz mit DMF, DCM, Methanol und Diethylether (jeweils 3×2 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Mehrfach gekuppeltes Fluo^[29] wurde vor dem Waschschrift während 8 min im Durchfluss mit Piperidin/DMF (1:4) entfernt. Um eine freie Aminogruppe am N-Terminus zu acetylieren, wurden Acetanhydrid/DMF/DIPEA (1:8:1, 600 μ l) auf das gequollene Harz gegeben. Nach einer Kupplungszeit von 1 h wurde die Reaktionslösung abgesaugt, das Harz mit DMF, DCM, Methanol und Diethylether (jeweils 3×2 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Vollständigkeit der manuellen Kupplungsschritte wurde mit dem Kaiser-Test, d.h. dem Ninhydrintest für primäre Aminofunktionen überprüft. Dazu wurde das Syntheseharz mit einigen Tropfen eines Gemisches aus KCN/Wasser/Pyridin (33 mg/50 ml/98 ml), Ninhydrin/n-Butanol (500 mg/10 ml) und Phenol/n-Butanol (80 g/20 ml) 5 min bei 110 °C erhitzt. Wenn das Harz dann eine braune Farbe annimmt und die Lösung gelb bleibt, beträgt die Kupplungsausbeute 100 %, bei (hell-) blauem Harz und blaugrüner bis hellblauer Lösung ca. 95 % und bei dunkelblauem Harz und blauer bis dunkelblauer Lösung maximal 85 %, wobei die Färbung auch von der am Harz aufgebauten Verbindung und der N-terminalen Aminosäure abhängt.

Die Abspaltung der Peptide erfolgte mit TFA/TIS/Wasser (95 : 2,5 : 2,5, 1 ml). Nach 3 h wurde die Abspaltlösung abfiltriert und zur Fällung der Peptide mit Diethylether (4 ml) versetzt. Die Peptide wurden abzentri-

Tabelle A.2: Kürzel für Peptide mit längeren Sequenzen

Kürzel	Peptidsequenz
P1	SIINFEK(Fluo)LRQIKIWFQNRMRMKWKKaa-OH
P2	C-Ahx-NQL p YNELNLGRREE p YDVL-NH ₂
P3	Ac-C-Ahx-NQLYNELNLGRREEYDVL-NH ₂

fugiert, die Etherüberstände abdekantiert, der Niederschlag mit Diethylether (2 ml) versetzt und wieder dispergiert. Die Waschschritte wurden zweimal wiederholt. Anschließend wurden die ausgefällten Peptide in tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert. Tabelle A.2 zeigt die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwandten Peptide, die im Text nur mit Kürzel erwähnt sind.

A.2.3 Synthese des bivalenten Liganden

Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-Lys(Fmoc)-OH wurden nach dem Protokoll der Peptidsynthese auf Rink-Amid-Harz gekuppelt. Durch die anschließende Abspaltung der Fmoc-Gruppen am zweiten Lysinrest verdoppelt sich die Anzahl der freien Aminogruppen.^[100] Die α - und ε -Aminogruppen wurden in 4 h mit Bernsteinsäureanhydrid (12 eq) und DIPEA (12 eq) in DMF zu Carboxygruppen umgepolt. Um das Peptid in einem inversen Kupplungsschritt zu verlängern, folgte eine Aktivierung der Carboxygruppen auf dem Harz durch Umsetzung zu einem Pfp-Ester. Dazu wurde das Harz in DMF suspendiert und nach schrittweiser Zugabe von Pyridin (20 eq) und Pentafluorphenyltrifluoracetat (10 eq) genau 1,5 h geschüttelt. Nach Waschen mit wasserfreiem DMF wurde das Harz 6 h mit H-D-Ala-D-Ala-OMe·HCl (10 eq) und DIPEA (20 eq) in DMF geschüttelt, so dass die Aminogruppe das Pentafluorphenol aus dem Ester verdrängte. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Harz mit DMF, Methanol, DCM und Diethylether gewaschen. Die Mtt-Schutzgruppe ließ sich selektiv entfernen, indem das Harz 10 min im Durchfluss mit TFA (1 %) in DCM behandelt und anschließend gewaschen wurde. Auf die freigewordene Aminogruppe konnte Fluo, wie in Abschnitt A.2.2 beschrieben, aufgekuppelt werden. Die Verseifung der Methylester erfolgte 1 h mit LiOH (8 eq) in THF/Wasser (2:1). Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach Standardprotokoll.

A.2.4 Analytik

Analytische Trennungen wurden mit Reversed-Phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) auf einer Anlage von Waters (Waters 600, Waters, Eschborn, mit UV-Detektor Lambda-Max (Modul 482) und Data Modul 740) mit einem linearen Gradientensystem aus Wasser (mit 0,1 % v/v TFA) und Acetonitril (mit 0,1 % v/v TFA) unter Verwendung von Nukleosil 300 C₁₈ Säulen (5 µm Korngröße, 250 × 2 mm, Grom, Herrenberg) bei einem Fluss von 300 µl/min durchgeführt. Die Reinheit der Verbindungen wurde durch Integration der Peakflächen bei $\lambda = 214$ nm bestimmt, wobei Unterschiede in den Extinktionskoeffizienten jedoch keine absoluten Gehaltsangaben ermöglichten. Produkte mit einer Reinheit von weniger als 80 % wurden unter den gleichen Bedingungen für die Laufmittel bei einem Fluss von 10 ml/min auf einer präparativen RP-HPLC-Anlage (Multisolvent Delivery System, Waters, Eschborn, mit Detektor Lambda-Max (Modul 481 LC) und Data Modul 740) mit einer Nukleosil 300 C₁₈ Säule (5 µm Korngröße, 250 × 20 mm, Grom, Herrenberg) aufgereinigt.

