

**Nickel-NTA-Multichelatoren auf Oberflächen im
Mikroarrayformat
sowie
Peptidmikroarrays durch
native chemische Ligation**

DISSERTATION

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

2006

vorgelegt von

Thomas André

Tag der mündlichen Prüfung 19.04.2006

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-H. Wiesmüller

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Jung

in der Zeit von Mai 2000 bis Dezember 2005 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Günther Jung danke ich sehr herzlich für seine Förderung, die Freiheit in der Bearbeitung der Themen und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Herrn PD Dr. Roland Brock danke ich für die Bereitstellung der Themen und Projekte sowie die Betreuung der Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Danksagungen

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Kollegen im Verfügungsgebäude Dr. Martin Elbs, Falk Duchardt, Dr. Mariola Fotin-Mleczek, Antje Hoff, Hans-Jörg Hufnagel, Michael Hulko, Wilfred Hummel, Dr. Udo Marquardt, Günter Roth, Ivo Ruttekolk, Oda Stoivesandt, Aleksandra Velkova, Susanne Vollmer, Dr. Söhnke Voss, Thomas Weizenegger und Susann Wolf für das sehr angenehme Arbeitsklima und zahlreiche fachliche und nichtfachliche Gespräche und Diskussionen.

Dr. Rainer Fischer danke ich für die stete Unterstützung bei allen chemischen und biochemischen Problemen und für Projektideen, sowie für die Geduld mit mir im Laboralltag. Ferner wurden einige Peptide in dieser Arbeit von ihm hergestellt.

Dr. Oliver Mader und Herr Karsten Köhler danke ich für das Überlassen von Peptiden.

Herrn Günter Roth gilt mein besonderer Dank für viele Anregungen und das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Dr. Bernd Thern danke ich für Tips bei der Peptidsynthese und bei der Unterstützung.

Dr. Gerhard Sorg danke ich herzlich für die geduldige Unterstützung bei den Computerproblemen, die ich alleine nicht mehr lösen konnte und vielen Tips hierzu.

Frau Nicole Sessler danke ich für Peptidsynthesen und immer wieder sehr erfrischende Unterhaltungen innerhalb und außerhalb des Laboralltags.

Für weitere Peptidsynthesen gilt mein weiterer Dank Luise Schindler und Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller

Dr. Jörg Bauer danke ich für seine Tips bei Computerproblemen, bei Problemen mit der HPLC und für viele heitere Momente auch außerhalb des Laboralltags.

Dr. Tobias Seyberth danke ich für die Unterstützung mit der HPLC.

Herrn Andreas Heeren danke ich für die interessante Zusammenarbeit bei der Beschichtung der Cantilever und für die Herstellung derselben.

Frau Ursula Becker-Sanzenbacher danke ich für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft alle bürokratischen Hürden betreffend. Die positive Stimmung im Arbeitskreis war zum Großteil ihr Verdienst.

Allen Kolleginnen und Kollegen, die nicht namentlich erwähnt worden sind, danke ich für das gute Klima im Arbeitskreis.

Prof. Dr. Stefan Stevanović möchte ich für die Möglichkeit danken, in seinem Labor die notwendigen Routine MALDI-TOF-Messungen durchführen zu können.

Ferner möchte ich noch den Kooperationspartnern PD Dr. Jacob Piehler, Annett Reichel, Prof. Dr. Robert Tampé und Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller für die Diskussionen, Anregungen und Unterstützung im Nanobiotech-Projekt „Schaltbare biochemische Pinzetten als Werkzeuge zur molekularen Organisation und Manipulation von Proteinen“ danken.

Meiner Schwester möchte ich besonders Danken für das zügige Korrekturlesen dieser Arbeit und für die moralische Unterstützung während der ganzen Zeit.

Zuguterletzt gilt meinen Eltern besonderer Dank für die fortwährende moralische und materielle Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.

*„Jeder Fehler erscheint unglaublich dumm,
wenn andere ihn begehen“*

(Georg Christoph Lichtenberg, dt. Schriftst. u. Physiker)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
2 AUFGABENSTELLUNG	6
3 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN.....	7
3.1 FLUORESZENZFARBSTOFFE	7
3.2 KONFOKALE MIKROSKOPIE	10
3.3 MIKROARRAYS	12
3.4 NTA-CHELATOREN	18
3.5 MOLEKULARDYNAMISCHE METHODEN	24
3.6 DIE NATIVE CHEMISCHE LIGATION.....	27
3.7 BESCHICHTUNG VON MIKROCANTILEVERN	29
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	31
4.1 NTA-MIKROARRAYS FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER ANBINDUNG VON OLIGOHISTIDINEN	31
4.2 DISSOZIATIONSMESSUNGEN AUF NTA-ARRAYS ÜBER KONFOKALE MIKROSKOPIE.....	42
4.2.1 Parallele Dissoziationsmessung zweier Oligohistidine auf NTA-Arrays	42
4.2.2 Parallel- und Einzel-Dissoziationsmessung von His ₆ und His ₁₀	53
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Dissoziationsmessungen	58
4.3 MOLEKULARDYNAMISCHE UNTERSUCHUNG VON HISTIDIN-NICKEL-NTA-KOMPLEXEN ...	60
4.4 ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG DER NATIVEN CHEMISCHEN LIGATION AUF OBERFLÄCHEN	66
4.4.1 Peptidarrays durch Native Chemische Ligation	66
4.4.2 Nachweise der Thiofunktion nach S→N-Acyltransfer	71
4.4.3 Proteinarrays durch Native Chemische Ligation.....	77
4.5 PIPETTIEREN AUF CANTILEVERARRAYS MIT HILFE EINES NANOPIPETTIER-ROBOTERS...	82
5 ZUSAMMENFASSUNG	86
6 EXPERIMENTELLER TEIL	88
6.1 CHEMIKALIEN, LÖSUNGSMITTEL UND PUFFER	88
6.2 ANTIKÖRPER UND PROTEINE.....	89
6.3 PEPTIDSYNTHESE	90

6.3.1 N-terminale Fluoreszenzmarkierung von Peptiden	90
6.3.2 Fluoreszenzmarkierung an der Seitenkette	91
6.3.3 Herstellung von Cystin-Peptiden	92
6.3.4 Synthese des Palladiumkomplexes Pd(PPh ₃) ₄	92
6.3.5 Kaiser-Test	93
6.3.6 Synthese des Bernsteinsäurebenzylthiolesters	94
6.3.7 Abspaltung und Aufarbeitung	94
6.4 REKONSTITUTION DES PROTEINS SHP-2C	96
6.5 MODIFIZIERUNG VON GLASOBERFLÄCHEN	97
6.5.1 Aminofunktionalisierte Glasträger	97
6.5.2 Epoxyfunktionalisierte Glasträger	97
6.5.3 PEG-derivatisierte Oberflächen	98
6.5.4 N-Hydroxysuccinimidfunktionalisierte Glasträger	98
6.5.5 Maleinimidfunktionalisierte Glasträger	98
6.5.6 Thiolesteroberflächen	99
6.6 GERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN	99
6.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	99
6.6.2 Massenspektrometrie	100
6.6.3 Mikroskopie	100
6.6.4 Mikroarray-Erstellung	102
6.6.5 Inkubationen und Waschen der Peptid- und NTA-Arrays	106
6.6.6 Inkubation und Waschen der Proteinarrays	106
6.6.7 Nachweis von Peptiden auf Thiolesteroberflächen	107
6.6.8 Nachweis von SHP-2C und MBP auf Thiolesteroberflächen	107
6.6.9 Titration auf Arrays von NTA-Chelator-Histidin-Komplexen mit Imidazol	108
6.6.10 Auswertung der Aufnahmen der Titrations von Arrays	108
6.7 BESCHICHTUNG VON MIKROCANTILEVERN FÜR DIE BIOSENSORIK	109
6.7.1 Herstellung von Cantileverarrays	109
6.7.2 Funktionalisierung einzelner Cantilever	110
6.7.3 Nachweis der Anbindung des Antikörpers über Fluoreszenz	111
6.8 MOLECULAR MODELING	111
6.8.1 Hardware und Software	111
7 ANHANG	114
8 LITERATUR	127

Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wurden die Vorschläge der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37] des Ein- oder Dreibuchstaben-Code verwendet.

abs.	wasserfrei
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Alloc	Allyloxycarbonyl
a.u.	arbitrary unit
amu	atom mass unit
APTES	Aminopropionyl-triethoxysilan
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
DAPEG	O,O'-Bis-(2-aminopropyl)-polyethylenglykol
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DG	Deckglas (Dicke = 0,17 mm, Durchmesser d = 12mm)
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	N-Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSS	Oktandisäuredisuccimidylester
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGFP	enhanced GFP
eq.	Äquivalente
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-MS
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Fluo	Fluoreszein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ATR-IR	Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-IR
FTICR-MS	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance-MS
GC	Gaschromatographie
GFP	green fluorescent protein
GOPTS	3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung (Hepes buffered saline)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IDA	Iminodiessigsäure (Iminodiacetic acid)
IR	Infrarot
ITC	Isothermische Titrationskalorimetrie
kat.	katalytisch
λ	Wellenlänge
M	Molarität
Maldi-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-MS
Maleimidobiocytin	N ^{α} -(3-Maleimidylpropionyl)biocytin
MBP	Maltose bindendes Protein
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MTT	4-Methyltrityl
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methylpyrrolidinon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTA	Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic acid)
Pam ₃ Cys-OH	N ^{α} -Palmitoyl-S-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cystein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R	Rest
rel. int.	Relative Intensität
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschlußchromatographie (Size Exclusion Chromatography)
SET	Single-Electron-Transfer
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
SPOS	Organische Festphasensynthese (Solid-Phase Organic Synthesis)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (Solid-Phase Peptide Synthesis)
t	Zeit
Tamra	Tetramethylrhodamin
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
TOF	time-of-flight
Trt	Trityl
ÜZ	Übergangszustand
UV	Ultraviolett
V	Volumen
YFP	yellow fluorescent protein

1 Einleitung

Die Untersuchung molekularer Erkennung zwischen Biomolekülen sowie deren Eigenschaften im Zusammenspiel mit anderen Biomolekülen ist ein zentrales Ziel bioanalytischer Methoden. Molekulare Erkennung ist die Voraussetzung aller komplexen Abläufe in Zellen. Interessant ist dabei, die Eigenschaften der Biomoleküle so zu verstehen, dass Vorhersagen über Wechselwirkungen mit anderen Molekülen getroffen werden können. Dies gilt ganz besonders im Hinblick auf medizinische Anwendungen bei der Entwicklung von Wirkstoffen, die in zelluläre Abläufe spezifisch eingreifen sollen.^[1] Ein bioanalytisches System sollte alle Gene und Genprodukte sowie deren wechselseitige Bezüge aufzeigen und möglichst die Art der Wechselwirkung beschreiben. Aufgrund der Komplexität vieler gleichzeitig stattfindender Erkennungsprozesse und der riesigen Anzahl an Biomolekülen ist die spezifische Untersuchung von nur einem Vorgang, oder die Charakterisierung von nur einem Biomolekül, nur bedingt sinnvoll. Einen vollständigeren gleichzeitigen Einblick in biologische Prozesse können Mikroarrays bieten. Hierbei können auf kleinstem Raum und unter Einsatz geringer Mengen an Reagenzien viele verschiedene Parameter zum gleichen Zeitpunkt ausgelesen werden. Mittlerweile ist die Anwendung von Mikroarrays bereits eine Standardmethode in der molekularbiologischen Forschung geworden, insbesondere die Anwendung von DNA-Mikroarrays.

Heutige mikroarraybasierte Techniken beruhen auf der Idee des DNA-Mikroarrays, welcher seine Wurzeln in den Southern Blots hat.^[2,3] Diese Technik wurde zum Zeitpunkt der Entwicklung von Mikroarrays bereits jahrelang in biologischen Laboren verwendet. Der Weg von diesem ersten Array führte über die Verwendung nichtporöser Trägermaterialien wie zum Beispiel modifizierten Glasoberflächen, die die Fluoreszenzdetektion ermöglichten, bis hin zu fotolithografisch hergestellten Arrays oder Goldoberflächen. Die Entwicklung beinhaltete auch eine starke Miniaturisierung mit bis zu 2,1 Millionen DNA-Fragmenten pro Array^[2]. Die häufigsten Applikationen für DNA-Mikroarrays sind derzeit Expressionsanalysen und Mutationsnachweise bei denen z.B. äußere Einwirkungen oder die Einflüsse von Erkrankungen auf die Genexpression untersucht werden.

Um detaillierte Einblicke in biologische Prozesse zu erhalten genügt es nicht, alleine die Genexpression zu betrachten. Die direkte Wechselwirkung der sich aus der Genexpression ergebenden Proteine untereinander und mit anderen Molekülen ist hierfür zu untersuchen.^[4]

In einer grundlegenden Arbeit zu Mikroarrays wurden bereits 1991 von Fodor *et al.*^[5] fotolithografische Techniken zur Fabrikation von hochdichten Peptidmikroarrays gezeigt. Hierbei wurden 1024 Peptide auf dem Träger synthetisiert. Erst später erfolgte die Herstellung des ersten DNA-Mikroarray-Prototyps^[6] als Werkzeug zur DNA-Sequenzanalyse. Die Oligonucleotide wurden dabei ebenfalls direkt auf den Arrayträgern synthetisiert. Von da an wurden DNA-Mikroarrays schnell weiterentwickelt und durch Verwendung von Nanopipettier-Robotern wurde vorher synthetisierte cDNA auf einen Glasträger pipettiert und quantitativ ein Genexpressionsmuster bestimmt.^[7] Erst in den letzten 5 Jahren wurden Mikroarrays mit Proteinen, Peptiden und anderen kleinen Molekülen häufiger eingesetzt, was auch daran lag, dass kommerzielle Nanopipettier-Roboter ab diesem Zeitpunkt verfügbar waren.^[8]

Mit Hilfe von Proteinmikroarrays wurden in den letzten Jahren bereits eine Vielzahl von Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt.^[9-13] Mit einem Mikroarray, das den Großteil des Hefeproteoms umfasst, konnten beispielsweise Proteine identifiziert werden, die mit Calmodulin in Wechselwirkung treten.^[14] Über Antikörpermikroarrays lassen sich die Konzentrationen bestimmter Proteine schnell bestimmen.^[15]

Der erste Array mit kleinen Molekülen wurde von MacBeath *et al.* vorgestellt.^[16] Traditionelle organische Chemie und Festphasensynthese wurden dazu verwendet, um drei kleine Liganden von bekannten Proteinen zu synthetisieren. Mit Hilfe eines Nanopipettier-Roboters wurden die in geeigneten Lösungsmitteln gelösten Substanzen auf modifizierte Glasoberflächen gebracht und dabei gezeigt, dass Maleinimid-derivatisierte Oberflächen für eine Immobilisierung von Molekülen mit Thiolgruppen geeignet sind. Dabei wurde ebenfalls herausgefunden, dass auch nicht sehr starke Bindungspartner (K_d im μM -Bereich) nachgewiesen werden können. Peptide stellen natürliche Liganden für Proteine dar. Peptide haben gegenüber Proteinen einige vorteilhafte Eigenschaften die sie für Mikroarrays interessant macht. Sie sind stabil gegenüber Eintrocknen und Oxidation (außer solche mit empfindlicheren Gruppen, wie z.B. Thiolen), einfach zu handhaben, fluoreszent zu markieren und durch Festphasenpeptidsynthese häufig automatisiert zugänglich.^[17,18] Nachteile sind die teilweise geringen Affinitäten und Spezifitäten gegenüber Zielproteinen. Anwendungen für Peptidmikroarrays waren bisher immobilisierte Peptide um Epitope für Antikörper zu bestimmen bzw. um die Spezifität von Antikörpern gegenüber bestimmten Aminosäuresequenzen zu testen, ebenso die Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Untersuchung inhibitorischer Aktivität und Enzym-Substrat-Wechselwirkungen.^[4] Peptidmikroarrays

wurden bereits erfolgreich eingesetzt um die Signaltransduktion innerhalb von Zellen zu untersuchen. So konnte abhängig von der Aktivierung von Zellen eine Anbindung bestimmter Proteine aus dem Zelllysate an die Peptide des Mikroarrays gezeigt werden.^[19,20] Die Anbindung zwischen einem auf der Oberfläche immobilisierten Fängermolekül, z.B. einem Rezeptor, und dem in der Lösung darüber schwimmenden Liganden lässt sich über mehrere Methoden detektieren. Für Arrays mit kleinen Molekülen und auch Peptidmikroarrays ergibt sich die Schwierigkeit, dass eine einzige einheitliche Oberflächenchemie für die Anbindung aller Moleküle mit teilweise unterschiedlichen strukturellen und chemischen Eigenschaften geeignet sein muss. Dabei darf sich aber deren Aktivität für die vorgesehene Anwendung nicht verändern.

Auch in der restlichen Analytik und Sensorik spielen die Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen oder auch zwischen einfachen kleinen Molekülen, bei denen ein Interaktionspartner fest auf einer Oberfläche verankert ist, eine wichtige Rolle.^[1,4,21-27] Es ergeben sich dabei abhängig von der Detektionsmethode die gleichen Anforderungen wie bei Mikroarrays. Als Beispiele für markierungsfreie Detektionsmethoden seien die reflektometrische Interferenzspektrometrie (RIFS),^[28-37] die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR),^[38-40] Abgeschwächte-Totalreflexion-Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR),^[41-45] planare Wellenleiter Technologie,^[46,47] und Atomkraftmikroskopie^[48,49] genannt. Die ersten vier Methoden erlauben es, den Bindungsvorgang an die Oberfläche über eine größere Fläche direkt zu verfolgen. Hierbei erzeugt die Bindung des Liganden an die Oberfläche eine Änderung der Schichtdicke, die eine Änderung des Messsignals bewirkt. Dabei lassen sich sehr sensitiv beispielsweise durch mit Cyclopeptiden belegte Oberflächen spezifisch bestimmte Aminosäuren oder andere organische Moleküle detektieren.^[35,37,50] Um eindeutige Messsignale zu erhalten ist jedoch meist eine größere mit dem gleichen Rezeptor beschichtete Fläche notwendig. Obwohl mittlerweile eine gewisse Miniaturisierung erreicht wurde,^[36,51] sind Mikroarrays mit einer solchen Dichte, wie sie auf heutigen DNA-Mikroarrays erreicht werden, schwer möglich. Eine Ausnahme stellt das in den letzten Jahren entwickelte Oberflächenplasmonenresonanz Imaging dar, mit einer lateralen Auflösung von bis zu 2 μm (bei hoher Empfindlichkeit für die Schichtdickenänderung).^[52-55]

Bei Mikroarrays wird das Signal, das die Anbindung eines Liganden anzeigt, häufig über Fluoreszenz erhalten,^[56] welche entweder unmittelbar durch einen fluoreszenten Liganden oder indirekt durch eine Verknüpfung mit fluoreszenten Antikörpern erzeugt wird. Neben der Fluoreszenzdetektion und den oben angegebenen Methoden gibt es noch weitere wie

die Detektion über Radioisotopen, Chemolumineszenz, Quarz-Kristall-Mikrowaagen (QCM), FCS an Oberflächen, elektrochemische Detektion und die anomale Reflexion (AR) an Goldoberflächen.^[11]

Bei Fluoreszenzdetektion wird die Ermittlung der Daten aus den Mikroarrays für gewöhnlich so durchgeführt, dass nach Anbindung der Liganden und, falls notwendig, der entsprechenden fluoreszenten Marker, die Arrays gut gewaschen und anschließend getrocknet werden. Die trockenen Arrays werden dann in einem Fluoreszenzscanner ausgelesen. Hierfür ist eine ausreichend feste Bindung der Liganden notwendig. Auf die Beobachtung des Bindungsvorganges wird verzichtet, da es sich um eine Endpunktmethode handelt.

Ein Nachteil der Fluoreszenzdetektion ist, dass eine fluoreszente Markierung die Eigenschaften des Liganden im Hinblick auf sein Bindungsverhalten verändern kann. Durch Einführen eines Abstandshalters zwischen Ligand und Fluorophor kann dies noch beeinflusst werden. Zudem muss bei Bindungsmessungen zwischen der Fluoreszenz der Ligandlösung und der Fluoreszenz der Liganden an der Oberfläche unterschieden werden. Dies kann erreicht werden, indem nur die an der Oberfläche eines speziellen optischen Trägers vorhandenen Farbstoffmoleküle angeregt werden^[57,58] oder indem die Fluoreszenzdetektion konfokal erfolgt. Ein Vorteil der Fluoreszenzdetektion ist, dass mehrere mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Liganden gleichzeitig detektiert werden können, solange sich die Farbstoffe nicht gegenseitig sehr beeinflussen.

Um eine molekulare Wechselwirkung auf Oberflächen zu untersuchen, ist es wichtig, die richtige Orientierung der auf der Oberfläche verankerten Moleküle zu erreichen, damit der für die Wechselwirkung wichtige Molekülteil frei in die Richtung steht, aus der der Analyt zu erwarten ist. Eine spezifische aber reversible Immobilisierung auf Oberflächen ist im Zusammenhang mit der Immobilisierung von Biomolekülen sehr interessant. Wünschenswert ist dabei, dass verschiedene Biomoleküle auf der Oberfläche gemäß ihren möglichst orthogonalen Eigenschaften auf verschiedenen Bereichen der Oberfläche anbinden und sich anschließend wieder spezifisch und schaltbar ablösen lassen.

Eine reversible und spezifische Immobilisierung lässt sich über die bekannte NTA-Ni-Histidin-Wechselwirkung erreichen. Biomoleküle werden mit einer kleinen Oligohistidinkette versehen (z.B. rekombinant) und an NTA-Oberflächen gebunden. Als Abwandlung zu den bisher bekannten Mono-NTA-Chelatoren auf Oberflächen wurden in dieser Arbeit Mehrfachchelatoren im Mikroarrayformat auf Oberflächen immobilisiert um zu testen, wie sich verschiedene Oligohistidine bei gleichzeitiger Inkubation auf der

Oberfläche verhalten. Ziel dieser Doktorarbeit war es zu sehen, ob sich das Bindungsverhalten der Oligohistidine mit unterschiedlichen Oberflächendichten der verschiedenen Chelatoren ändert, und ob eine möglichst orthogonale Anbindung unter bestimmten Bedingungen an die NTA-Gruppen möglich ist. Dabei sollten durch Verwendung des parrallelen Ansatzes über Mikroarrays möglichst viele Parameter gleichzeitig ausgelesen werden.

Jedoch nicht nur reversible, sondern auch irreversible hochspezifische Anbindungsmethoden sind für die Herstellung von Mikroarrays mit Biomolekülen wichtig. Daher sollte in dieser Arbeit eine sehr spezifische und irreversible Anbindungsmöglichkeit über die native chemische Ligation auf Oberflächen entwickelt werden. Das Ziel war dabei die chemoselektive Immobilisierung von entsprechend modifizierten Peptiden aber auch die Kompatibilität mit biologischen Assaysystemen und die Anwendung für biologisch aktive Proteinmikroarrays.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Anwendung von spezifischen Immobilisierungsmethoden, die auch zur Anwendung für Mikroarrays geeignet sind. Dabei sollten sowohl kovalente als auch nichtkovalente Methoden getestet werden. Im Fokus sollten bei beiden Verfahren Arrays mit kleinen Molekülen unter Zuhilfenahme fluoreszenzbasierter Detektion stehen.

Die kovalente, chemoselektive Immobilisierungsmethode sollte so angelegt sein, dass sie für verschiedene Screening-Verbindungen zu einer selektiven und gerichteten Anbindung führt. Als Modellverbindungen waren dazu im ersten Schritt Peptide vorgesehen, jedoch sollte die Anbindungsmethode allgemein für biochemische und biologische Anwendungen im Mikroarrayformat geeignet sein. Um die Kompatibilität dieser Oberflächen mit biologisch orientierten Assaysystemen zu zeigen, waren sowohl geeignete Protein-Peptid-Wechselwirkungen als auch immunhistochemische Methoden auszuwählen. Dem Nachweis der Selektivität der Anbindung war dabei stets eine große Bedeutung einzuräumen.

Für die nichtkovalente Immobilisierungsmethode ergab sich neben der Spezifität der Anbindung zusätzlich die Fragestellung, ob auf diesen Oberflächen eine Entmischung verschiedener Verbindungen mit geringen strukturellen Unterschieden, erreicht werden kann. Sowohl die verschiedenen Fängermoleküle auf den Oberflächen, als auch die verschiedenen Verbindungen des Analytgemisches sollten möglichst komplementäre Bindungseigenschaften zueinander zeigen. Dazu mussten Messmethoden entwickelt werden, die eine fluoreszenzbasierte Auswertung und Beurteilung der selektiven Anbindung der Substanzgemische auf Mikroarrays erlauben. Mit Hilfe der Messung im Mikroarrayformat sollte dabei eine parallele Untersuchung verschiedener Bedingungen, wie zum Beispiel der Variation der Dichte der Fängermoleküle auf der Oberfläche, ermöglicht werden. Durch molekulardynamische Methoden sollten Struktur-Bindungseigenschaften der Bindungspartner untersucht werden, und die daraus gewonnenen Informationen für Verbesserungen der Strukturen eingesetzt werden.

3 Allgemeine Grundlagen

3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Einige aromatische Moleküle und andere molekulare Systeme senden unter bestimmten Umständen Licht aus, wenn sie vorher durch Absorption in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt wurden. Dieser Vorgang wird als Lumineszenz bezeichnet.^[59] Je nach Art der Anregung wird die Lumineszenz eingeteilt in Chemolumineszenz (chemische Reaktion), Biolumineszenz (biologische Prozesse), Radiolumineszenz (radioaktive Bestrahlung) und Photolumineszenz (Lichtbestrahlung). Je nach Art des angeregten Zustandes aus dem die Lichtabgabe erfolgt, wird die Photolumineszenz eingeteilt in (a) Fluoreszenz, bei der die Lumineszenz aus Singulettzuständen heraus erfolgt, und (b) Phosphoreszenz, bei der die Lumineszenz aus Triplettzuständen heraus erfolgt. Die Fluoreszenzlebensdauer ist im Gegensatz zur Phosphoreszenzlebensdauer sehr kurz und bewegt sich im Nanosekundenbereich. Bei der Anregung in den Singulettzustand wird ein Elektron in ein höher gelegenes Orbital angeregt wobei der Spin gegensätzlich zum Spin des im Grundzustandsorbital verbliebenen Elektrons antiparallel bleibt und daher die unter Lichtemission ablaufende Rückkehr in den Grundzustand quantenmechanisch erlaubt ist. Die Anregung in einen Triplettzustand wird aus einem angeregten Singulett-Niveau durch eine Spinumkehr, der so genannten Interkombination (intersystem crossing, ISC), erreicht. Da nun die Rückkehr in den Grundzustand wegen des nun parallelen Spins des angeregten Elektrons nicht mehr ohne weiteres möglich ist, sind Triplettzustände deutlich langlebiger und die Phosphoreszenzlebensdauer beträgt einige Millisekunden bis Sekunden. Die photophysikalischen Zusammenhänge zwischen Anregung und Emission werden durch das Jablonski-Termschema in Abbildung 2.1 dargestellt.^[60]

Die Lage seiner Energieniveaus ist ein Charakteristikum für eine Substanz. Das sich daraus ergebende charakteristische Absorptionsspektrum einer Substanz ergibt sich durch die Vielzahl der möglichen Übergänge aus dem Grundzustand S_0 in die verschiedenen Schwingungsniveaus v_n des angeregten Zustandes S_1 . Nach strahlungsloser Desaktivierung erfolgt eine Emission in die verschiedenen Schwingungsniveaus v_n des Grundzustandes und erneuter strahlungsloser Desaktivierung in den Zustand v_0 .

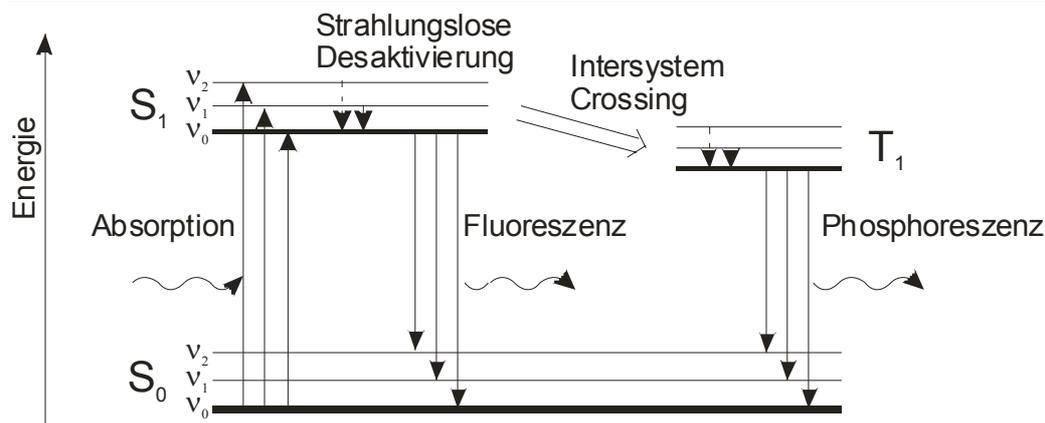


Abbildung 3.1: Jablonski-Termschema

Durch die strahlungslosen Desaktivierungsvorgänge ergibt sich eine Differenz zwischen der Energie, die bei der Absorption eines Photons aufgenommen wird, und der Energie, die das abgegebene Photon besitzt, so dass die Energie des Emissionsspektrums kleiner ist.

Diese Verschiebung hin zu größeren Wellenlängen (Rotverschiebung) wird als Stokes'-Shift (Sir George Gabriel Stokes 1819-1903) bezeichnet.^[61] Auch Emissionsspektren sind wie Absorptionsspektren zusammen mit dem Stokes'-Shift charakteristische Größen für Fluorophore. Sie sind von äußeren Einflüssen wie der Temperatur, dem Druck, der Polarität des Lösungsmittels, dem pH-Wert oder der Beweglichkeit der Moleküle abhängig. Durch eine Änderung des Spektrums lässt sich daher auf eine Veränderung der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors schließen.^[62]

Daraus ergeben sich unmittelbare Auswahlkriterien für die Wahl des passenden Fluorophors. Zunächst müssen die Spektren der Fluorophore passend für die Strahlenquelle, Strahlteiler und Filter des Mikroskops sein. Weitere Kriterien für die Wahl des Fluorophors sind beispielsweise die Fluoreszenzlebensdauer, Quantenausbeute der Fluoreszenz, die Bleichstabilität, die Löslichkeit, die pH-Wert-Abhängigkeit und die Möglichkeit zur Anbindung an andere Moleküle.

Werden mehrere Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt, schränkt sich die Auswahl an verwendbaren Fluorophoren ein, da die Fluorophore zum einen spektral unterscheidbar sein müssen und zum anderen nicht miteinander in Wechselwirkung treten dürfen. Denn außer einer strahlungslosen Abgabe von Energie durch bestimmte Relaxationsprozesse (z.B. Wärmeabgabe), kann die abgegebene Energie eines Fluorophors auch strahlungslos von einem anderen Fluorophor aufgenommen werden. An diesem Energietransfer sind keine Photonen beteiligt, sondern er findet durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen statt. Er

ist in der Literatur als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer oder Förster-Energietransfer (FRET) bekannt.^[63]

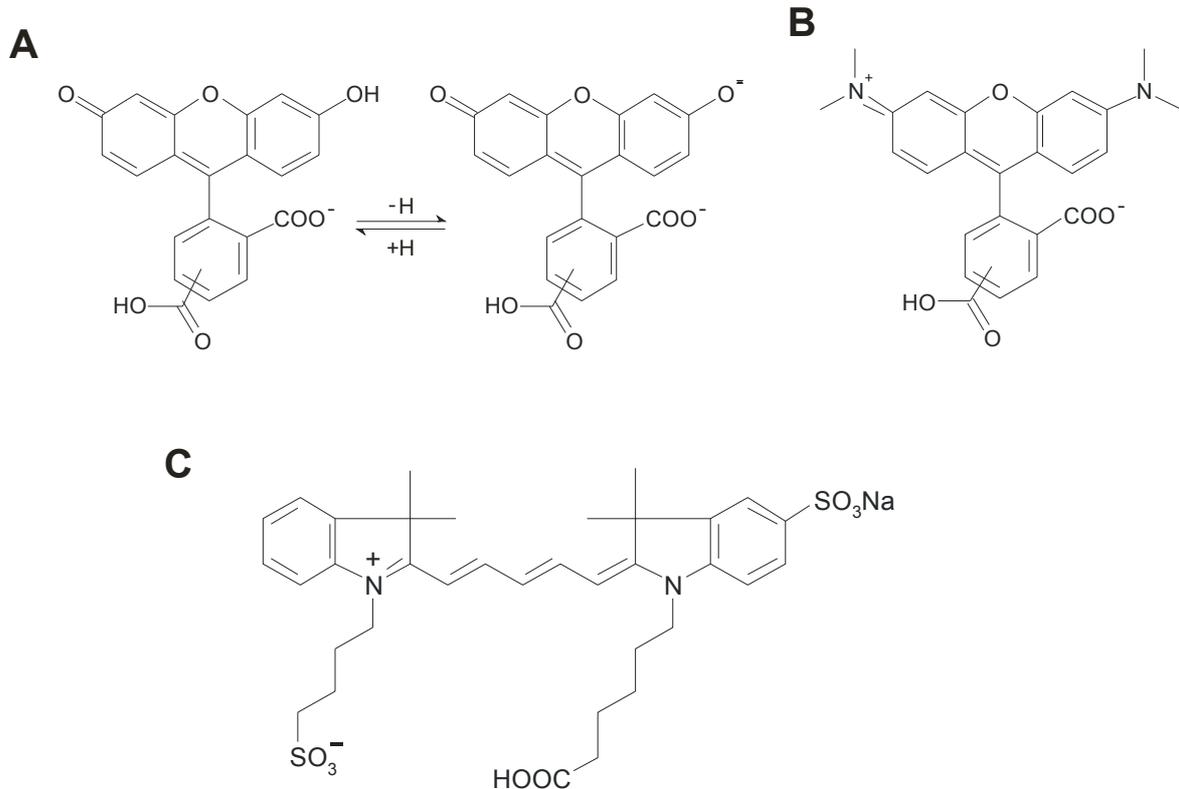


Abbildung 3.2: Strukturformeln der zur Markierung von Peptiden verwendeten Farbstoffe. (A) pH-Wert-abhängiges Gleichgewicht von 5(6)-Carboxyfluoreszein. (B) 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin. (C) der Pentamethin-Indocyaninfarbstoff S0387.