Die Identität der Verbindung wurde mit einem Triple Quadrupol Elektrospray-Massenspektrometer (ES-MS, VG Quattro II, Fisons Instruments, Manchester) oder mit einem Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight-Massenspektrometer (MALDI-TOF-MS, Hewlett Packard G2025A, Palo Alto, USA) überprüft. Für das ES-MS wurden jeweils 5 µl der in Acetonitril/Wasser (1:1) gelösten Proben injiziert. Für das MALDI-TOF-MS wurden der Reihe nach 0,7 µl der Dihydroxyacetophenon-Matrix (20 mg 2,5-Dihydroxyacetophenon und 5 mg Ammoniumcitrat gelöst in 1 ml 80 % Isopropanol) und 0,7 µl der zu analysierenden Substanz auf einen Goldträger getropft und im Vakuum eingedampft. Zur Signalerzeugung wurden in einem Vakuum von $1,33 \cdot 10^{-4}$ Pa mindestens 10 Laserschüsse im Single-Shot-Modus addiert.

A.3 Modifizierung von Glasoberflächen

Die Arrays wurden auf Deckgläschen vom Typ 1, BK7 mit 12 mm Durchmesser hergestellt. Abweichungen vom folgenden, optimierten Protokoll sind im Kapitel 3 vermerkt. Zuerst wurden die Deckgläschen im Ultraschallbad 5 min in einer Extranlösung mit Extran MA01/Wasser (1:4), sowie weitere 20 min im Ultraschallbad in Piranhalösung, einer frisch hergestellten Mi-

A Methoden

schung aus konz. H_2SO_4 /30 % v/v H_2O_2 (6:5), gereinigt. Anschließend wurden die Deckgläschen einzeln mit Wasser abgespült, mit gefilterter Druckluft bei Raumtemperatur trockengeblasen und jeweils sofort mit 40 μl GOPTS bedeckt. Nach 6 h Inkubation bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Wäageglas wurden sie mit Aceton gespült und mit gefilterter Druckluft trockengeblasen, bis keine GOPTS-Reste mehr auf der Oberfläche sichtbar waren.

Nach der Silanisierung wurde sofort der gewünschte Array auf die trockenen Deckgläschen aufgetropft. Alle zu immobilisierenden Substanzen wurden gelöst in Phosphatpuffer (100 mM, pH 8,0) eingesetzt. Die zugehörigen Stammlösungen (1 mM in 100 mM Phosphatpuffer, pH 8,0) lagerten bei -20°C . Für nicht miniaturisierte Arrays wurde mit einer Pipette von Hand ein Muster von 3×3 Tropfen auf ein Deckgläschen pipettiert bei einem Tropfenvolumen von 0,3 μl . Um das Eintrocknen der Tropfen zu verhindern, wurden die Deckgläschen zusammen mit nassem Filterpapier mindestens 30 min in einem geschlossenen Wäageglas inkubiert. Für die Herstellung der Mikroarrays wurde ein Pipettierroboter (GeSiM NP2.0, GeSiM, Dresden) mit regelbarer Luftfeuchtigkeit eingesetzt. Bei einer Luftfeuchtigkeit von 80 % und einem Tropfenvolumen von 400 μl wurden an jedem Punkt des Arrays auf der Glasoberfläche im Abstand von 300–400 μm jeweils 3 Tropfen der gewünschten Substanz abgegeben (d.h. 1,2 nl pro Punkt). Insgesamt wurden die Deckgläschen mindestens 30 min bei 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Im Standardprotokoll wurden die Deckgläschen nach der Inkubation des Arrays, sobald alle Tropfen eingetrocknet waren, mit 80 μl O,O'-Bis-(2-aminopropyl)-polyethylenglykol 800 (Diamino-PEG) bedeckt und 16 h bei 70°C in einem geschlossenen Wäageglas inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden sie ausgiebig mit Wasser gespült, gegebenenfalls im Ultraschallbad in Wasser oder Phosphatpuffer vollständig gereinigt, erneut mit Wasser gespült, mit gefilterter Druckluft trockengeblasen und bei Raumtemperatur gelagert.

Alternativ kamen nach der Inkubation eines Arrays drei weitere Protokolle zum Einsatz. Erstens wurden manche Deckgläschen ohne weitere Modifizierung sofort wie oben beschrieben mit Wasser gespült, gereinigt und gelagert. Zweitens wurden manche Deckgläschen 16 h in 300 μl Ethanthiol gelegt, mit DMF gespült, 1 h in DMF gelegt und erneut mit DMF gespült, bevor sie wie oben beschrieben mit Wasser gespült, gereinigt und gelagert wurden. Drittens wurden manche Deckgläschen mit 40 μl einer Lösung des Monoamino-PEGs $\text{CH}_3\text{O-POE-NH}_2$ 2000 (5 mg/ml) in DCM bis zum Ein-

trocknen des DCMs bei Raumtemperatur und anschließend 16 h bei 70 °C inkubiert. Danach wurden sie wie oben beschrieben mit Wasser gespült, gereinigt und gelagert.

A.4 Datenerzeugung und -auswertung

A.4.1 Mikroskopie

Alle Bilder wurden mit einem inversen, konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Göttingen) aufgenommen. Für die Messung von Mikroarrays wurden ein Plan-Neofluar $5\times 0,15$ NA Objektiv und ein Plan-Neofluar $10\times 0,3$ NA Objektiv benutzt, für Zellaufnahmen ein C-Apochromat $63\times 1,2$ NA Wasserimmersionsobjektiv (alle Objektive Carl Zeiss, Jena). Das Mikroskop war mit einem Argon-Ionenlaser, der eine 458 nm-, eine 488 nm- und eine 514 nm-Linie lieferte, und zwei Helium-Neon-Lasern, die eine 543 nm-Linie bzw. eine 633 nm-Linie lieferten, ausgestattet. Fluorescein wurde bei 488 nm angeregt und mit einem BP 505–550 Filter detektiert, Tetramethylrhodamin wurde bei 543 nm angeregt und mit einem BP 560–615 Filter detektiert und YFP wurde bei 514 nm angeregt und mit einem BP 530–600 Filter detektiert.

Um die Bleichung der Fluorophore zu reduzieren, wurde eine niedrige Laserintensität gewählt und dafür mit hochempfindlicher Detektion gearbeitet. Die Empfindlichkeit wurde vorrangig durch Anhebung der Detektorspannung erhöht, erst in zweiter Linie wurde zusätzlich die Verstärkerspannung heraufgesetzt. Für Zeitreihen oder Bindungstitrationen wurden die Aufnahmeparameter so eingestellt, dass sie trotz unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Serie die Aufnahme aller Bilder der Serie bei nur einer Einstellung erlaubten. Wenn die Probe zwei Farbstoffe gleichzeitig enthielt, wurde die Multi-Track-Einstellung gewählt. Die Farbstoffe wurden so nicht simultan mit beiden Lasern gleichzeitig angeregt und detektiert sondern mit den oben genannten Einstellungen einzeln der Reihe nach. Anschließend wurden die Einzelbilder zu einem Bild beider Farbstoffe überlagert. Auf diese Weise wurde das Übersprechen zwischen den Detektionskanälen verringert.

Für die Aufnahme wurden die Deckgläschen mit der beschichteten Seite nach oben in eine Halterung (s. Abb. A.1) eingespannt. Auf diese Weise war die Oberfläche frei zugänglich und wässrige Lösungen konnten jederzeit

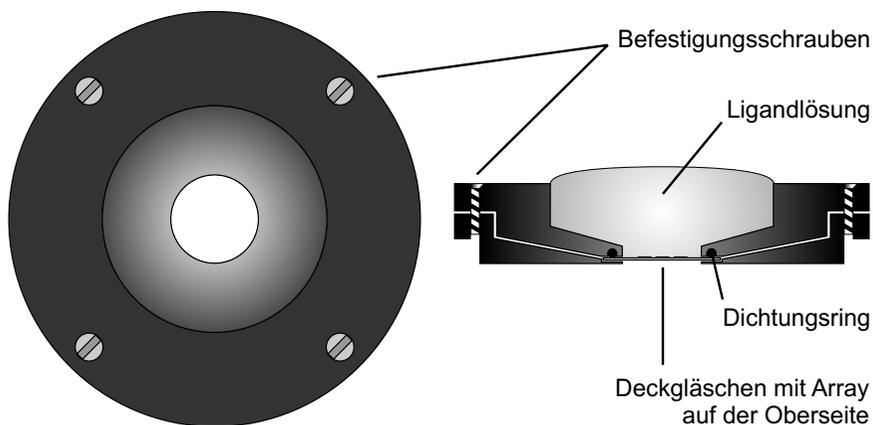


Abbildung A.1: Deckgläschenhalterung (Aufsicht und Schnitt)

während der Beobachtung zugegeben, gemischt oder entfernt werden. Um das gesamte Deckgläschen oder andere größere Bildausschnitte aufzunehmen, wurde das Deckgläschen computergesteuert mosaikartig abgerastert. Der Computer nahm so mit Hilfe des verfahrbaren Mikroskoptisches die eingestellte Anzahl an lückenlos aneinandergereihten Einzelbildern auf und erstellte daraus das Gesamtbild.

Bei Zeitreihen wurde das Deckgläschen mit 150 μl Ligandlösung inkubiert. Innerhalb von 20 min wurden 10–15 Bilder aufgenommen, anfangs mit 50 s-Intervallen, gefolgt von längeren Intervallen. Für Bindungstitrationen wurde das Deckgläschen mit 1 ml Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) inkubiert und ein Bild für die Hintergrundkontrolle aufgenommen. Danach wurden schrittweise je 5 μl Ligandlösung zugegeben, so dass sich nach der Verdünnung im vorgelegten Puffer Konzentrationen von 3 nM bis 1 μM einstellen. Die zutitrierten Ligandlösungen wurden aus den bei -20°C gelagerten Stammlösungen (1 mM in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,0) durch jeweils frische Verdünnung in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) hergestellt. Nach jeder Ligandzugabe wurde die Inkubationslösung auf dem Deckgläschen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Bei den ersten sieben Ligandzugaben wurde nach jeweils 4 min Wartezeit, bei den weiteren Zugaben nach 2 min Wartezeit ein Bild aufgenommen. Nach diesen Zeiten war annähernd das Bindungsgleichgewicht erreicht. Die Untersuchung der

Zelllysate entsprach der Vorgehensweise bei der Bindungstitration.

A.4.2 Datenverarbeitung

Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgte quantitativ mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Image Pro Plus 4.5 für Windows 2000, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA). Den rezeptorbeschichteten Flecken auf den Deckgläschen wurden Ellipsen einbeschrieben, wodurch die Flecke als „areas of interest“ (AOIs) definiert wurden; der umgebende Hintergrund wurde entsprechend durch ein Polygon definiert. Mit einem selbstprogrammierten Makro (siehe Anhang B) wurden alle definierten AOIs in allen Bildern einer Zeitreihe oder einer Titration analysiert und das Ergebnis in Excel exportiert und dort aufbereitet. Das Makro bestimmte für jede AOI die mittlere Intensität und deren Standardabweichung und berechnete für jeden Fleck die Nettofluoreszenz F , indem von der mittleren Intensität des jeweiligen Fleckes I_F die mittlere Intensität des Hintergrunds I_H des jeweiligen Bildes abgezogen wurde.

$$F = I_F - I_H \quad (\text{A.2})$$

Diese Subtraktion entfernt sowohl den Hintergrund, der aus dem Dunkelstrom des Detektors und des Signalwandlers resultiert als auch die Fluoreszenz von Liganden aus der darüber befindlichen Lösung. Wenn mehrere Flecke auf einem Array gleich beschichtet waren, wurden die ermittelten Fluoreszenzwerte vor der weiteren rechnerischen Verarbeitung jeweils gemittelt.

A.4.3 Datenanalyse

Der Bildkontrast wurde mit der Kontrastfunktion

$$\text{Kontrast} = (I_F - I_H)/(I_F + I_H) \quad (\text{A.3})$$

berechnet. Die Homogenität innerhalb eines Flecks wurde mit der Kovarianz ausgedrückt. Dazu wurde die Standardabweichung der Intensitäten aller Pixel innerhalb eines Flecks durch die jeweilige mittlere Intensität geteilt.