Abbildung 3.2 zeigt die chemischen Strukturformeln der in dieser Arbeit zur Markierung von Peptiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Tetramethylrhodamin zeigte sich jedoch zur Untersuchung auf Glasoberflächen wegen seiner starken adhäsiven Eigenschaften und wegen des Energietransfers von Fluoreszein zu Tetramethylrhodamin als weniger geeignet. Der Pentamethin-Indocyaninfarbstoff S0387^[64] erwies sich als besser geeigneter Farbstoff bei Arraymessungen in Verbindung mit Fluoreszein. Der Farbstoff 5(6)-Carboxyfluoreszein wird trotz einiger nachteiliger Eigenschaften nicht zuletzt wegen seines geringen Preises mit am häufigsten verwendet.^[65,66] Das Absorptionsmaximum von Fluoreszein ist in wässriger Lösung abhängig vom pH-Wert. Bei schwach saurer Lösung liegt die protonierte Form vor und das Absorptionsmaximum liegt bei 435 nm, in neutraler und alkalischer Lösung bei 492 nm. Zudem ist die Quantenausbeute im sauren Bereich sehr klein, während sie im alkalischen einen Wert von 0,9 annimmt.^[67] Tetramethylrhodamin liegt zwitterionisch vor und seine Absorptions- und

Emissionsmaxima (553 nm bzw. 576 nm bei pH 7,0) sind unter physiologischen Bedingungen wenig pH-Wert abhängig.^[65] Der Pentamethin-Indocyaninfarbstoff S0387 besitzt sein Absorptionsmaximum bei 646 nm und sein Emissionsmaximum bei 669 nm. Jedoch ist die Quantenausbeute deutlich geringer (0,18) als bei Fluoreszein.^[64,68]

Die Farbstoffe lassen sich über ihre reaktiven funktionellen Gruppen in der Festphasensynthese von Peptiden verwenden, können aber auch zur Markierung von Proteinen eingesetzt werden.^[66,68] Es gibt viele Möglichkeiten um Fluorophore kovalent an Biomoleküle wie Peptide oder Proteine zu binden. Proteine werden häufig mit Farbstoffen markiert, die über eine zum Aktivester, Isothiocyanat oder Maleinimid derivatisierte Carboxy-Gruppe verfügen.^[69-72]

Eine sehr spezifische Anbindung an den N-terminus von Proteinen kann auch über native chemische Ligation an N-terminal vorhandene Cysteine erfolgen.^[73,74] Die Proteine müssen in letzterem Fall rekombinant hergestellt werden. Umgekehrt kann auch das Protein als Thiolester exprimiert werden und ein Cystein-Rest zur Markierung verwendet werden.^[75] Die Markierungseffizienz ist jedoch in allen diesen Fällen durch die Kupplung der Farbstoffe unter physiologischen Bedingungen nicht optimal. Jedoch sind diese notwendig, damit Proteine und Farbstoffe intakt bleiben. Eine effizientere Markierung ist bei der Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)^[76,77] erreichbar durch *in situ* Aktivierung der Carboxyfunktion.^[78] Durch einen Überschuss an Farbstoff und der Kupplungsreagenzien kann das Produkt nahezu vollständig markiert werden.

Zur Markierung von Proteinen gibt es noch eine andere Möglichkeit. Durch rekombinante Methoden lässt sich das Protein mit einem zusätzlichen fluoreszenten Proteinteil ausstatten.^[79] Das am längsten eingesetzte, rekombinante und fluoreszente Protein ist das GFP, das „Grün Fluoreszente Protein“. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*, aus dem durch genetische Veränderungen weitere fluoreszente Proteine abgeleitet werden konnten, die z.T. einen anderen Wellenlängenbereich abdecken. Als Beispiel seien hier YFP, CFP und EGFP genannt.

3.2 Konfokale Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie ist eine der wichtigsten mikroskopischen Methoden um biologische Proben und Vorgänge in diesen Proben hochauflösend abzubilden. Für die Fluoreszenzmikroskopie gelten im Prinzip die gleichen optischen Gesetze wie für die Durchlichtmikroskopie, und sie erreicht wie diese keine Auflösung auf molekularer Ebene.

Da die Detektion der Proben nicht auf dem Kontrast bei der Absorption von Licht beruht, sind nur wenige fluoreszente Moleküle für eine zuverlässige Detektion notwendig. Die laterale Auflösung wird dabei sehr ähnlich einem normalen Durchlichtmikroskop auch von der Apertur des verwendeten Objektivs bestimmt.

Ein Epifluoreszenzmikroskop unterscheidet sich von einem normalen Durchlichtmikroskop in wenigen Punkten.^[80] Der Strahlengang zwischen Probe und Beobachter ist der gleiche. Unterschiede bestehen bei der Ausleuchtung der Probe. Während bei Durchlichtmikroskopen das Licht durch die Probe gestrahlt wird, wird das Licht zur Anregung der Fluorophore auf die Probe als Auflicht durch das Objektiv eingestrahlt. Die angeregten Fluorophore strahlen die Fluoreszenz in alle Richtungen ab, und das Licht, das in das Objektiv fällt, kann detektiert werden. Um zurückgestreutes Licht der Anregungswellenlänge auszublenden und nur das der Emissionswellenlänge am Detektor oder Auge zu erhalten, sind Farbteiler (dichroische Spiegel) und Filter in den Strahlengang integriert. Auch muss in den Strahlengang vor dem Objektiv das Fluoreszenzanregungslicht, das für gewöhnlich aus einer Quecksilberdampfampe stammt, über einen halbdurchlässigen, dichroischen Spiegel eingekoppelt und mit Filtern auf die richtigen Wellenlängen begrenzt werden. Um mehrere Farbstoffe detektieren zu können, sind Fluoreszenzmikroskope mit mehreren Sätzen von Filtern und Spiegeln ausgestattet, die nach Bedarf in den Strahlengang gebracht werden.

Die Anregung mittels Quecksilberdampfampe eignet sich für die Darstellung von flachen Objekten oder dünnen Schichten. Bei dicken Objekten wird durch die Anregung der Probe und Streuung im Lichtkegel des Anregungslichtes der Kontrast stark vermindert. Dadurch verringern sich laterale und axiale Auflösung. Durch die Entwicklung der konfokalen Mikroskopie wurde dieser Nachteil ausgeglichen. Hier wird die Fluoreszenz nur aus einer Ebene detektiert. Die darüber und darunter liegenden Ebenen werden ausgeblendet. Dies geschieht, indem die außerhalb der Fokusebene erzeugte Fluoreszenz mit einer zur Objektebene konfokalen Lochblende vor dem Detektor aus dem Strahlengang abgeblockt wird. Das Prinzip ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Da allerdings auf diese Art nicht die gesamte Probe gleichzeitig ausgeleuchtet werden kann, wird die Probe Punkt für Punkt abgerastert. Hierfür wird standardmäßig das auch in dieser Arbeit überwiegend eingesetzte Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) verwendet. Durch bewegliche Spiegel wird das Laserlicht Punkt für Punkt auf die gesamte Probe gelenkt. Während beim Epifluoreszenzmikroskop die Detektion mit einer CCD-Kamera und mit dem Auge erfolgen kann, ist beim herkömmlichen LSM die Detektion nur mittels Fotomultiplier

möglich. Auch hier werden neben der richtigen Farbwahl des Lasers noch Filter und Strahlteiler verwendet um die Fluoreszenz nur eines bestimmten Fluorophors zu detektieren. Durch Einstrahlen mehrerer Laser (und damit mehrerer Wellenlängen) gleichzeitig kann die Fluoreszenz mehrerer Fluorophore zur selben Zeit detektiert werden. Dazu trennen mehrere dichroische Spiegel den Strahlengang vor den Detektoren wieder in einzelne Wellenlängenbereiche auf. Da der Fotomultiplier nur Helligkeitswerte ermittelt, können zur Darstellung der Fluoreszenzintensitäten durch Farbzuordnung nachträglich unterschiedlichen Fluorophoren beliebige Farben zugeordnet werden.

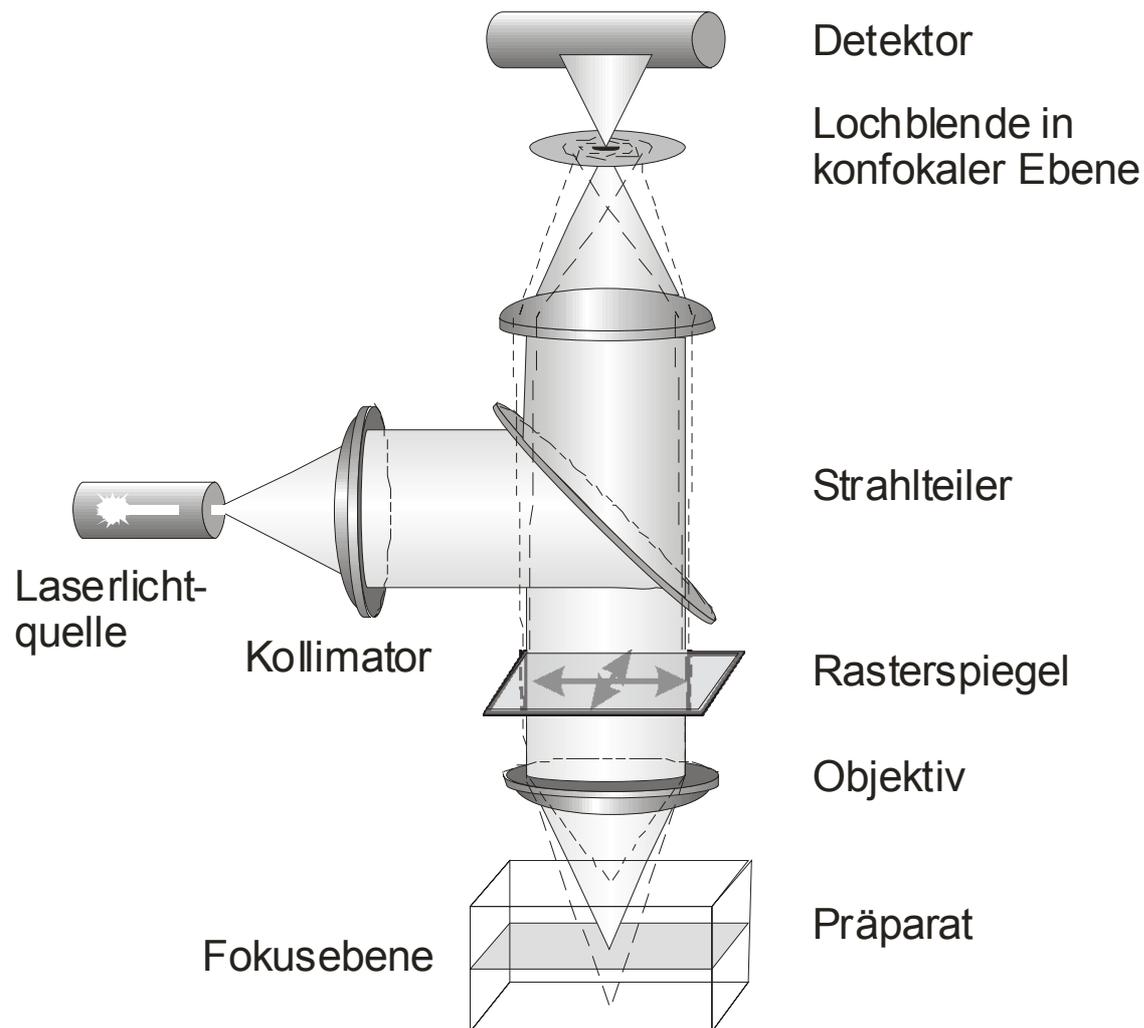


Abbildung 3.3: Aufbauprinzip eines Laser-Scanning-Mikroskops.

3.3 Mikroarrays

Ein Array ist definiert als Anordnung von mehreren gleichen oder unterschiedlichen Elementen in einer oder mehreren Dimensionen. Arrays finden sich in den

Biowissenschaften sehr häufig als eine Anordnung auf einem zumeist planaren Träger. Sind die immobilisierten Elemente mit einer Dichte von über 200 Stück pro cm^2 auf einem solchen Träger immobilisiert, so spricht man von einem Mikroarray.^[4]

Bei der Herstellung von Arrays sind einige Faktoren zu beachten, die eng miteinander verknüpft sind, daher kann man auch von einem gesamten Array-System sprechen. Ein solches System besteht aus den Fängermolekülen auf der Oberfläche, dem Analyten, der auf die Oberfläche gegeben wird, und der Auslesemethode (z.B. Fluoreszenz). Die Identität einer Probe lässt sich nach Auslesen aus der Position auf dem Array ableiten. Aus den Eigenschaften der Fängermoleküle ergeben sich die möglichen Immobilisierungsmethoden, desweiteren die Art wie die Substanzen bzw. deren Lösungen auf die Oberflächen gebracht werden können.

Zur Immobilisierung der verschiedenen Fängermoleküle auf einer Oberfläche stehen abhängig von den Fängermolekülen, der Herstellungsmethode des Arrays und der Detektionsmethode eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung. Die Anbindung kann im Hinblick auf die chemische Funktionalitäten der Fängermoleküle spezifisch oder unspezifisch, jeweils kovalent oder nicht-kovalent erfolgen.^[8,11] In vielen Fällen ist eine spezifische Anbindung nicht erforderlich. Soll eine Anbindung aus sterischen Gründen, oder wenn die Anbindung an die Oberfläche großen Einfluss auf die Aktivität des zu immobilisierenden Fängermoleküls haben kann, seitenkettenspezifisch erfolgen, stehen unterschiedliche Methoden für eine Oberflächenderivatisierung zur Verfügung.^[11] Eine spezifische nicht-kovalente Immobilisierung funktioniert beispielsweise über Ni^{2+} -NTA-(His-Tag),^[81] Glutathion (GST-Tag),^[82] Avidin (Biotin-Tag),^[83,84] Protein A/G (IgG Fc Region)^[85,86] oder Oligo-DNA (Oligo-PNA).^[87-92] Eine spezifische kovalente Anbindung kann durch thiolhaltige Verbindungen auf Maleinimid- oder Bromoacetyl-derivatisierten Oberflächen erfolgen; außerdem auf Glyoxylyl-, Semicarbazid- oder den in dieser Dissertation zeitgleich mit Lesacherre *et al.*^[93] entwickelten Thiolester-derivatisierten Glasoberflächen; ferner über die sehr spezifische Staudinger-Ligation,^[94,95] eine Diels-Alder-Reaktion,^[96] durch photoreaktive Gruppen,^[36] sowie durch Anbindung von Thiolen an Goldoberflächen.^[97-100] Nichtspezifische Anbindung findet nicht-kovalent auf Oberflächen aus beispielsweise PVDF, Nitrocellulose, und Poly(L-Lysin) sowie auf hydrophobisierten Glasoberflächen^[101] statt, oder kovalent auf Epoxid-,^[102,103] Aldehyd-,^[104] Succimidylester-^[105] und Isothiocyanat-derivatisierten Oberflächen. Bei diesen nichtspezifischen Anbindungen können auch, falls vorhanden, mehrere funktionelle

Gruppen eines Moleküls mit der Oberfläche reagieren, da die Reaktivität der Oberfläche häufig gegen funktionelle Gruppen gerichtet ist die häufig vorkommen (z.B. Amin).

Die mögliche Immobilisierungsstrategie hängt auch von der Synthesemethode der zu immobilisierenden Verbindungen ab. Dies ist entweder durch direkte Synthese der *creening*-Verbindungen auf der Oberfläche selbst möglich oder indem die Verbindungen zuerst hergestellt und nachfolgend in Lösung auf die Oberflächen gebracht werden. Im ersten Fall lassen sich durch Methoden der Festphasenchemie Kollektionen von Substanzen auf den Oberflächen synthetisieren.^[30,106] Ein Beispiel hierfür ist neben dem ersten DNA-Mikroarray Prototyp auf Goldoberflächen die so genannte SPOT-Synthese auf Nitrozellulosemembranen.^[107] Für den Fall eines Aufbringens der fertigen Verbindungen auf die Oberflächen stehen mehrere Technologien zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist das Aufbringen mittels Stempeltechniken.^[108,109] Diese funktionieren sehr reproduzierbar und die Stempel sind wieder verwendbar. Eine weitere Möglichkeit ist das Aufbringen mit Nadel-Robotern (Nadeldruckern). Die Verbindungen werden durch eine oder mehrere Metallnadeln aus einer Mikrotiterplatte genommen, wobei ein kleiner Tropfen an den Nadeln hängen bleibt. Durch Kontakt mit der Oberfläche fließt die Flüssigkeit ab und bildet einen Spot auf der Oberfläche. Dabei haben die Nadeln je nach gewünschter Dosiermenge unterschiedliche Designs wie beispielsweise *Split-Pins*,^[9,110] *Pin & Ring*^[111] usw. Ein Nachteil dieser Technologie ist, dass die Arrayoberfläche beim Kontakt mit den Nadeln beschädigt werden kann. Zudem bestehen große Einschränkungen im Hinblick auf die Verwendung nichtwässriger Lösungen oder größerer Anteile davon in den Pipettierlösungen, da die Eigenschaften der Lösung wichtig für das Abfließen auf die Oberfläche sind. Nadeldrucker waren die ersten zuverlässigen Pipettierroboter. Als Alternative dazu wurden Ende der Neunziger Jahre kontaktfreie Pipettierroboter entwickelt, die vom Prinzip her gleich einem Tintenstrahldrucker arbeiten.

In dieser Arbeit wurden die Lösungen der verwendeten Substanzen entweder zu Testzwecken manuell mit einer 2 µl-Pipette oder mit Hilfe eines kontaktfreien Nanopipettier-Roboters mit piezoelektrischen Pipetten auf die Oberflächen pipettiert. Solche Nanopipettier-Roboter können je nach Bauart Lösungen mit sehr verschiedenen Eigenschaften pipettieren. Bezüglich der Eigenschaften der zu pipettierenden Lösungen bestehen jedoch auch hier Einschränkungen. Die meisten Pipettierroboter wurden für die Anwendung von Oligonucleotidlösungen entworfen und sind somit optimiert für das Pipettieren von wässrigen Lösungen. Daher lassen sich Lösungen mit stark von Wasser abweichenden Eigenschaften manchmal nur schwer pipettieren. Je nach Roboter können

jedoch die Tropfenabgabeparameter soweit verändert werden, dass ein zufrieden stellendes Pipettieren möglich ist. Eine Ausnahme bilden Lösungsmittel mit einem sehr hohen Dampfdruck. Reines Acetonitril, Ethanol und Dichlormethan lassen sich nur in hoher Verdünnung mit Wasser pipettieren.

Die Wahl des Trägermaterials und damit der Immobilisierungsmethode ist auch stark abhängig von der gewählten Detektionsmethode. Einige der Abschnitt 2 erwähnten Detektionsmethoden erfordern spezielle Oberflächen (z.B. SPR, RIFS). Häufig handelt es sich dabei um metallische Oberflächen, Oberflächen aus Metalloxiden bis hin zu Lichtwellenleitern.

Für die Mikroskopie, sowie für die übliche Detektion mit fluoreszenzbasierten Mikroarray-Scannern, sind optisch transparente Träger notwendig. Funktionalisierte Glasträger im Format von Objektträgern werden heutzutage standardmäßig für die Herstellung von Mikroarrays verwendet und sind für die Mikroskopie geeignet. Die Glasträger werden in einem oder mehreren Schritten soweit verändert, dass die gewünschte Anbindungsmethode ermöglicht wird. Dies geschieht im ersten Schritt über eine Anbindung von Silanen an die Silanolgruppen des Glases. Die Silanolgruppen sind jedoch in ihrer Reaktivität stark von Verunreinigungen und der chemischen Zusammensetzung des Glases abhängig. So finden sich auf der Oberfläche statt der Silanolgruppen häufig auch Siloxane, die zum Beispiel durch Reaktion mit Molekülen aus der Luft entstanden sind. Daher werden Glasträger vor der Modifizierung mit aggressiven Säuren und/oder Basen behandelt, um alle Verunreinigungen von der Oberfläche zu entfernen und wieder reaktive Silanolgruppen zu erzeugen. Der nachfolgende Silanisierungsprozess kann auf mehrere Arten erfolgen. Es wurden Methoden zur Silanisierung in wässrigen und wasserfreien Lösungsmitteln, sowie ganz ohne Lösungsmittel beschrieben,^[16,104,112-118] des Weiteren unter erhöhter Temperatur^[119] und über die Gasphase.^[120] In der Literatur finden sich je nach funktioneller Gruppe des Silans eine Vielzahl von Varianten der Herstellung.^[118,121,122] Da für wasserfreies Arbeiten keine Argon-Box zur Verfügung stand, fiel im Falle der Silanisierung mit Aminosilan die Entscheidung auf eine nicht wasserfreie Silanisierungsmethode. Durch die definierte Zugabe von Wasser zur Reaktionslösung wurde die Reaktion vom Einfluss der Luftfeuchtigkeit entkoppelt. Als Silanisierungsreagenzien dienen üblicherweise Organosilane, die über hydrolysierbare Gruppen wie Chlor- oder Alkoxy-Gruppen am Silizium verfügen. Organosilane können als Vermittlerverbindung für den Übergang von anorganischen und organischen Substanzen verstanden werden und können neben der Anbindung an Siliziumdioxidträgern auch an

Metalloberflächen anbinden.^[123] Die Reaktivität und Struktur der Organosilane haben einen großen Einfluss auf die Struktur und Stabilität der Oberflächenbeschichtung.^[118,124,125] Silane mit mehreren hydrolysierbaren Gruppen neigen zur Quervernetzung auf der Oberfläche. Dies kann durch sterische Hinderung beeinflusst werden.^[126] Jedoch gelten Silane mit drei hydrolysierbaren Gruppen als diejenigen, die die stabilste Oberfläche auf einem Glasträger bilden.^[112]

In den Abbildungen 3.4 und 3.5 sind die Reaktionsschemata zum Bindungsmechanismus und zur Funktionalisierung der Oberflächen dargestellt. Bei der Anbindung an die Silanolgruppen wird davon ausgegangen, dass das Organosilan erst hydrolysieren muss, bevor die Kondensation der beiden Silanole erfolgt. Für die Hydrolyse ist eine katalytische Menge Wasser nötig.^[114] Dieses muss nicht unbedingt aus der Organosilanlösung stammen. Wasser kann auch bereits auf der Oberfläche als dünne Schicht vorliegen.^[127] Daher kann auch auf die Verwendung von wasserhaltigen Lösungsmitteln verzichtet werden, jedoch ist die Silanisierung auf diese Art unter Umständen von einem weiteren äußeren Einfluss wie der Luftfeuchtigkeit abhängig.^[114] Welchen Einfluss äußere Faktoren wie beispielsweise Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf den Silanisierungsprozess überhaupt haben ist jedoch unklar. Im Anschluss an die Hydrolyse erfolgt die Kondensation der durch Wasserstoffbrücken gebundenen Silane an die Oberfläche. Dabei reagieren nicht immer alle Hydroxygruppen eines Trihydroxysilans mit der Oberfläche. Teilweise erfolgt auch eine Vernetzung mit anderen Organosilanen oder die Silane wurden erst gar nicht hydrolysiert. Um die an der Oberfläche haftenden Silane vollständig abreagieren und vernetzen zu lassen, werden die von der Reaktionslösung befreiten und gespülten Oberflächen häufig erhitzt. Dabei findet eine so genannte thermische Ausheilung ("thermal curing") der Oberfläche statt.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Silanisierungsmethoden verwendet, wobei je nach verwendetem Silan verschiedene Funktionalitäten für die Anbindung von Fängermolekülen auf den Oberflächen eingeführt wurden. Das Aminosilan APTES wurde in einer wässrigen Lösung auf der Oberfläche verankert. Die andere Silanisierungsmethode war die direkte Reaktion von reinem GOPTS mit der Glasoberfläche. In letzterem Fall wurde die Oberfläche nachträglich noch weiter modifiziert um unspezifische Wechselwirkungen des nicht mit Fängermolekülen beschichteten Teils des Arrays mit den Analyten besser zu unterbinden (siehe Kapitel 4).

Ein wichtiges Kriterium, wenn es um die Vergleichbarkeit innerhalb eines Arrays geht, ist natürlich auch die Qualität der pipettierten Spots, insbesondere im Hinblick auf die

Uniformität der Spots. Homogenität, Intensität und Größe sollten bei gleichen Eigenschaften der Spots möglichst ähnlich sein. Um eine eine bessere Vergleichbarkeit der absoluten Intensitäten zwischen verschiedenen Arrays zu erhalten, empfiehlt es sich entsprechende Referenzsubstanzen auf die Oberflächen zu pipettieren. Die fluoreszenten Referenzspots werden mit den erhaltenen Signalen verglichen und auf den Array normiert, so dass je nach Reaktivität der Oberfläche oder veränderten Inkubationsbedingungen die relativen Intensitäten der Signale vergleichbar sind. Im Hinblick auf die Uniformität der Spots spielt das Eintrocknen der pipettierten Lösungen nach der Reaktionszeit auf der Oberfläche eine wichtige Rolle. Für das Eintrocknen werden in der Literatur zwei Modi beschrieben^[128]: Ein Eintrocknen bei konstantem Kontaktwinkel und ein Eintrocknen bei konstanter Kontaktfläche. Diese Benetzungshysterese kann durch Rauheit der Oberfläche, chemische Instabilität und Heterogenität der Oberfläche beeinflusst werden. Jedoch sind die genauen Ursachen des Verhaltens und der Grund dieser Hysterese noch nicht vollständig verstanden.^[128]

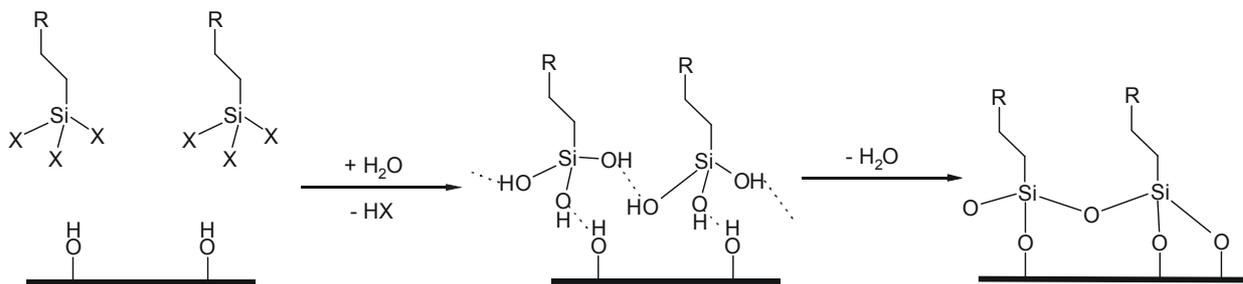


Abbildung 3.4: Reaktionsschema der Silanisierung

Praktisch gesehen kann der Eintrocknungsprozess einem reinen Modus wie oben beschrieben folgen, oder aber er wechselt während des Prozesses. Auf hydrophoben Oberflächen folgt beispielsweise Wasser beim Eintrocknen dem Modus mit konstantem Kontaktwinkel.

In dieser Arbeit wurde das Eintrocknungsverhalten der verschiedenen Proben auf den unterschiedlichen Oberflächen nicht explizit untersucht, jedoch mussten bei der Anbindung der NTA-Moleküle viele Versuche und letztlich eine Änderung der Oberflächenanbindung vorgenommen werden, um eine Verbesserung der Qualität der Spots zu erhalten. Letztlich hat also die Änderung des Eintrocknungsverhalten der Spots auf einer anderen Oberfläche zu einer Verbesserung der Spotqualität beigetragen.

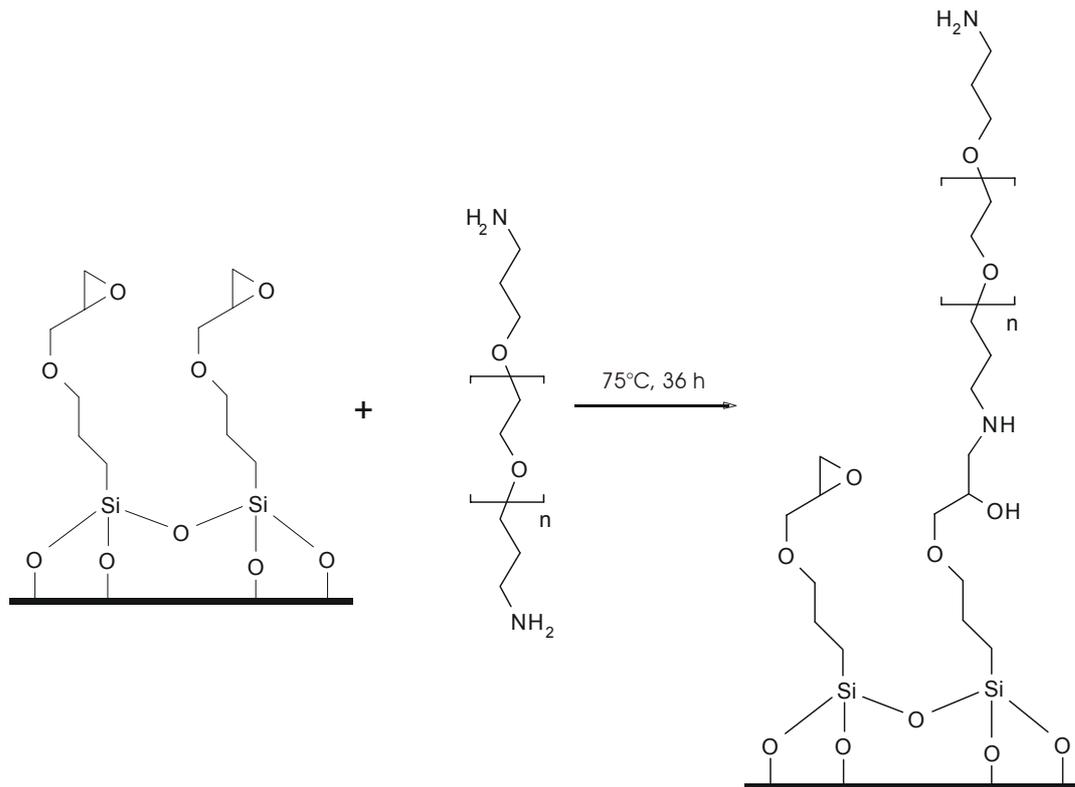


Abbildung 3.5: Beispiel für eine Derivatisierung einer epoxyfunktionalisierten Oberfläche mit einem Amin. Im Beispiel dient als Amin ein Diaminopolyethylenglykol.

3.4 NTA-Chelatoren

NTA-Chelatoren werden standardmäßig bei der Aufreinigung von Oligohistidin markierten Proteinen durch Metallionenaffinitäts-Chromatographie verwendet.^[129] Hierbei werden die Proteine über ihr Oligohistidin an die mit Ni^{2+} beladenen NTA-Moleküle, die in hoher Dichte auf einem Trägermaterial immobilisiert sind, komplexiert. Nach dem Abspülen der nichtmarkierten Proteine mit Puffer wird die NTA-Aufreinigungssäule mit einer Imidazolösung gespült. Dabei verdrängt das in hohem Überschuss zugegebene Imidazol die Oligohistidine an den Ni^{2+} -Ionen. Diese Metallionenaffinitäts-Chromatographie wurde bereits 1975 eingeführt.^[130] Oligohistidin markierte Proteine werden für gewöhnlich rekombinant hergestellt.

Die Bindung an Übergangsmetalle mit NTA-Chelatoren wurde bereits ebenfalls erfolgreich zur Detektion von Oligohistidinen,^[131-133] zur Anbindung an Lipidmembranen^[134-136] und zur Bindung von Proteinen an NTA-Moleküle in Lösung

genutzt.^[137] Diese Bindung wurde auch an Oberflächen, die mit NTA-Molekülen derivatisiert waren, mit Oberflächenplasmonenresonanz und RfS untersucht^[133,138] sowie auch auf Glasoberflächen mittels TIRF.^[139] Die Bindung wurde auch bereits ausgenutzt um histidinmarkierte Proteine auf NTA-mikrostrukturierten Goldoberflächen zu immobilisieren und nachfolgend Zellen auf diesen Oberflächen zu kultivieren.^[140] Auf diese Art wurden zelluläre Mikroarrays erzeugt. Über ATR-FTIR Spektroskopie wurden ebenfalls Oligohistidin-Peptide an NTA-SAM Oberflächen auf Gold oder SiO₂ untersucht.^[141] Die Eigenschaften der Bindung von Proteinen und Peptiden wurde im Hinblick auf Reversibilität, Bindungsmechanismus und Unterschiede zwischen verschiedenen Chelat-Molekülen untersucht.^[133,137]

Ein Vorteil der koordinativen Bindung an Übergangsmetallionen ist, dass nur Cystein und Histidin eine ausgeprägte Affinität an diese Ionen zeigen (auch Glutamat, Aspartat, Arginin und Lysin zeigen eine schwächere Affinität), also zwei Aminosäuren, die weniger häufig in Proteinen auftreten. Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass die Bindung durch Zugabe des Kompetitors Imidazol unter milden Bedingungen schaltbar ist.

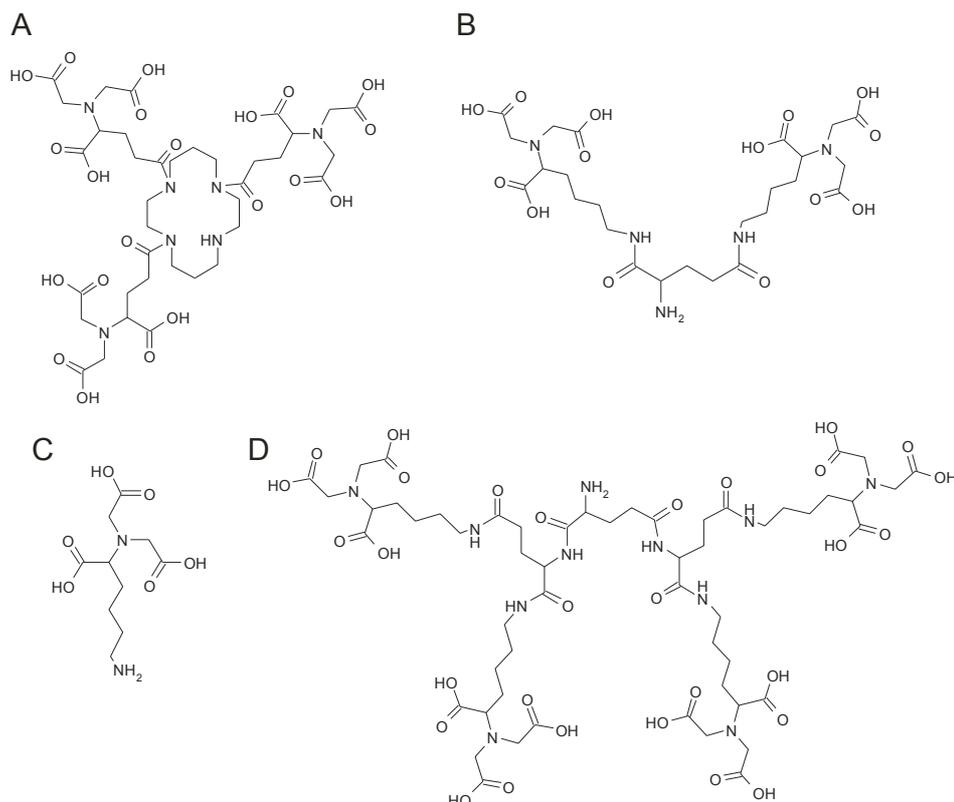


Abbildung 3.6: Strukturformeln der verwendeten NTA-Chelat-Moleküle. (A) Tris-, (B) Bis-, (C) Mono- und (D) Tetrakis-NTA-Moleküle.