Für die Daten der Bindungs- und Kompetitionstitrationen wurde die Gleichung 4.5 mit Gleichung 4.7 als Lösung für n_{AB^*} zur Kurvenanpassung benutzt. D wurde für die Bindungstitration nach Gleichung 4.8 berechnet

A Methoden

und für die Konkurrenztitration nach Gleichung 4.10. Wenn mehrere Flecke auf dem Array gleich beschichtet waren, wurden für die Kurvenanpassung die gemittelten Kurven herangezogen. Während der Kurvenanpassung wurden bei beiden Titrationen die Werte für F_{\max} , F_0 , und die immobilisierte Menge an Rezeptor ($n_{A_0^*}$) variiert. Bei der Bindungstitration wurde zusätzlich der Wert der Dissoziationskonstanten ($K_{d_{AB^*}}$) variiert, wohingegen bei der Konkurrenztitration die Dissoziationskonstante ($K_{d_{AC^*}}$) variiert wurde, während für $K_{d_{AB^*}}$ der Wert eingesetzt wurde, der zuvor durch Bindungstitrationen mit dem fluoreszenten Liganden bestimmt worden war. Bei der Kurvenanpassung (Microcal Origin 6.1G, Northampton, USA) wurden die Daten statistisch gewichtet. Die ermittelten K_d -Werte entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Titrationen.

A.5 Zellkultur

A.5.1 Test auf zellresistente Beschichtungen

Die adhärenente, humane Melanomzelllinie SK-Mel-37, überlassen von Stefan Stefanović wurde bei 37 °C in feuchter Atmosphäre (5 % CO₂) in DMEM mit Penicillin G (10⁴ U/l), Streptomycin (100 mg/l), Geneticin (400 mg/l) und fötalem Kälberserum (10 %) gezogen. Die Zellen wurden zu ca. 15 000 Zellen/cm² ausgesät und nach 3–4 d, sobald sie konfluent waren, passagiert. Dazu wurden die adhärenenten Zellen 2 min mit einer Trypsinlösung inkubiert, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Megafuge, 1.0R, Heraeus), in neuem Medium resuspendiert und wieder ausgesät.

Die beschichteten Deckgläschen, die auf Zellresistenz getestet werden sollten, wurden vor dem Bewuchs mit Zellen in Ethanol (70 % v/v in Wasser) getaucht. Nach dem Trocknen in der Sterilbank wurden sie in Petrischalen gelegt und mit Medium bedeckt. Die SK-Mel-37-Zellen wurden in einer Dichte von ca. 15 000 Zellen/cm² ausgesät. Nach 1–2 d wurden die bewachsenen Deckgläschen entnommen und in HBS gewaschen. Nach dem Abtropfen des Puffers wurden die Deckgläschen in die Halterung eingespannt und während der Mikroskopie mit 1 ml HBS bedeckt. Alternativ wurden Ligandlösungen in HBS eingesetzt bzw. nach dem Protokoll für Bindungstitrationen einem bereits mit HBS inkubierten Deckgläschen zugegeben.

A.5.2 Zelllysate mit ZAP-70-YFP

Die murine T-Zell-Hybridomlinie 3A9 wurde bei 37 °C in feuchter Atmosphäre (5 % CO₂) in DMEM mit Natriumpyruvat (1 mM), nicht-essentiellen Aminosäuren (1 mM), Glutamin (1 mM), Penicillin G (10⁴ U/l), Streptomycin (100 mg/l), und fötalem Kälberserum (10 %, 45 min bei 56 °C inaktiviert) gezogen. Dem Medium wurden auf 500 ml zusätzlich 4,2 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt. Alle 2–3 d wurden die Suspensionszellen ungefähr 1:10–1:15 in frischem Medium verdünnt. Die 3A9-Zellen waren mit einem ZAP-70-YFP-Fusionsprotein transfiziert und wurden freundlicherweise von Annemarie C. Lellouch zur Verfügung gestellt.

Vor der Lyse der 3A9-Zellen wurde eine frische Pervanadatlösung hergestellt. Dazu wurden frische Lösungen von Na₃VO₄ in HBS (10 mM) und von 30 % v/v H₂O₂ in HBS (1:1000) angesetzt, 1:1 gemischt und bis zur Zugabe zur Zellsuspension 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert, in HBS resuspendiert und 9:1 mit Pervanadatlösung bzw. HBS gemischt. Nach 20 min bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und in Lysepuffer (10⁷ Zellen/ml) aufgenommen. Der Lysepuffer bestand aus einer auf pH 7,5 eingestellten Lösung von TRIS (20 mM), EDTA (1 mM), NaCl (150 mM) und Triton X100 (1 %) in Millipore-Wasser, der direkt vor Gebrauch Na₃VO₄ (1 mM) und „Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets“ (von Roche Diagnostics, Mannheim) zugesetzt wurden. Nach 15 min wurden die Zellreste bei 14 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand sofort für die Messungen eingesetzt.

B Makro für Image Pro Plus

Option Explicit

```
Dim aoiform() As String
Dim aoiwahl As Integer
Dim aoinummer As Integer
Dim aoianzahl As Integer
Dim bildnummer As Integer
Dim bildanzahl As Integer
Dim zeile As Integer
Dim spalte As Integer
Dim xlapp As Object
Dim xlbook As Object
Dim xlsheet As Object
Dim xlrange As Object
```

Sub TIFF_Konvertierung()

'<c>T

'Konvertiert LSM-Files in TIFF-Files

```
Dim erstesbild As String *255
Dim bildname As String *255
Dim bildpfad As String
Dim namenlänge As Integer
ret = IpStGetName("Bild oder Bilderserie (erstes Bild) auswählen", "D:\Martin\LSM-&
&Bilder", "*.LSM", erstesbild)
If ret = 0 Then Exit Sub
namenlänge = InStr(erstesbild, ".lsm")
namenlänge = namenlänge - 1
bildpfad = Left$(erstesbild, namenlänge)
If Right(bildpfad, 1) = "0" Then
namenlänge = namenlänge - 1
bildpfad = Left$(erstesbild, namenlänge)
bildnummer = 0
ret = IpWsLoadSetRes(0)
ret = IpWsLoad(bildpfad + LTrim$(Str$(bildnummer)) + ".lsm", "LSM")
Do
ret = IpStAutoName(bildpfad + "##.tif", bildnummer, bildname)
ret = IpWsSaveAs(bildname, "TIF")
ret = IpDocClose()
bildnummer = bildnummer + 1
ret = IpWsLoadSetRes(0)
On Error Resume Next
ret = IpWsLoad(bildpfad + LTrim$(Str$(bildnummer)) + ".lsm", "LSM")
Loop Until ret < 0
Else
```