Die bisherigen verwendeten, konventionellen NTA-Moleküle tragen nur einen einzigen Chelatkopf (Mono-NTA). Durch die Synthese^[133,137,142] und Anwendung von Molekülen mit Multichelat-Gruppen wie Bis-, Tris- oder Tetrakis-NTA-Molekülen (Abbildung 3.6) ist die damit verbundene multivalente Anbindung von Oligohistidine stärker.^[133,137]

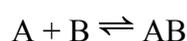
Die Bindung der Histidine an die Ni²⁺-NTA-Chelat-Moleküle erfolgt durch eine oktaedrische Koordination an den Ni²⁺-Ionen. Zwei Imidazolringe der Histidinkette, die drei Acetat-Gruppen und der Stickstoff des NTAs können die sechs Koordinationsstellen zum Ni²⁺-Ion bilden. Im Falle fehlender Koordinationspartner, wie sie bei anderen Chelatoren (z.B. IDA) auftreten können, oder auch bei unvollständiger Koordination durch das Histidin (z.B. bei zu kurzen oder sterisch eingeschränkten Histidinen), koordiniert Wasser an das Ni²⁺-Ion. Dies wurde durch Röntgenstrukturanalyse an Proteinen oder auch bei anorganisch hergestellten Komplexen, die mit einem einzelnen Imidazol an ein Ni²⁺-Ion koordinieren, gezeigt.^[143-147] Abbildung 3.7 zeigt schematisch die Bindung eines Oligohistidins auf einer Ni²⁺-NTA-belegten Oberfläche.

In dieser Arbeit sollten die His-Ni²⁺-NTA-Komplexe im Mikroarrayformat unter gleichzeitiger Verwendung von His₁₀- und His₆-Peptiden mit mikroskopischen Methoden untersucht werden. Dabei sollte auch die Dissoziation der beiden Oligohistidine bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen an der Oberfläche gezeigt werden. Parallel dazu wurden von Kooperationspartnern Dissoziationsmessungen zwischen Oligohistidin markierten Proteinen und NTA-Multichelatoren sowohl in Lösung, als auch auf großflächig beschichteten Oberflächen durchgeführt.

Eine Schwierigkeit der Messungen an Oberflächen ist mit Sicherheit der Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen mit der Oberfläche. Dies gilt sowohl für die Bindung der Oligohistidine an die Ni²⁺-NTA-Moleküle, als auch schon für die Bindung der Ni²⁺-NTA-Moleküle an die aktivierten Glaträger selbst. Jedoch lässt sich durch Kontrollexperimente eine Spezifität der Bindung zeigen.

Die Messung von Bindungskonstanten ist bereits erfolgreich mit anderen niedermolekularen Rezeptor-Ligand-Systemen auf Mikroarrays durchgeführt worden.^[116,117] Hierbei wurde die Anbindung von fluoreszenten Liganden über konfokale Fluoreszenzdetektion am Beispiel einer bekannten Rezeptor-Ligand Wechselwirkung untersucht.

Das Bindungsgleichgewicht von fluoreszenten Oligohistidinen an NTA-Moleküle lässt sich zunächst als Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung auffassen und ganz allgemein darstellen als:



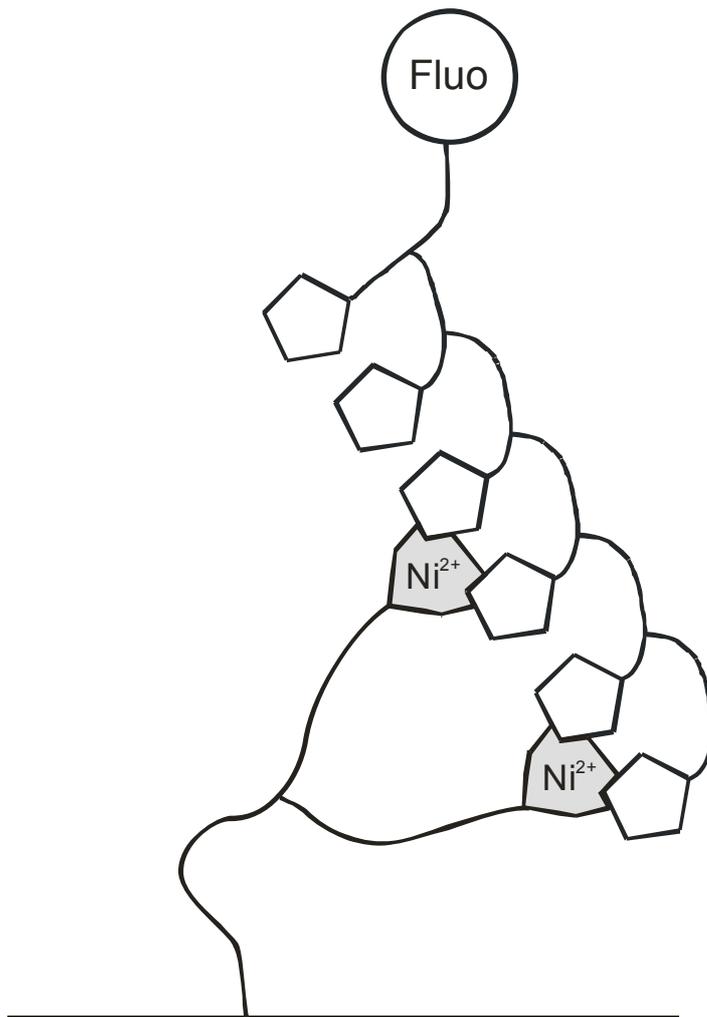


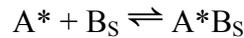
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung eines fluoreszent markierten Hexahistidins an ein oberflächengebundenens Ni²⁺-Bis-NTA-Molekül. Dargestellt ist die idealisierte Bindung (Histidine binden der Reihe nach).

Die Hinreaktion der Bindung wird dabei als Assoziation und die Rückreaktion als Dissoziation bezeichnet. Allgemein gilt für die Bildung des Komplexes das Massenwirkungsgesetz (3.1).

$$K_{A_{AB}} = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} \quad (3.1)$$

$K_{A_{AB}}$ wird als die Assoziationskonstante bezeichnet. Die Dissoziationskonstante $K_{D_{AB}}$ ist der Kehrwert der Assoziationskonstante. Die messbare Größe der in dieser Arbeit verwendeten Messmethode durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie ist die Fluoreszenz

auf der Oberfläche. So lässt sich für die Reaktion eines fluoreszenten Liganden an die an die Oberfläche gebundenen NTA-Rezeptoren formulieren als:



Hierbei ist A^* die in der Lösung über der Oberfläche vorhandene Menge an fluoreszente Oligohistidin und B_S das auf der Oberfläche gebundene NTA-Molekül. Die aus der Messung erhaltene Änderung des Fluoreszenzsignals spiegelt die Änderung der Menge des auf der Oberfläche gebundenen Liganden A^* wieder und gibt somit direkt Auskunft über die Bindung. Die Fluoreszenz an der Oberfläche wird erhalten, indem die Ligandfluoreszenz von der Gesamtfluoreszenz subtrahiert wird. Dies erfolgt durch Abziehen der Fluoreszenz außerhalb der rezeptorfunktionalisierten Flächen von der Fluoreszenz auf den rezeptorfunktionalisierten Flächen. Die Fluoreszenz außerhalb der rezeptorfunktionalisierten Flächen hat ihre Ursache in der Fluoreszenz der gelösten Moleküle an der Oberfläche. Sie wird als Hintergrundfluoreszenz bezeichnet. Die erhaltene Größe wird im Folgenden als Nettofluoreszenz bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde die Dissoziation der Oligohistidin-Multichelatgruppen durch die Zugabe von Imidazol untersucht. Idealerweise ändert sich das erhaltene Fluoreszenzsignal gemäß:

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R \quad (3.2)$$

$$\Leftrightarrow \int_{R_0}^R \frac{dR}{R} = - \int_{t_0}^t k_d dt \quad (3.3)$$

$$\Leftrightarrow [\ln R]_{R_0}^R = [-k_d t]_{t_0}^t \quad (3.4)$$

$$\Leftrightarrow \ln R - \ln R_0 = -k_d t - k_d t_0 \quad (3.5)$$

$$\Leftrightarrow \ln \left(\frac{R}{R_0} \right) = -k_d (t - t_0) \quad (3.6)$$

$$\Leftrightarrow \frac{R}{R_0} = e^{-k_d (t - t_0)} \quad (3.7)$$

somit erhält man für den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals:

$$R = R_0 e^{-k_d(t-t_0)} \quad (3.8)$$

k_d ist die Dissoziationskonstante, R das um den Hintergrund korrigierte gemessene Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t und R_0 das um den Hintergrund korrigierte gemessene Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t_0 .

Die Bindung von Oligohistidin an Multichelat-Gruppen ist, wie schon erwähnt, nicht besonders gut definiert. Außerdem erfolgt die Bindung über mehrere Bindungszentren und eine Rückbindung ist dadurch ebenfalls wahrscheinlich. Bei hohen Konzentrationen von NTA-Molekülen auf der Oberfläche besteht auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Anbindung von einem Oligohistidin an mehrere NTA-Chelatoren. Unter Berücksichtigung dieser Effekte wurde die Bindung als Bindung an mehrere inhomogene Bindungsstellen mit Rückbindungsmöglichkeit behandelt.^[133] Gleichung (3.2) wurde dazu um einen Rückbindungsanteil, der von der Konzentration des Oligohistidins an der Oberfläche R und den noch freien NTA-Gruppen auf der Oberfläche $R_{\max}-R$ abhängt, erweitert. Daraus ergibt sich bei der Dissoziation für die Änderung des Fluoreszenzsignals:

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R + d(R_{\max} - R)R \quad (3.9)$$

R_{\max} ist die maximal mögliche Fluoreszenz (größte Anzahl an gebildeten Komplexen) auf der Oberfläche und d spiegelt die Neigung eines dissoziierten Moleküls zur Rückbindung wieder. Variablentrennung und Integration ergibt:

$$R = R_0 \left(R_{\max} - \frac{k_d}{d} \right) \frac{1}{\left(R_{\max} - \frac{k_d}{d} - R_0 \right) e^{(-dR_{\max} + k_d)(t-t_0)} + R_0} \quad (3.10)$$

Die vereinfachte Lösung der Differentialgleichung (3.9) lautet:

$$R = \frac{R_{fest} R_0}{(R_{fest} - R_0) e^{-a(t-t_0)} + R_0} \quad (3.11)$$

mit

$$a = dR_{\max} - k_d \quad (3.12)$$

und

$$R_{fest} = R_{\max} - \frac{k_d}{d} \quad (3.13)$$

R_{fest} ist der Anteil an Peptid, der auf der Oberfläche durch Rückbindung auch nach beliebig langer Zeit nie mehr von der Oberfläche dissoziiert. Bei Verwendung von Imidazol zur

Verdrängung von Oligohistidin kommen nun noch viele weitere Effekte hinzu. So nimmt beispielsweise R_{\max} mit zunehmender Imidazolbelegung ab und die Neigung einer Rückbindung wird ebenfalls kleiner. Außerdem muss auch noch das Bindungsgleichgewicht von Imidazol berücksichtigt werden. Wird die Änderung des Fluoreszenzsignals in Gleichung (3.11) auf diese Bedingungen abgeändert und R_{fest} als Funktion der Imidazolkonzentration c aufgetragen, so kann unter Berücksichtigung der Unkenntnis des genauen Bindungsmechanismus eine sigmoidale Funktion wie (3.14) angenommen werden.^[133]

$$R_{fest}(c) = \frac{R_{fest,max}}{1 + \left(\frac{c}{EC_{50}}\right)^p} \quad (3.14)$$

c ist die Konzentration an Imidazol in der Lösung über dem Mikroarray. EC_{50} gibt die Konzentration bei halber Kurvenhöhe an und wurde als Faktor für den Vergleich von mehreren Kurven herangezogen. p gibt Auskunft über die Steilheit der Kurve und ist ein indirektes Maß für die Anzahl der beteiligten Bindungsstellen.

In dieser Arbeit wurden die niedermolekularen Wechselwirkungen von unterschiedlichen Oligohistidinen auf unterschiedlich dicht mit NTA-Chelatoren beladenen Oberflächen untersucht. Dabei sollten zwei Oligohistidine parallel untersucht werden.

3.5 Molekulardynamische Methoden^[148,149]

Um Informationen bezüglich möglicher Geometrien und Stöchiometrien zwischen den für die Untersuchungen auf den Oberflächen eingesetzten Oligohistidinen und Ni^{2+} -NTA-Komplexen zu erhalten, wurden molekulardynamische Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen Geometrien sollten verbesserte NTA-Chelatoren oder andere Histidin-Marker für eine optimierte Bindung der Oligohistidine an die Chelatoren entworfen werden. Molekulardynamische Methoden beruhen auf der Berechnung der potentiellen Energie eines Systems (z.B. eines einzelnen Moleküls), indem die Positionen der Atome durch Anwendung von Newtons Gesetzen der Bewegung über einen kurzen Zeitraum bei gegebenem Druck und/oder gegebener Temperatur immer wieder berechnet werden. Dabei berechnet sich jeder Zustand deterministisch aus dem vorhergehenden (im Gegensatz zur Monte-Carlo-Methode). Die aufeinander wirkenden Kräfte der sich bewegenden Atome ergeben sich dabei unter Zuhilfenahme eines Potentials (z.B. Lennard-Jones). Die Gleichungen der Bewegungen der Atome werden deshalb über einen Zeitraum

hinweg integriert und die Berechnung wird in viele kleine Zeitschritte unterteilt deren Größe üblicherweise zwischen einer und zehn Femtosekunden beträgt. Nach jedem Zeitintervall werden die Kräfte, die auf die Atome wirken, berechnet und daraus die Beschleunigungen und Bewegungen ermittelt. Während des Zeitintervalls werden die wirkenden Kräfte als konstant betrachtet, anschließend die Atome an die aus den Bewegungen resultierenden Positionen gesetzt und erneut die auf die Atome wirkenden Kräfte berechnet. So lässt sich eine Trajektorie erstellen, die die Änderung der Geschwindigkeiten und der Positionen der Atome und der sich daraus ergebenden potentiellen Energie über die Zeit beschreibt.

Die Parameter, die für die Berechnung der wirkenden Kräfte aufgrund eines gewählten Potentials benötigt werden, basieren auf Kraftfeldern, die vorher für das System definiert werden müssen. Die Geschwindigkeiten der Atome werden bei Initialisierung des Systems randomisiert auf die Atome verteilt. Daraus ergibt sich auch, dass zwei Molekulardynamiken zweier genau gleicher Systeme bei Verwendung gleicher Parameter nicht zum gleichen Ergebnis führen müssen. Da der Rechenaufwand bei steigenden Atomzahlen exponentiell wächst, ist es sinnvoll, so genannte Cutoff-Radien für elektrostatische Wechselwirkungen einzuführen. Das ist der Radius um ein Atom ab dem keine Wechselwirkungen zu anderen Atomen mehr zu berechnen sind.

Nach dem Ende einer molekulardynamischen Simulation kann sich das System in einem sehr gespannten Zustand mit ungünstigen Anordnungen der Atome zueinander befinden. Um diese Spannungen zumindest lokal zu beheben, werden Minimierungen durchgeführt. Die Minimierung von Systemen dient zum Auflösen von offensichtlich ungünstigen Konformationen von Molekülen. Sie ist ein zweistufiger Prozess. Zunächst wird die potentielle Energie des Systems über die Aufsummierung aller einzelnen auftretenden Energiebeiträge zur potentiellen Energie wie beispielsweise die der Bindung, des Winkels, der Torsion sowie den Nicht-Bindungspotentialen bestimmt und diese dann durch schrittweise Änderungen der Konformation so verändert, dass die Energie möglichst klein wird. Die verwendeten Kraftfelder enthalten sowohl die funktionelle Form des Ausdrucks der potentiellen Energie unter Berücksichtigung der Atomkoordinaten als auch den gesamten Satz an Parametern (z.B. Kraftkonstanten). Für die Minimierung stehen verschiedene Minimierungsalgorithmen zur Verfügung. Gemeinsam ist ihnen, dass durch die Veränderung der Konformation das für die vorhandene Ausgangssituation erreichbare Energieminimum ermittelt wird. Bei Minimierungen sind keine Optimierungen über eine

Energiebarriere hinweg möglich. Energiebarrieren lassen sich (unter Umständen nur bei erhöhter Temperatur) nur durch Molekulardynamiksimulationen überwinden.

Die meisten kommerziell erhältlichen Kraftfelder, die bei Simulationen eingesetzt werden, sind jeweils für einen Anwendungszweck bezüglich ihrer Parameter und des Ausdrucks der potentiellen Energie optimiert oder wurden von vornherein für diesen Zweck entwickelt. Sie sind zumindest teilweise empirischer Natur, sollten aber eine Übertragbarkeit auf Moleküle gleichen Typs ermöglichen. So wurde beispielsweise das Kraftfeld AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)^[150,151] speziell für Berechnungen von Makromolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren entwickelt. Das Kraftfeld CVFF (Consistent-Valence ForceField von Accelrys Inc.) wurde für Aminosäuren, Wasser und einige funktionelle Gruppen entwickelt, so dass es für viele organische Moleküle aber auch für Proteine einsetzbar ist. Das in dieser Arbeit verwendete Kraftfeld ESFF (Extensible Systematic ForceField) ist ein so genanntes auf Regeln basierendes Kraftfeld, das sich für metallorganische Verbindungen eignet, und für fast das gesamte Periodensystem verwendbar ist.^[152,153] Es ist wie alle regelbasierten Kraftfelder abhängig von atomaren Parametern in Verbindung mit theoretisch und empirisch abgeleiteten Regeln für die Generierung von Kraftfeldparametern. Das ESFF wurde bereits mit gewissem Erfolg für die Untersuchung von Wechselwirkungen organischer Moleküle mit Metallionen eingesetzt,^[152-154] und speziell das System Nickel-Histidin wurde bereits mit dem hier gewählten Kraftfeld molekulardynamisch untersucht.^[152]

Die Simulationen in dieser Arbeit wurden als Simulated Annealing durchgeführt. Dabei handelt es sich um molekulardynamische Simulationen, bei denen das System zunächst bei hohen Temperaturen molekular+dynamisch simuliert und anschließend in mehreren Schritten langsam abgekühlt wird. Nachfolgend schließen sich Minimierungsschritte an bevor die erhaltene Struktur gespeichert wird. Anschließend wird wieder erhitzt und die Prozedur wiederholt sich. Insgesamt entspricht diese Prozedur einem Tempern, wie es bei Metallen und Legierungen angewendet wird, nur über einen sehr kleinen Zeitraum. Auf diese Art und Weise können Potentialbarrieren durch wiederholte Durchläufe überwunden und viele verschiedene Konformationen eines Moleküls erhalten werden. Je nach Größe des Systems/Moleküls ergibt sich ein erheblicher Rechenaufwand, der selbst bei leistungsstarken Computersystemen sehr lange dauern kann. (Ein Simulated Annealing des in dieser Arbeit untersuchten Systems in einer Wasserbox wurde deshalb nicht durchgeführt.)

3.6 Die Native Chemische Ligation

Die Native Chemische Ligation ist eine sehr selektive Methode um zum Beispiel zwei größere ungeschützt vorliegende Peptide miteinander kovalent im wässrigen Medium unter Bildung einer stabilen Amidbindung zu verbinden.^[155-158] Dabei war es häufig das Ziel, auf semipräparative Art und Weise Proteine durch Fragmentkondensation zu synthetisieren. Jedoch lässt sich die native chemische Ligation auch anwenden, um Proteine beispielsweise mit einem fluoreszenten Marker zu versehen.^[73] Gleiches gilt natürlich auch für Peptide. Die native chemische Ligation beruht auf der Reaktion eines C-terminalen Thiolesters eines Peptids, Proteins oder anderen kleinen Moleküls mit einem N-terminalen Cystein eines anderen Peptides oder Proteins. Denkbar ist die Reaktion auch unabhängig von peptidischer Struktur, so dass ein Thiolester mit einer organischen Verbindung mit Amino- und Thiolgruppe reagiert. Jedoch muss die Thiolgruppe in β -Position zur Aminogruppe am Kohlenstoffgerüst angebunden sein. Die Reaktion findet zweistufig statt (Abb. 3.10). Im ersten Schritt findet ein Thiolesterausaustausch statt, bei dem die Abgangsgruppe des benzylichen Thiolesters durch das Thiol des Cysteins reversibel ersetzt wird. Im zweiten Schritt findet ein S \rightarrow N-Acyltransfer statt. Das Konjugat lagert sich durch Amidbindung bei Freisetzung der Thiolfunktion des Cysteins um. Bei Proteinen und Peptiden können auch andere Thiolgruppen in internen Cysteinen durch Thiolesterausaustausch mit der eingesetzten Thiolesterkomponente reagieren. Diese Bindung ist jedoch wenig produktiv und zudem reversibel^[156]. Über diese Austauschreaktion lassen sich z.B. durch einen Überschuss an Quenchthiolen (z.B. MESNA) in der Lösung die reversibel gebundenen Cysteine wieder verdrängen.

Für Proteine gibt es bei der Anwendung dieser Methode mehrere Limitationen. Proteine mit einem C-terminalen α -Thiolester waren längere Zeit rekombinant nicht zugänglich.^[75] Proteine mit N-terminalem Cystein, werden üblicherweise rekombinant als Prekursoren hergestellt und mit einer seitenkettenspezifischen Protease gespalten um das N-terminale Cystein zu präsentieren. Dabei können jedoch auch Abspaltungen an anderer Stelle des Proteins auftreten, da die verwendeten Proteasen meist nicht 100%ig spezifisch sind, so dass eine Aufreinigung notwendig ist. Zwei Methoden mit denen diese Problematik umgangen werden kann, sind erstens das Intein vermittelte Protein Splicing,^[159] und zweitens der Ansatz das Cystein am N-Terminus an zweiter Stelle hinter einem Methionin zu exprimieren und nachfolgend das Methionin mit einer endogenen Methioninaminopeptidase selektiv abzuspalten.^[73]

Die native chemische Ligation ist sehr spezifisch und bietet bei der Verwendung von Peptiden den Vorteil, dass das notwendige Cystein, ohne weitere spezielle Reaktionsschritte, am Ende der (Festphasen-) Peptidsynthese (SPPS) am N-Terminus eingeführt werden kann. Der Thiolester lässt sich ebenfalls einfach am C-terminus eines Peptides einführen. Thiolester lassen sich auch leicht auf Oberflächen herstellen, ergeben im Vergleich zu Epoxiden und Thiolen eine stabile Oberflächenderivatisierung, und stellen somit im Zusammenhang mit der nativen chemischen Ligation eine sehr interessante Variante der Oberflächenderivatisierung dar. Ein kleiner Nachteil ist, dass cysteinhaltige Peptide verhältnismäßig leicht oxidieren, was im Hinblick auf die Verwendung und Haltbarkeit großer Peptidbibliotheken von Bedeutung sein kann. Um die Glasoberflächen für Proteine bei möglichst geringem Hintergrund zu nutzen, ist es vorteilhaft, Polyethylenglykole als Spacer zwischen Glas und Thiolesteroberfläche einzuführen. In Abbildung 3.8 ist die in dieser Arbeit verwendete Oberflächenderivatisierung für die native chemische Ligation dargestellt. Insgesamt ist bei der nativen chemischen Ligation allerdings mit geringen Endausbeuten zu rechnen, so dass auf den Oberflächen hohe Überschüsse eingesetzt wurden.

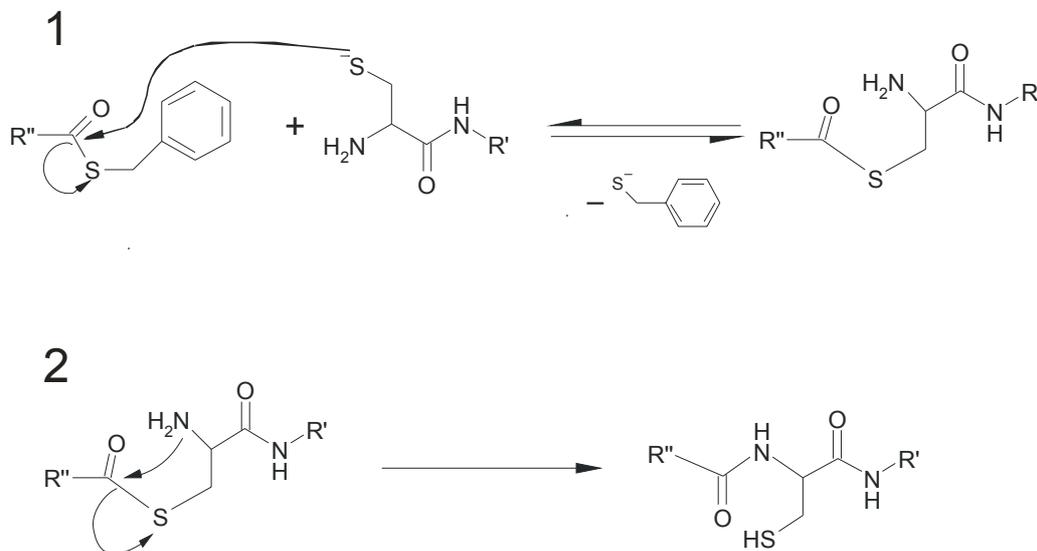


Abbildung 3.8: Reaktionsschema der nativen chemischen Ligation. Im 1. Schritt findet eine reversible Thiolester austauschreaktion statt. Unter basischen Bedingungen greift dabei das Sulfid-Anion am Carbonyl-Kohlenstoff unter Abspaltung des Benzylthiolats an. Im 2. Schritt findet ein spontaner S→N Acyltransfer statt, so dass sich eine Amidbindung unter Freiwerden der Thiolfunktion des Cysteins bildet.

Ein weiterer Vorteil dieser chemoselektiven Immobilisierungsmethode ist die Anbindung nur an einer Stelle des Proteins, wodurch die Konformation und die Orientierung erhalten bleibt. Damit lassen sich beispielsweise Proteine so immobilisieren, dass sich ihre Anheftungsstelle auf der zur Oberfläche gegenüberliegenden Seite des Moleküls befindet. Jedoch ist bis jetzt dazu noch kein direkter Beweis geführt worden.

Die durch den S→N-Acyltransfer freiwerdende Thiofunktion des Cysteins stellt einen bei dieser Immobilisierungsmethode interessanten Aspekt dar, da an dieser Funktionalität mit Hilfe eines Maleinimids oder über eine Disulfidbrücke eine zusätzliche Anbindung eines zweiten Moleküls möglich sein könnte.

In dieser Arbeit wurde die native chemische Ligation für eine selektive Immobilisierung, die insbesondere für Peptide gedacht ist, auf thiolesteraktivierten Glasoberflächen entwickelt und durchgeführt. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit der zusätzlichen Anbindung an die frei gewordene Thiofunktion erprobt. Alle diese Arbeiten wurden zeitgleich zu Lessaicherre *et al.*^[93] durchgeführt.

3.7 Beschichtung von Mikrocantilevern

Das Einsatzgebiet der ersten Mikrocantilever war die simultane Detektion von Verbindungen in der Gassensorik.^[160-162] Nach und nach hält diese Detektionstechnik jedoch auch Einzug in die Biosensorik.^[163] Beispielsweise wurde die Proteinadsorption auf Cantilevern beschrieben und die Adsorption auf verschiedenen beschichteten Oberflächen vermessen.^[164,165] Selbst Konformationsänderungen von Proteinen, die über eine Dauer von zwölf Stunden auftraten, veränderten die Oberflächenspannung auf den Cantilevern, so dass sich die Verbiegung messbar veränderte.^[166] Auch wurden bereits durch Aufbringen von DNA-Proben durch Hybridisierung mit entsprechendem DNA-Material Verbiegungen der Cantilever beobachtet.^[167] Mittlerweile werden mit Hilfe von Cantilevern Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) untersucht und dabei das dynamische und statische Messprinzip für Cantilever verwendet.^[168-170] Des Weiteren wurden auf Cantilevern Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen detektiert,^[171,172] glukosesensitive Cantileverbiosensoren beschrieben^[173] und neuerdings auch Cantileverarrays zur Untersuchung von Peptid-Antikörper-Wechselwirkungen verwendet.^[68,100] Bisherige Immobilisierungsmethoden der Rezeptoren auf den Arrays waren entweder das vollständige Beschichten durch Einlegen des gesamten Arrays in die entsprechenden Fängermoleküllösungen mit anschließendem Entfernen der Verbindungen von den Referenzcantilevern,^[100] oder das

Eintauchen einzelner Cantilever in Mikrokapillaren um verschieden beschichtete Cantilever zu erhalten.^[163] Das Spotten von DNA-Proben auf Cantilever wurde parallel zu der hier gezeigten Arbeit von Bietsch *et al.* durchgeführt und veröffentlicht.^[169] Allerdings geschah dies auf wesentlich größeren Cantilevern, die auch einen erheblich größeren Abstand voneinander hatten als die hier verwendeten.

In dieser Arbeit wurden die von O. Mader^[68,100] durchgeführten Arbeiten auf dem Gebiet der Cantilever um die Funktionalisierung der Oberflächen mit Hilfe eines Nanopipettier-Roboters erweitert. Dies sollte das Beschichten von Mikrocantilevern erheblich vereinfachen, da keine Referenzcantilever nachträglich erzeugt werden müssten und mehrere Substanzen bei niedrigerem Verbrauch an Probenmaterial gleichzeitig auf Cantilevern immobilisiert werden können. Da bereits Messungen mit dem verwendeten Peptid auf sehr ähnlichen Cantilevern durchgeführt waren,^[100] wurde auf solche Messungen mit den beschichteten Cantilever verzichtet. Das verwendete Peptid OM-P18 besaß eine Thiolgruppe über die die Bindung an die Goldoberfläche erfolgen sollte. Es war mit Fluoreszein markiert und verfügte über eine Aminosäuresequenz (myc-tag) die eine Anbindung von Antikörpern ermöglichte.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die Herstellung und die Anwendung von NTA-Mikroarrays für Dissoziationsmessungen vorgestellt. Nachfolgend werden die Ergebnisse aus den molekulardynamischen Untersuchungen zu den Oligohistidin-Nickel-NTA-Chelatkomplexen, die Entwicklung und der Einsatz der Oberflächenimmobilisierungsmethode über die native chemische Ligation sowie die Ergebnisse aus den Arbeiten zur Funktionalisierung einzelner Cantilever mit Hilfe eines Nanopipettier-Roboters dargestellt.

4.1 NTA-Mikroarrays für die Untersuchung der Anbindung von Oligohistidinen

Die chemoselektive und konformationell orientierte Immobilisierung von Proteinen und Peptiden auf Oberflächen stellt für viele bioanalytische und biotechnologische Anwendungen eine Notwendigkeit dar. Während der Anfertigung der folgenden Arbeiten wurden von Kooperationspartnern bei Bindungs- und Stabilitätsuntersuchungen auf Oberflächen, die mit multivalenten NTA-Chelatoren belegt waren, mit verschiedenen histidinmarkierten Proteinen gezeigt, dass eine Mehrfachanbindung der Oligohistidine an die Ni^{2+} -NTA-Gruppen erfolgt.^[133] Die Stärke der Mehrfachanbindung war dabei abhängig von der Dichte der Ni^{2+} -NTA-Moleküle auf der Oberfläche. Die Anbindung von His_6 -markierten Proteinen an traditionelle Ni^{2+} -Mono-NTA-Oberflächen und an neu entwickelte Ni^{2+} -Bis-NTA-Oberflächen wurde dabei als wenig stabil beschrieben. Durch Dissoziationsexperimente mit Imidazol auf Ni^{2+} - Mono-, Bis- und Tris-NTA belegten Oberflächen mit His_6 - und His_{10} -markierten Proteinen konnten diese durch Zugabe entsprechender Imidazolkonzentrationen gut durch ihre verschiedenen EC_{50} -Werte unterschieden werden. Durch die Möglichkeit mehr multivalente Bindungen auszubilden zeigen His_{10} -markierte Proteine eine stärkere Bindung als His_6 -markierte Proteine. Mono-NTA-Oligohistidinkomplexe zeigten eine geringe Stabilität. Die aus diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse wurden ebenfalls durch ITC- und SEC-Messungen in Lösung bestätigt und durch die zusätzliche Verwendung von Tetrakis-NTA erweitert. Dabei zeigte sich auch, dass die gebildeten Oligohistidin- Ni^{2+} -NTA-Komplexe durch einen Austausch von Histidinen an den Ni^{2+} -NTA-Bindungsstellen nicht besonders gut strukturell definiert

sind. Dies gilt insbesondere für Komplexe die eine Redundanz aufweisen. Dies sind jene Komplexe die freie Koordinationsstellen besitzen, unabhängig davon, ob Histidine oder NTA-Moleküle überzählig sind. Der einzige Komplex bei dem dies (theoretisch) nicht auftritt ist der Komplex His₆-Ni-Tris-NTA. So gilt für His₆-NTA-Komplexe dass deren Stabilität von Mono- zu Tris-NTA zunimmt. Die Stabilität mit Tetrakis-NTA war erstaunlicherweise für His₆ nur etwa so stabil wie die mit Bis-NTA.^[133,137]

Verschiedene NTA-Moleküle (Abb. 3.6) sollten parallel in unterschiedlichen Oberflächendichten auf mikroskopierbaren Trägern immobilisiert werden. Die von Jacob Piehler (Inst. f. Biochemie, Universität Frankfurt) erhaltenen NTA-Moleküle waren mit MALDI-MS, ESI-MS (für Mono-NTA) und analytischer HPLC charakterisiert worden. Alle Derivate waren bis auf Tetrakis-NTA von hoher Reinheit (>90%). Tetrakis-NTA wurde durch präparative HPLC von Verunreinigungen und von Bis-NTA gereinigt und besaß nach MALDI-MS, HPLC ausreichende Reinheit (>80%). Alle NTA-Moleküle waren in wässrigen Puffern gut löslich und konnten nach dem Lösen der Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem rückstandsfrei verdampfenden Puffer Ammoniumacetat auf die Oberfläche pipettiert werden. Der Konzentrationsbereich der verwendeten Pipettierlösungen war 1 µM bis 500 µM. Die Konzentrationen der Mono-NTA-Lösungen lagen jeweils um den Faktor 2,5 über denen der anderen Chelatoren, da die Anbindung von Oligohistidinen an Mono-NTA wesentlich schwächer ist als bei den anderen NTA-Molekülen.