B Makro für Image Pro Plus

```
ret = IpWsLoadSetRes(0)
ret = IpWsLoad(bildpfad + ".lsm","LSM")
ret = IpWsSaveAs(bildpfad + ".tif","TIF")
ret = IpDocClose()
End If
End Sub

Sub Standardarray()
'<<><s>A
'Wertet 3x3 Arrays aus
  ReDim aoiform(0) As String
  aoianzahl = 10
  bildanzahl = 0
  excel_erstellung
  ret = IpAppSelectDoc(0)
  ret = IpAppSelectDoc(DOCSEL_PREVID)
  ret = IpAppWindow("", bildanzahl, 1)
  formblatt(aoianzahl, bildanzahl)
  zeile = 7
  spalte = 3
  For bildnummer = 0 To bildanzahl
    ret = IpAppSelectDoc(bildnummer)
    zeile = 7
    For aoinummer = 1 To aoianzahl
      If aoinummer < 10 Then aoiform(0) = "Ellipse" Else aoiform(0) = "Polygon"
      aoiform(0) = aoiform(0) + LTrim$(Str$(aoinummer))
      ret = IpAoiManager(AOISSET, aoiform(0))
      If ret < 0 Then
        ret = IpMacroStop(aoiform(0) + " wurde nicht definiert!", MS_MODAL+MS_STOP)
        Exit Sub
      End If
      tropfenauswertung
      zeile = zeile + 2
    Next aoinummer
    spalte = spalte + 1
  Next bildnummer
  ret = IpAppCloseAll()
  excel_auswertung
  xlapp.Visible = True
  xlbook.ActiveSheet.Visible = True
  xlapp.WindowState = xlMaximized
  Set xlSheet = Nothing
  Set xlBook = Nothing
  Set xlapp = Nothing
End Sub

Sub Arrayauswertung()
'<<>A
'Wertet beliebige Arrayformate aus
  bildanzahl = 0
  excel_erstellung
  ret = IpAppSelectDoc(0)
  ret = IpAppSelectDoc(DOCSEL_PREVID)
  ret = IpAppWindow("", bildanzahl, 1)
  ret = IpStGetInt("Wieviele AOIs sollen ausgewertet werden?", aoianzahl, 1, 1, 20)
  If ret = 0 Then Exit Sub
```

```

formblatt(aoianzahl, bildanzahl)
zeile = 7
spalte = 3
ReDim aoiform(aoianzahl) As String
For aoinumner = 1 To aoianzahl
    ret = IpStGetInt("Welche Form hat die" + Str$(aoinumner) + ". AOI?" + vbCrLf + "(%
    &Ellipse = 1, Box = 2, Polygon = 3)", aoiwahl,1,1,3)
    If ret = 0 Then Exit Sub
    If aoiwahl = 1 Then
        aoiform(aoinumner) = "Ellipse"
    ElseIf aoiwahl = 2 Then
        aoiform(aoinumner) = "Box"
    ElseIf aoiwahl = 3 Then
        aoiform(aoinumner) = "Polygon"
    End If
    aoiform(aoinumner) = aoiform(aoinumner) + LTrim$(Str$(aoinumner))
Next aoinumner
For bildnummer = 0 To bildanzahl
    ret = IpAppSelectDoc(bildnummer)
    zeile = 7
    For aoinumner = 1 To aoianzahl
        ret = IpAoiManager(AOISET, aoiform(aoinumner))
        If ret < 0 Then
            ret = IpMacroStop(aoiform(aoinumner) + " wurde nicht definiert!", MS_MODAL+&
            &MS_STOP)
            Exit Sub
        End If
        tropfenauswertung
        zeile = zeile + 2
    Next aoinumner
    spalte = spalte + 1
Next bildnummer
ret = IpAppCloseAll()
If aoianzahl > 1 Then excel_auswertung Else xlsheet.Range(xlapp.Cells(1,1), xlapp.&
&Cells(1,1)).Select
xlapp.Visible = True
xlbook.ActiveSheet.Visible = True
xlapp.WindowState = xlMaximized
Set xlSheet = Nothing
Set xlBook = Nothing
Set xlapp = Nothing
End Sub

Function Tropfenauswertung() As Integer
    Dim skalierung As Integer
    Dim summe As Long
    Dim wert As Integer
    Dim statistik() As Single
    Dim daten() As Single
    ret = IpHstCreate()
    ReDim statistik(10) As Single
    ret = IpHstGet(GETSTATS, 0, statistik(0))
    datentransfer(zeile, spalte, statistik(0))
    zeile = zeile + 1
    datentransfer(zeile, spalte, statistik(1))
    zeile = zeile + 1