Als Oligohistidine zur Anbindung an die NTA-Chelatoren wurden Dekahistidin und Hexahistidin synthetisiert und am N-Terminus fluoreszent markiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluoreszein, Tetramethylrhodamin und der Cy5-ähnliche Farbstoff S0387 eingesetzt. Es zeigte sich jedoch schnell, dass Tetramethylrhodamin weniger geeignet ist, da es die Fluoreszenz von Fluoreszein wesentlich mehr durch Quenching und Energietransfer beeinflusst als dies für S0387 der Fall ist (Abbildung 4.1). Als fluoreszente Histidine wurden daher Dekahistidin mit Fluoreszein und Hexahistidin mit S0387 markiert, um so eine gleichzeitige Detektion mit möglichst wenig Crosstalk, Energietransfer oder Quenching zu erreichen. An dem Vergleich in Abbildung 4.1 ist neben dem starken Energietransfer von Fluoreszein zu Tamra ebenfalls zu sehen, dass die zu erwartende dichtere Belegung der Tris-NTA-Spots mit Hexahistidin (S0387- oder Tamra-markiert)^[133,137] (siehe Abschnitt 3.4) auch zu einem höheren Energietransfer und damit zu einer geringeren Fluoreszein-Anfangsintensität auf diesen Spots führt. Dabei tritt der Effekt erwartungsgemäß bei Inkubationen mit Tamra stärker auf als mit S0387.

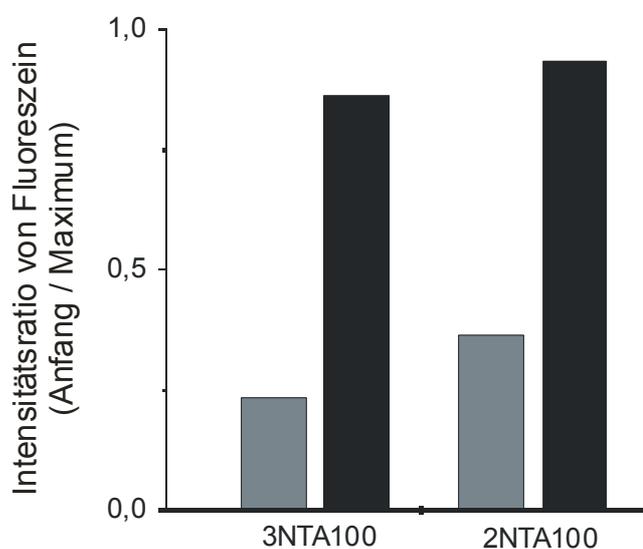


Abbildung 4.1: Einfluss von Tetramethylrhodamin (grau) und S0387 (schwarz) auf die Helligkeit von Fluoreszein auf den Spots von Tris-NTA (100 μM) und Bis-NTA (100 μM) bei gleichzeitiger Titration von Tamra-Ahx-His₆-OH oder S0387-Ahx-His₆-OH und Fluo-Ahx-His₁₀-OH mit Imidazol. Das angegebene Verhältnis gibt die Helligkeit der Fluoreszeinspots zu Beginn der Titration und zum Helligkeitsmaximum wieder. Da das Tamra markierte und das S0387 markierte Hexahistidin vor Fluo-Dekahistidin von Imidazol verdrängt wurden, ist am Anfang der Titration ein Energietransfer zu sehen, der bei Tamra deutlich höher ausfällt als bei S0387. Die Daten stammen aus der Titration des Arrays aus Abb. 4.3 und der Arrays aus Abb. 4.6.

Zur Immobilisierung wurden mehrere Oberflächen ausgetestet. Zuerst wurden in Analogie zu Lata *et al.*^[133] selbst hergestellte Epoxyoberflächen verwendet. Es wurde dabei kein Diaminopolyethylenglykol als Abstandshalter zwischen Oberfläche und NTA-Molekül verwendet, da die NTA-Moleküle selbst über eine Aminogruppe verfügen und eine Immobilisierung nicht auf klassisch organisch chemischem Weg, wie sie von Lata *et al.*^[133] durchgeführt wurde, erfolgen konnte. Diese Methode war nicht kompatibel zur Verwendung eines Nanopipettier-Roboters. Es wurde erwartet, dass Epoxyoberflächen eine ausreichende Reaktivität gegenüber Aminoverbindungen und auch gegenüber Thiolen zeigen sollten. Die Reaktivität gegenüber beiden Gruppen sollte dabei vom pH-Wert abhängen. Im leicht sauren Bereich sollten Amine protoniert vorliegen und eine Bevorzugung von Thiolen gegeben sein. Im leicht alkalischen Bereich ist das Vorliegen

von deprotonierten Aminen zu erwarten und die Reaktivität der Epoxygruppen für Reaktionen mit den Aminen sollte ausreichend sein.^[19,103,113,116,117,174,175] Kreuzversuche mit Peptiden bei unterschiedlichem pH und verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen zeigten jedoch einen eher geringen Einfluss des pH.^[176] Dennoch wurden die NTA-Moleküle in einem basischen Phosphatpuffer (pH = 8,0) gelöst und diese Lösungen nach entsprechender Verdünnung pipettiert. Für die Anbindung an die Epoxygruppen wird angenommen, dass zunächst als wichtiger Schritt eine Adsorption an die Oberfläche erfolgen muss. Bei ausreichender Nähe der Reaktionspartner sollte dann eine Reaktion erfolgen.^[103] In Abbildung 4.2 ist ein Array der verschiedenen NTA-Moleküle auf einer Epoxyoberfläche gezeigt. Die einzelnen Spots haben sich nach dem Auftropfen stark zusammengezogen, zeigen jedoch ein regelmäßiges Muster. Bei Auftropfen von Konzentrationsreihen konnten Unterschiede in der Helligkeit der Spots festgestellt werden (Abbildung 4.3 und 4.4), jedoch zeigten die Spots durch das Zusammenziehen (Ringbildung) und ihre Inhomogenität ein breites Spektrum an Intensitäten innerhalb eines Spots und einer Konzentration.

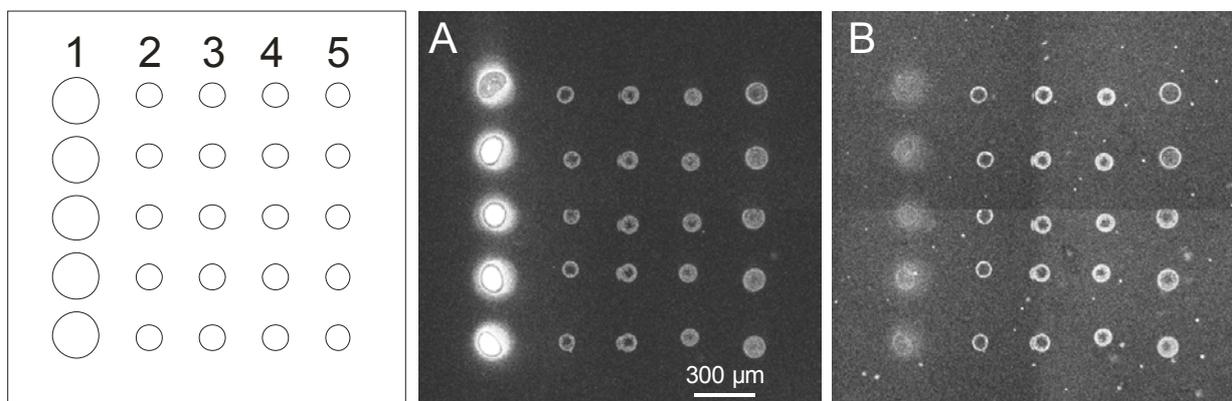


Abbildung 4.2: Nichtkonfokale Mikroskopieaufnahme eines Arrays mit fluoreszentem Kontrollpeptid RA80Cys (1), Mono-NTA (2), Bis-NTA (3), Tris-NTA (4) und Tetrakis-NTA (5) auf einer Epoxyoberfläche nach Inkubation mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH und Tamra-Ahx-His₆-OH (jeweils 20 nM). Die Pipettierlösungen hatten eine Konzentration von 100 µM, die Konzentrationen der Mono-NTA-Lösungen jeweils das 2,5-Fache. (A) zeigt den Fluoreszeinkanal, (B) den Tamra-Kanal.

Auch die Kontrollspots zeigten Inhomogenitäten. Ein Vergleich verschiedener Herstellungsmethoden der Epoxyoberflächen, der im Zusammenhang mit der nativen chemischen Ligation durchgeführt wurde, zeigte keine signifikanten Unterschiede bei den Spotqualitäten. Daraus wurde geschlossen, dass der Einfluss der gewählten Herstellungsmethode der Oberfläche nicht die Ursache für die Inhomogenitäten darstellte. Dies bestätigte sich bei einem entsprechenden Vergleich verschiedener Herstellungsmethoden zur Verwendung für NTA-Arrays. Für mehrere Chargen der Oberfläche wurden gleichermaßen inhomogene Spots erhalten. Das Eintrocknen der Pipettierlösungen auf den Oberflächen führte manchmal zu unregelmäßigen und manchmal zu regelmäßigeren Arraymustern (Abbildung 4.1 und 4.2). Ein Vergleich mit Peptidarrays, die erfolgreich für andere Bindungsmessungen hergestellt wurden,^[116,117] und Peptidarrays auf kommerziell erhältlichen Epoxyoberflächen, die auch für Proteinanbindungsversuche hergestellt wurden,^[20] zeigten bei genauerer Betrachtung auch dort diese Effekte, wenn auch nicht immer so ausgeprägt und abhängig vom verwendeten Peptid.

Proteine und etwas größere Peptide verfügen über eine Vielzahl von funktionellen geladenen Gruppen, die bei der Anbindung durch Begünstigung der Adsorption von Vorteil sind. Dies scheint bei kleinen und mittleren Peptiden nicht immer und bei den kleinen NTA-Molekülen überhaupt nicht der Fall zu sein. Es wurden zwar mit diesen inhomogenen Arrays einzelne Dissoziationsmessungen durchgeführt, jedoch stellte eine

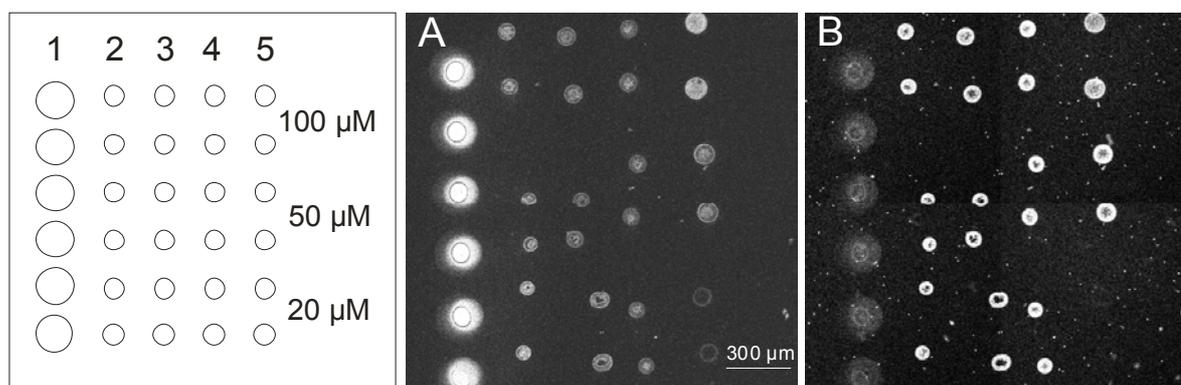


Abbildung 4.3: Mikroskopieaufnahmen eines Arrays mit verschiedenen Konzentrationen der gleichen NTA-Moleküle und Kontrollen wie bei Abb. 4.2 nach Inkubation mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH und Tamra-Ahx-His₆-OH. Der Array wurde für eine Dissoziationsmessung verwendet (in dieser Arbeit aber nicht weiter ausgeführt). Die Bilder zeigen den Fluoreszenzkanal (A) und den Tamra-Kanal (B) des Arrays vor Zugabe von Imidazol. Die Epoxyoberfläche wurde hier nach Kusnezow *et al.* hergestellt.

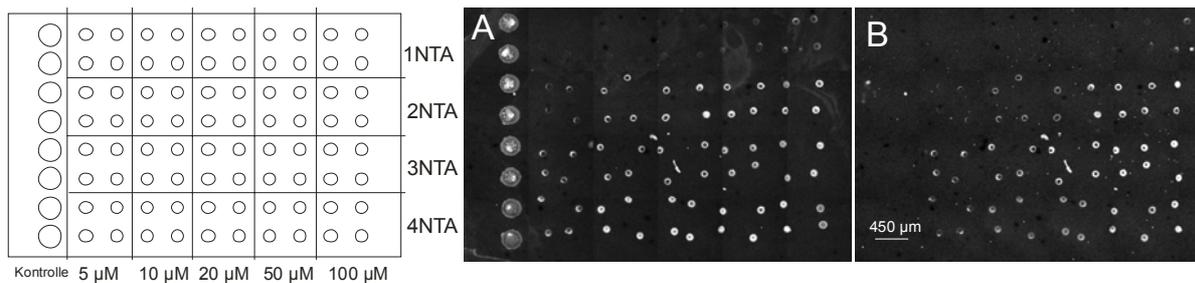


Abbildung 4.4: Aufnahmen eines Arrays mit vielen verschiedenen Konzentrationen nach Inkubation mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH (Fluoreszeinkanal (A)) und S0387-Ahx-His₆-OH (Cy5-Kanal (B)). Mono-NTA ist hier kaum zu sehen, obwohl die Konzentrationen bei Mono-NTA 2,5-fach höher waren. Der Array wurde aufgrund des unregelmäßigen Musters und der kaum sichtbaren Mono-NTA-Spots nicht für Dissoziationsmessungen verwendet.

homogene Anbindung die zuerst zu lösende Aufgabe dar, bevor weitere Bindungs- bzw. Dissoziationsmessungen durchgeführt werden konnten.

Nach Mateo *et al.*^[102,103,177] führt eine Verbesserung der Adsorption auf der Oberfläche zu einer verbesserten Anbindung von Proteinen. Mateo erreichte dies durch eine Insertion von Aminogruppen unter die Epoxyfunktionalisierung (auf Beads). Für die kleinen NTA-Moleküle sollte eine verbesserte Adsorption durch Zusätze zum Pipettierpuffer erreicht werden. Hierzu wurde ein zusätzliches Lösungsmittel oder andere Zusätze zugegeben. Zudem wurden die Inkubationszeiten und die Waschprotokolle variiert. Lange Inkubationszeiten (Inkubationskammer mit hoher Luftfeuchtigkeit) mit verschiedenen Pufferzusätzen ergaben einen sehr hohen Hintergrund bei geringen Signalintensitäten, jedoch keine zusammengezogenen Spots (Abbildung 4.5 A). Dieser Effekt dürfte auf die Hydrolyse der Epoxyoberfläche durch die großen Mengen an Wasser zurückzuführen sein, so dass die Reaktion der Amine an die Oberfläche nicht mehr effektiv genug war. Bei kurzen Inkubationszeiten ergaben sich zusammengezogene Spots, bei sofortigem Waschen nach dem Auftropfen waren die Spots nicht zusammengezogen, der Hintergrund war wieder sehr hoch und die Kontrollspots waren verwaschen (Abbildung 4.5 B und C). Die Zugabe von organischem Lösungsmittel zum Pipettierpuffer auf Arrays wie in Abbildung 4.4, zeigte keine signifikante Verbesserung. Als letztes wurde der NTA-Pipettierlösung ein zusätzliches kurzes nicht fluoreszentes Peptid mit der Sequenz AALKLA zugegeben um zu sehen, ob ein zusätzliches Peptid die Anhaftung der Pipettierlösung an die Oberfläche verbessern und durch die Reaktivität mit der Oberfläche eine homogenere Verteilung bewirken könnte. In Abbildung 4.5 D ist zu sehen, dass die Spots nicht richtig

zusammengezogen sind. Auch ist ein in Helligkeitsgradient in Abhängigkeit von der Konzentration der Pipettierlösungen zu sehen, jedoch waren die Spots nach wie vor nicht homogen.