```

B Makro für Image Pro Plus

```
summe = 0
ret = IpHstGet(GETNUMPTS, 0, skalierung)
Redim daten(skalierung) As Single
ret = IpHstGet(GETVALUES, skalierung, daten(0))
For wert = 0 To skalierung - 1
    summe = summe + daten(wert)
Next wert
datentransfer(zeile, spalte, summe)
ret = IpHstDestroy()
End Function
```

```
Function formblatt(aois, bilder) As Integer
    Dim wort As String
    beschriftung(4, 2, "Aufnahme Nr.")
    beschriftung(5, 2, "Konzentration [nmol]")
    zeile = 7
    For aoinummer = 1 To aoianzahl
        wort = "Fläche " + LTrim$(Str$(aoinummer))
        beschriftung(zeile, 1, wort)
        beschriftung(zeile, 2, "mittlere Helligkeit")
        zeile = zeile + 1
        beschriftung(zeile, 2, "Standardabweichung")
        zeile = zeile + 1
        beschriftung(zeile, 2, "Gesamtzahl der Pixel")
        zeile = zeile + 2
    Next aoinummer
    spalte = 3
    For bildnummer = 0 To bildanzahl
        datentransfer(4, spalte, bildnummer)
        datentransfer(5, spalte, bildnummer*10)
        spalte = spalte + 1
    Next bildnummer
End Function
```

```
Function Excel_Erstellung() As Integer
    Excel_Erstellung = 0
    If initexcel(xlapp) < 0 Then
        Exit Function
    End If
    'Erstellt ein neues workbook
    Set xlbook = xlapp.Workbooks.Add
    xlbook.Activate
    Set xlsheet = xlbook.ActiveSheet
    xlsheet.Activate
    xlapp.Visible = True
    xlapp.WindowState = xlMinimized
End Function
```

```
Function InitExcel(ByRef xlApplication As Object) As Integer
'In "Referencs..." aus dem Edit menu die gewünschte Excel-Version auswählen!
    InitExcel = 0
    On Error Resume Next
    Err.Clear
    Set xlApplication = GetObject("Excel.Application")
    If Err.Number <> 0 Then
        Err.Clear
    End If
End Function
```

```

Set xlApplication = CreateObject("Excel.Application")
If Err.Number <> 0 Then
    MsgBox "Excel unauffindbar.", vbOkOnly+vbCritical, "OLE Error"
    InitExcel = -1
    Exit Function
End If
End If
xlApplication.Visible = True
If Err.Number <> 0 Then
    MsgBox "Fehler beim Anzeigen von Excel!", vbOkOnly+vbCritical, "OLE Error"
    InitExcel = -2
End If
End Function

Function beschriftung(ByRef x, y, wort) As Integer
    Dim xlLabels() As String
    beschriftung = 0
    ReDim xlLabels(1 To 1, 1 To 1) As String
    xlLabels(1,1) = wort
    xlSheet.Range(xlapp.Cells(x,y), xlapp.Cells(x,y)).Value = xlLabels
End Function

Function datentransfer(ByRef x, y, zahl) As Integer
    Dim xlData() As Single
    datentransfer = 0
    ReDim xlData(1 To 1, 1 To 1) As Single
    xlData(1,1) = zahl
    xlSheet.Range(xlapp.Cells(x,y), xlapp.Cells(x,y)).Value = xlData
End Function

Function excel_auswertung() As Integer
    Dim formel As String
    Dim zeile1 As Integer
    Dim zeile2 As Integer
    xlsheet.Columns("A:B").Select
    xlapp.Selection.Columns.AutoFit
    With xlsheet
        Sheets("Tabelle1").Select
        Sheets("Tabelle1").Name = "Daten"
        Sheets("Tabelle2").Select
        Sheets("Tabelle2").Name = "Auswertung"
        Sheets("Daten").Select
    End With
'Netto-Fluoreszenz berechnen
    For aoinummer = 1 To (aoianzahl - 1)
        zeile = aoianzahl * 4 + 7 + aoinummer
        zeile1 = (aoianzahl - aoinummer) * (-3) - aoianzahl - 4
        zeile2 = -aoinummer - 4
        formel = "=R[" + Str(zeile1) + "]C-R[" + Str(zeile2) + "]"
        Cells(zeile, 3).FormulaR1C1 = formel
    Next aoinummer
    Range(Cells(aoianzahl * 4 + 8, 3), Cells(aoianzahl * 5 + 6, 3)).Select
    Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(aoianzahl * 4 + 8, 3), Cells(aoianzahl&
    & * 5 + 6, bildanzahl + 3)), Type:=xlFillDefault
'in Auswertungsblatt kopieren
    Range(Cells(4, 3), Cells(5, bildanzahl + 3)).Select
    Selection.Copy

```

B Makro für Image Pro Plus

```
Sheets("Auswertung").Select
Range("B3").Select
ActiveSheet.Paste
Sheets("Daten").Select
Range(Cells(aoianzahl * 4 + 8, 3), Cells(aoianzahl * 5 + 6, bildanzahl + 3)).Select
Selection.Copy
Sheets("Auswertung").Select
Range("B5").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks _
:=False, Transpose:=False
'Beschriften
Range("A4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Konzentration [nmol]"
Range("A5").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Fläche 1"
Selection.AutoFill Destination:=Range(Cells(5, 1), Cells(aoianzahl + 3, 1)), Type:=&
&xlFillDefault
Columns(1).Select
Selection.Columns.AutoFit
'Graph erstellen
Range(Cells(4, 2), Cells(aoianzahl + 3, bildanzahl + 2)).Select
Charts.Add
ActiveChart.ChartType = xlXYScatterLines
ActiveChart.SetSourceData Source:=Sheets("Auswertung").Range(Sheets("Auswertung").&
&Cells(4, 2), _
  Sheets("Auswertung").Cells(aoianzahl + 3, bildanzahl + 2)), _
  PlotBy:=xlRows
ActiveChart.Location Where:=xlLocationAsObject, Name:="Auswertung"
With ActiveChart.Axes(xlCategory)
  .HasMajorGridlines = False
  .HasMinorGridlines = False
End With
With ActiveChart.Axes(xlValue)
  .HasMajorGridlines = False
  .HasMinorGridlines = False
End With
End With
xlbook.Activate
xlbook.ActiveSheet.Activate
xlbook.Sheets("Auswertung").Select
xlbook.ActiveSheet.Range("A1").Select
End Function
```

Literaturverzeichnis

- [1] *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9–37.
- [2] E. S. Lander, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 3–4.
- [3] H. Ge, A. J. M. Walhout, M. Vidal, *Trends Genet.* **2003**, *19*, 551–560.
- [4] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039–3043.
- [5] U. Reimer, U. Reineke, J. Schneider-Mergener, *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 315–320.
- [6] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* **2001**, *293*, 2101–2105.
- [7] B. B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Genome Biol.* **2001**, *2*, 0004.1–0004.13.
- [8] D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 510–517.
- [9] G. Jung (Hrsg.), *Combinatorial Chemistry - Synthesis, Analysis, Screening*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [10] G. Jung (Hrsg.), *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Verlag Chemie, Weinheim, **1996**.
- [11] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [12] H.-M. Haake, A. Schütz, G. Gauglitz, *Fresen. J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 576–585.
- [13] C. Hänel, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 91–100.

- [14] D. Leipert, F. Rathgeb, M. Herold, J. Mack, G. Gauglitz, G. Jung, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392*, 213–221.
- [15] D. Leipert, D. Nopper, M. Bauser, G. Gauglitz, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3503–3505.
- [16] O. Birkert, R. Tünnemann, G. Jung, G. Gauglitz, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 834–840.
- [17] P. R. Edwards, A. Gill, D. V. Pollard-Knight, M. Hoare, P. E. Buckle, P. A. Lowe, R. J. Leatherbarrow, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 210–217.
- [18] R. L. Rich, Y. S. N. Day, T. A. Morton, D. G. Myszka, *Anal. Biochem.* **2001**, *296*, 197–207.
- [19] S. Kienle, S. Lingler, W. Kraas, A. Offenhüser, W. Knoll, G. Jung, *Biosens. Bioelectr.* **1997**, *12*, 779–786.
- [20] F. Palmer, C. Stingel, R. Tünnemann, H. G. Mack, G. Jung, V. Hoffmann, *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 825–834.
- [21] F. Palmer, R. Tünnemann, D. Leipert, C. Stingel, G. Jung, V. Hoffmann, *J. Mol. Struct.* **2001**, *563*, 153–157.
- [22] G. J. Wegner, H. J. Lee, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5161–5168.
- [23] J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 3–36.
- [24] F. Yu, D. Yao, W. Knoll, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2610–2617.
- [25] T. Liebermann, W. Knoll, *Langmuir* **2003**, *19*, 1567–1572.
- [26] J. B. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, 2. Aufl., Plenum Press, New York, **1995**.
- [27] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- [28] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 9. Aufl., Molecular Probes, Eugene, **2002**.

- [29] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653–660.
- [30] J. Slavik, in *Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications* (Hrsg.: O. S. Wolfbeis), Springer Verlag, **1993**.
- [31] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nature Reviews* **2002**, *3*, 906–918.
- [32] B. G. Reid, G. C. Flynn, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6786–6791.
- [33] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392–1395.
- [34] H. G. Kapitzka, *Mikroskopieren von Anfang an*, Zeiss, Oberkochen, **1994**.
- [35] R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *Biospektrum* **1998**, *4*, 30–34.
- [36] H.-M. Haake, R. Tünnemann, A. Brecht, V. Austel, G. Jung, G. Gauglitz, *Anal. Biochem.* **2002**, *300*, 107–112.
- [37] C. M. Salisbury, D. J. Maly, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14868–14870.
- [38] D. Leipert, P. Heiduschka, J. Mack, H.-J. Egelhaaf, D. Oelkrug, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2471–2474.
- [39] M. Huber, P. Heiduschka, S. Kienle, C. Pavlidis, J. Mack, T. Walk, G. Jung, S. Thanos, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41*, 278–288.
- [40] S. C. Lin, F. G. Tseng, H. M. Huang, C. Y. Huang, C. C. Chieng, *Fresen. J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 202–208.
- [41] A. Jung, I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz, *Fresen. J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 128–136.
- [42] P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7849–7850.
- [43] J. Nawrocki, *J. Chromatogr.* **1997**, *779*, 29–71.

- [44] W. Yoshida, R. P. Castro, J. D. Jou, Y. Cohen, *Langmuir* **2001**, *17*, 5882–5888.
- [45] E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, Plenum Press, New York, **1990**.
- [46] M. J. Stevens, *Langmuir* **1999**, *15*, 2773–2778.
- [47] S. Gauthier, J. P. Aimé, T. Bouhacina, A. J. Attias, B. Desbat, *Langmuir* **1996**, *12*, 5126–5137.
- [48] A. Y. Fadeev, T. J. McCarthy, *Langmuir* **2000**, *16*, 7268–7274.
- [49] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectr.* **2000**, *15*, 473–481.
- [50] C. M. Halliwell, A. E. G. Cass, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2476–2483.
- [51] W. Budach, A. P. Abel, A. E. Bruno, D. Neuschäfer, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3347–3355.
- [52] N. Trummer, N. Adányi, M. Váradi, I. Szendrő, *Fresen. J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 21–24.
- [53] A. G. Lambert, D. J. Neivandt, R. A. McAloney, P. B. Davies, *Langmuir* **2000**, *16*, 8377–8382.
- [54] A. Hoff, T. André, T. E. Schäffer, G. Jung, K.-H. Wiesmüller, R. Brock, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1183–1191.
- [55] O. Birkert, H.-M. Haake, A. Schütz, J. Mack, A. Brecht, G. Jung, G. Gauglitz, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 200–208.
- [56] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [57] I. Luzinov, D. Julthongpiput, A. Liebmann-Vinson, T. Cregger, M. D. Foster, V. V. Tsukruk, *Langmuir* **2000**, *16*, 504–516.
- [58] R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2003**, *19*, 2388–2391.
- [59] S. Sharma, K. C. Popat, T. A. Desai, *Langmuir* **2002**, *18*, 8728–8731.

- [60] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714–10721.
- [61] R. G. Chapman, E. Ostuni, L. Yan, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2000**, *16*, 6927–6936.
- [62] J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 345–353.
- [63] R. G. Chapman, E. Ostuni, M. N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, G. Pier, H. S. Warren, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 1225–1233.
- [64] E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 6336–6343.
- [65] C. M. Nelson, S. Raghavan, J. L. Tan, C. S. Chen, *Langmuir* **2003**, *19*, 1493–1499.
- [66] P. Kingshott, J. Wei, D. Bagge-Ravn, N. Gadegaard, L. Gram, *Langmuir* **2003**, *19*, 6912–6921.
- [67] R. Tünnemann, *Synthese und spektroskopische Untersuchung Silica-gebundener Peptide und organischer Verbindungen und deren Anwendung in der Sensorik*, Dissertation, Universität Tübingen, **2000**.
- [68] D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264–1286.
- [69] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 752–789.
- [70] D. Bischoff, S. Pelzer, A. Höltzel, G. J. Nicholson, S. Stockert, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1736–1739.
- [71] D. Bischoff, S. Pelzer, B. Bister, G. J. Nicholson, S. Stockert, M. Schirle, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4824–4827.
- [72] R. D. Süssmuth, S. Pelzer, G. J. Nicholson, T. Walk, W. Wohlleben, G. Jung, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2096–2099.
- [73] M. Adamczyk, J. Grote, J. A. Moore, S. D. Rege, Z. Yu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1613–1615.

- [74] P. H. Popienek, R. F. Pratt, *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 108–113.
- [75] T. D. H. Bugg, G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10408–10415.
- [76] U. N. Sundram, J. H. Griffin, T. I. Nicas, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13107–13108.
- [77] M. A. Cooper, D. H. Williams, Y. R. Cho, *Chem. Commun.* **1997**, S. 1625–1626.
- [78] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777–790.
- [79] R. Tünnemann, M. Mehlmann, R. D. Süßmuth, B. Bühler, S. Pelzer, W. Wohlleben, H.-P. Fiedler, K.-H. Wiesmüller, G. Gauglitz, G. Jung, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4313–4318.
- [80] C. C. McComas, B. M. Crowley, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9314–9315.
- [81] C. A. jr. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik, *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5. Aufl., Garland Publishing, New York, **2001**.
- [82] E. A. Ottinger, M. C. Botfield, S. E. Shoelson, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 729–735.
- [83] T. Mustelin, K. Taskén, *Biochem. J.* **2003**, *371*, 15–27.
- [84] J. A. Gordon, *Methods Enzymol.* **1991**, *201*, 477–482.
- [85] E. C. Hulme (Hrsg.), *Receptor-Ligand Interactions*, The Practical Approach Series, Oxford University Press, New York, **1992**.
- [86] K. Länge, *Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse in markierungsfreien Bindungsassays*, Dissertation, Universität Tübingen, **2000**.
- [87] E. N. Kaufman, R. K. Jain, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4157–4167.
- [88] T. Yang, O. K. Baryshnikova, H. Mao, M. A. Holden, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4779–4784.

- [89] D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1473–1484.
- [90] L. Sundberg, J. Porath, *J. Chromatogr.* **1974**, *90*, 87–98.
- [91] A. Rathgeber, C. Strobl, H.-J. Kutschera, A. Wixforth, <http://arxiv.org/ftp/physics/papers/0104/0104079.pdf>, **2001**, 25.2.2003.
- [92] N. B. Adey, M. Lei, M. T. Howard, J. D. Jensen, D. A. Mayo, D. L. Butel, C. S. Coffin, T. C. Moyer, D. E. Slade, M. K. Spute, A. M. Hancock, G. T. Eisenhoffer, B. K. Dalley, M. R. McNeely, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6413–6417.
- [93] A. Blau, C. Weini, J. Mack, S. Kienle, G. Jung, C. Ziegler, *J. Neurosc. Methods* **2001**, *112*, 65–73.
- [94] R. Fischer, T. Waizenegger, K. Köhler, R. Brock, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 365–374.
- [95] G. A. Pietersz, W. Li, V. Apostolopoulos, *Vaccine* **2001**, *19*, 1397–1405.
- [96] P. H. Popienek, R. F. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2264–2270.
- [97] M. A. Model, G. M. Omann, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1712–1720.
- [98] P. R. Edwards, C. H. Maule, R. J. Leatherbarrow, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1998**, *263*, 1–12.
- [99] K. E. Sapsford, Z. Liron, Y. S. Shubin, F. S. Ligler, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5518–5524.
- [100] M. Hulko, *Entwicklung einer temporären Immobilisierung von Peptiden auf Glasoberflächen zur langsamen Peptidfreisetzung in Zell-Chip-Anwendungen*, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **2002**.
- [101] D. Barnes-Seeman, S. B. Park, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2478–2481.
- [102] P. Angenendt, J. Glökler, J. Sobek, H. Lehrach, D. J. Cahill, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 97–104.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, F. Bermejo Gonzales, J. Casado Linarejos, D. Christen, M. Diehl, H. Eckstein, H.-J. Egelhaaf, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, G. Jung, E. Kieven, P. Klein, W. Koch, D. Krug, N. Kuhn, H. Kuhnle, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Netzel, H. Oberhammer, F. Oberwinkler, D. Oelkrug, H. Pauschmann, E. Picker, H. Pommer, G. Reinhardt, R. Ruano Casero, M. Schramm, E. Schweda, V. Schurig, F. F. Seelig, B. Speiser, K. Steinke, J. Strähle, A. Šumski, W. Voelter, U. Weimar, K.-P. Zeller, C. Ziegler,

Lebenslauf

Martin Elbs
geboren am 29.5.1974
in Friedrichshafen

- | | |
|-------------|--|
| 1980–1984 | Don-Bosco-Grundschule in Ettenkirch |
| 1984–1993 | Karl-Maybach-Gymnasium in Friedrichshafen |
| 05/93 | Abitur |
| 07/93–09/94 | Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Friedrichshafen |
| 10/94–06/00 | Chemiestudium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 08/96 | Vordiplom |
| 10/96–06/97 | Auslandsstudium, Universidad de Salamanca, Spanien |
| 05/97–06/00 | Stipendiat des Cusanuswerks |
| 07/97–09/97 | Praktikum bei der Bayer AG im Geschäftsbereich Anorganische Industrieprodukte, Ressort Forschung, Fachbereich Silicone |
| 12/99–06/00 | Diplomarbeit bei Prof. Dr. Günther Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Co-Betreuung von Dr. Roland Brock. Thema der Arbeit: Charakterisierung von Cyclopeptidschichten hinsichtlich molekularer Erkennung und Zellwachstum |
| 06/00 | Diplom in Chemie |
| 08/00–12/03 | Anfertigung der Dissertation bei Prof. Dr. Günther Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Co-Betreuung von Dr. Roland Brock. Titel der Doktorarbeit: Mikroarrays zur Messung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit konfokaler Fluoreszenzdetektion |