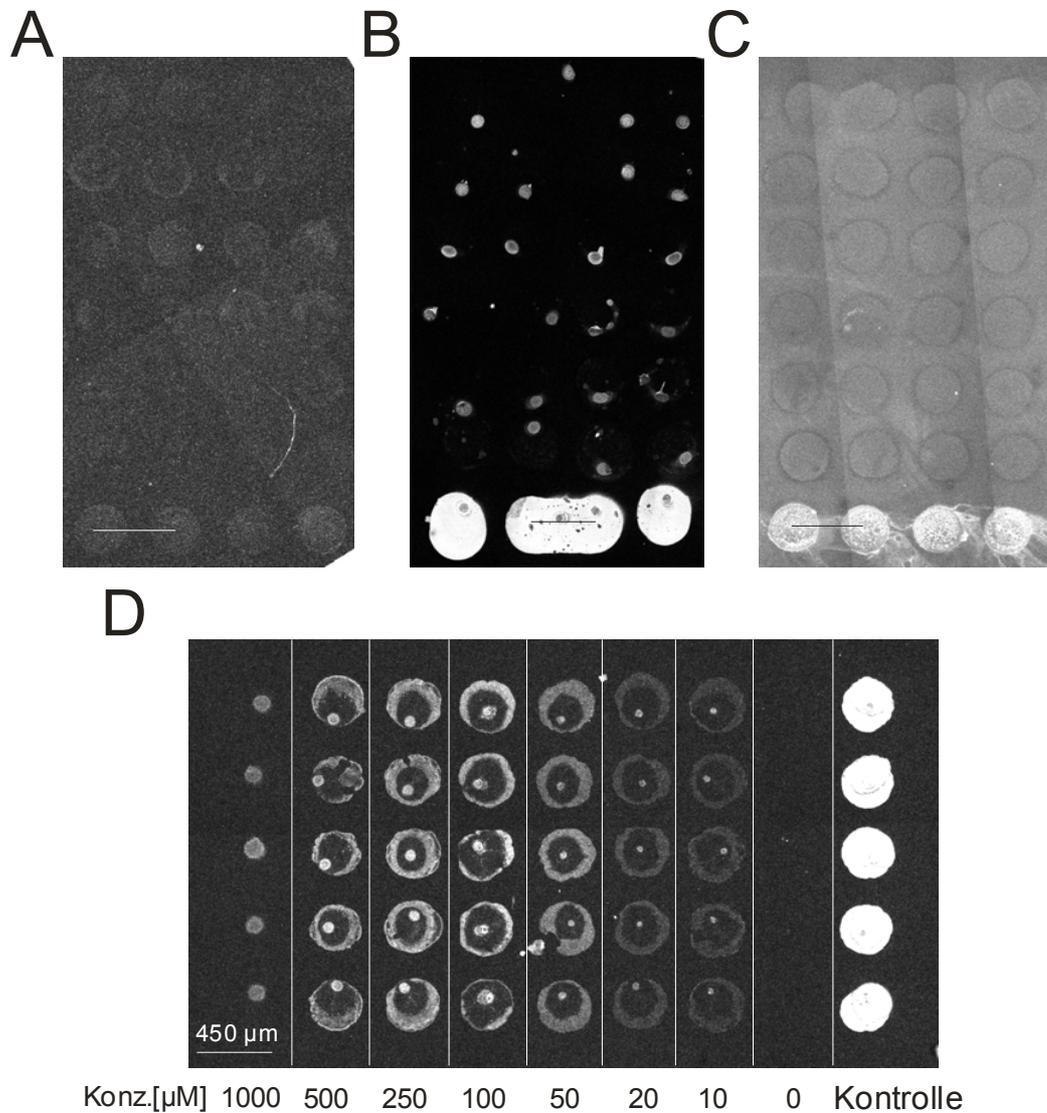


Abbildung 4.5: Verschiedene Versuche mit Pufferzusätzen wie Trehalose oder Aminoethanol zu 100 µM und 50 µM Bis-NTA-Pipettierlösungen (Phosphatpuffer, pH = 8,0). Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten und Waschschrte ausprobiert. 24 h Inkubationszeit mit Eintrocknen (A), 3 h Inkubationszeit mit Eintrocknen (B), 0 h, sofortiges Waschen mit Aminoethanol, Aceton und Wasser (C). (D) zeigt einen Array mit Tetrakis-NTA bei dem die Pipettierlösungen mit dem zusätzlichen Peptid AALKLA versetzt wurden. Dabei wurde die Gesamtkonzentration an Peptid + Tetrakis-NTA immer auf 1 mM gehalten. Angegeben ist die Konzentration an Tetrakis-NTA. Die Inkubationszeit betrug 1 h.

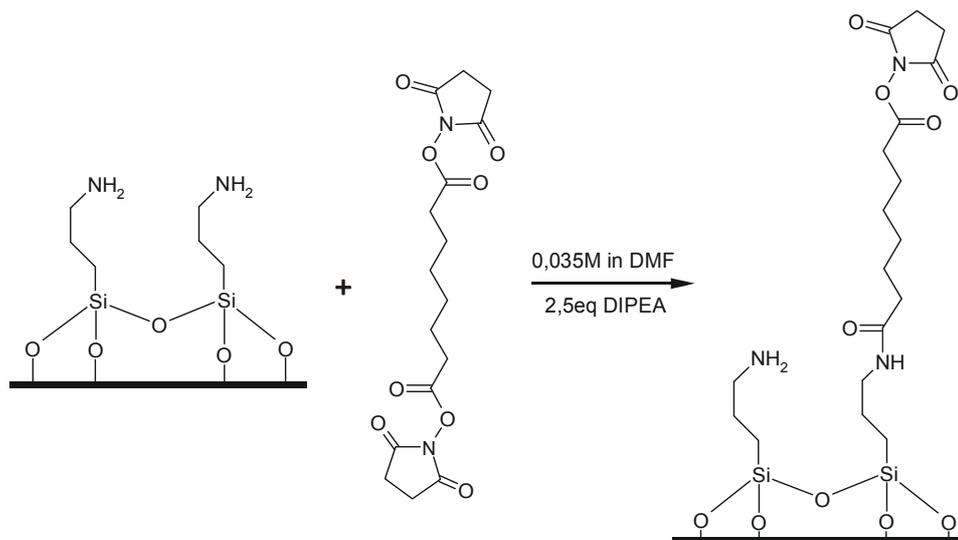


Abbildung 4.6: Funktionalisierung einer aminosilanisierten Oberfläche mit dem heterobifunktionellen Linker DSS zur Immobilisierung von Aminen auf der Oberfläche.

Da mit epoxyderivatisierten Oberflächen keine zufrieden stellenden Arrayergebnisse für die zur Verfügung stehenden NTA-Moleküle zu erhalten waren, wurde die Anbindungschemie an die Oberfläche geändert. Eine weitere aminreaktive Oberfläche stellt die bereits erwähnte als Succimidylester aktivierte Oberfläche dar (Abschnitt 3.3). Hierzu wurden aminderivatisierte Glasoberflächen, die analog zu MacBeath *et al.*^[16] hergestellt wurden, mit dem homobifunktionellen Linker DSS zu einer Aktivesteroberfläche derivatisiert. Diese Derivatisierung wurde für die Anwendung bei Protein- und Antikörpermikroarrays durch Angenendt *et al.*^[105] beschrieben und in dieser Arbeit analog dazu durchgeführt. Die Oberfläche ist bedingt durch den Aufbau auf eines hydrophilen "Polyamins" sehr klebrig. Die NTA-Moleküle ließen sich darauf ausreichend homogen immobilisieren. Die Klebrigkeit machte ein etwas aufwändigeres Waschprotokoll notwendig um möglichst viele der nicht kovalent gebundenen Moleküle abzuwaschen. Wurden NTA-Moleküle auf diesen Amin-funktionalisierten Oberflächen immobilisiert, so hafteten diese fest und ließen sich teilweise nicht mehr abwaschen (Abb. 4.7). Somit war eine Differenzierung zwischen Amin-funktionalisierter-Oberfläche und Succimidylester-Oberfläche auf Basis einer einfachen Positivkontrolle nicht möglich. Um die Oberflächenderivatisierung trotzdem zu überprüfen wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt, die geringe Unterschiede zeigten. Die Art der Anbindung an die Oberfläche

konnte nicht differenziert werden. Jedoch wurden die Arrays so umfangreich gewaschen, dass zumindest die angebundenen oder anhaftenden Moleküle stabil auf der Oberfläche verankert blieben. Der Hintergrund war im Falle von Amin-funktionalisierten Oberflächen meist höher, die Anbindungseffizienz geringer, und die Oberflächen sahen von Array zu Array recht verschieden aus. In Abbildung 4.7 sind Beispiele für solche Arrays gezeigt. Bei dem Array aus Abbildung 4.7 A und B war das vorher ausgeführte Waschprotokoll nicht ausreichend um weitere Auswaschung während der Inkubation zu vermeiden. Arrays aus Abbildung 4.7 C und D zeigten starken Hintergrund bei geringer Abstufung der NTA-

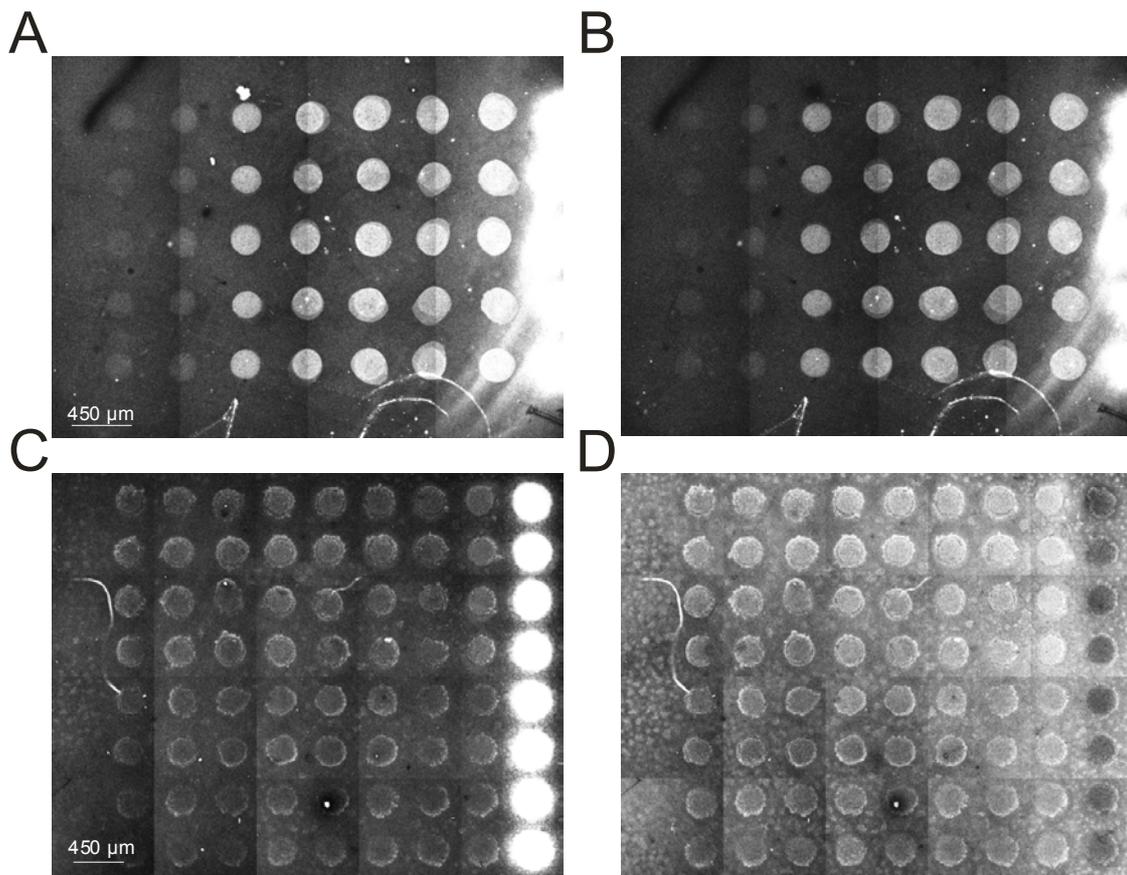


Abbildung 4.7: NTA-Arrays auf verschiedenen Chargen von Amin-funktionalisierten Oberflächen. (A) Array aus verschiedenen konzentrierten Tetrakis-NTA Pipettierlösungen und Kontrollpeptid (OM-P18), direkt nach der Inkubation mit 12 nM fluoreszentem Dekahistidin. Das Kontrollpeptid ist stark verschmiert. (B) Array von (A) nach 1,5 h unter Puffer. Die Intensität aller Spots und des Hintergrunds nimmt noch ab (gleiche Aufnahmeparameter, gleiche Bildprozessierung). (C) Array aus verschiedenen Konzentrationen von Tetrakis-, Tris-, Bis- und Mono-NTA im Fluoreszeinkanal nach Inkubation mit einem Gemisch aus 12 nM Fluo-Ahx-His₁₀-OH und 12 nM S0387-Ahx-His₆-OH. (D) Array aus (C) im Cy5-Kanal.

Dichten auf der Oberfläche bei insgesamt geringen Signalintensitäten (die Parameter wurden so eingestellt, dass die NTA-Spots gut zu sehen und die Kontrollspots stark überstrahlt sind).

Da der Nachweis der kovalenten Anbindung der NTA-Moleküle an die Oberfläche nicht auf klassisch analytischem Wege möglich war, sollte sichergestellt werden, dass die Anbindung der Histidine an die NTA-Spots spezifisch ist. Dazu wurden 2 Experimente gemacht:

1. Der Array wurde nach dem Waschen mit EDTA nicht mit NiCl_2 -haltigem Puffer inkubiert, sondern unter Zugabe von 1 mM EDTA zusammen mit den Oligohistidinen inkubiert (Abbildung 4.8). Die Zugabe von EDTA war notwendig, da selbst in doppelt destilliertem Wasser geringe Mengen an Metallionen vorhanden sind. Ansonsten ist, trotz der Abwesenheit größerer Mengen an Nickelionen, eine Anbindung an die Oberfläche zu beobachten.
2. Der Array wurde in 10 mM EDTA bei Anwesenheit der Nickelionen mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH inkubiert was zu keiner Anbindung der Oligohistidine an die Oberfläche führte.

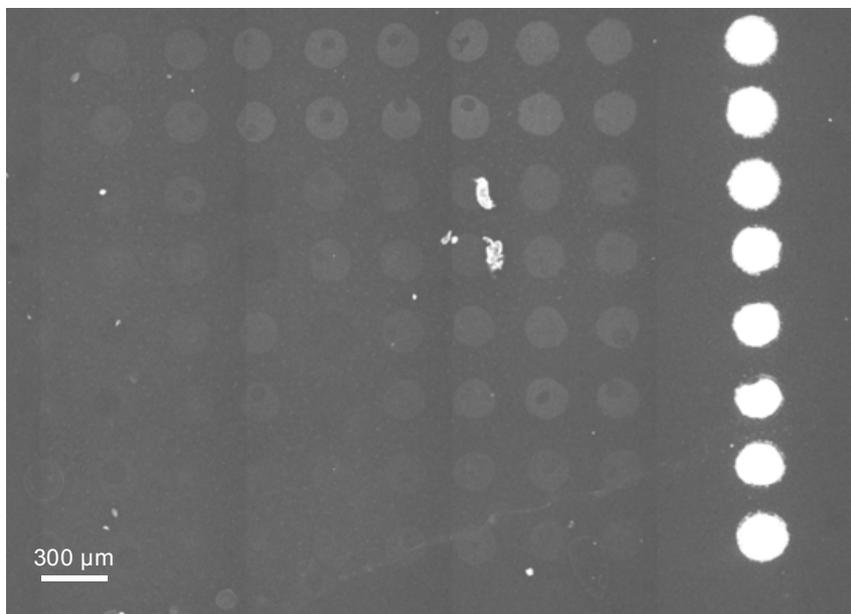


Abbildung 4.8: Spezifitätskontrolle eines Arrays mit verschiedenen NTA-Molekülen nach Inkubation mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH in Gegenwart von 1mM EDTA. Bei starker Aufhellung des Bildes lässt sich eine schwache unspezifische Anbindung an die NTA-Spots erkennen.

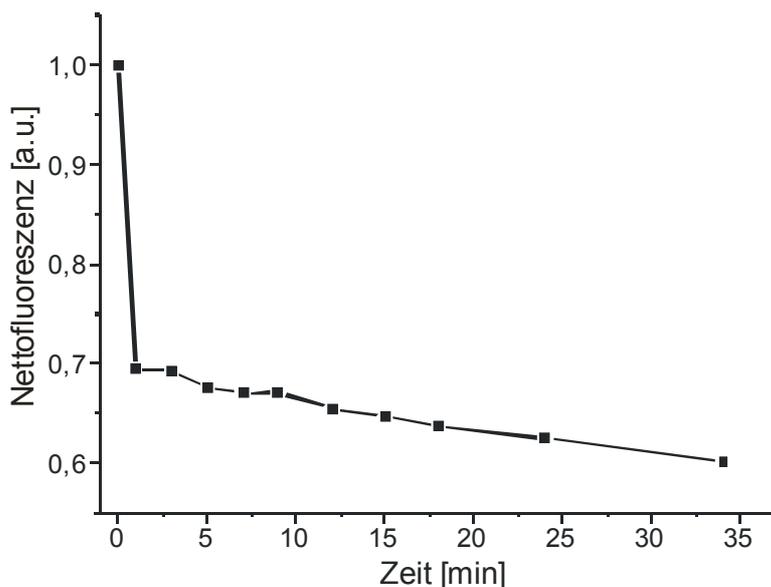


Abbildung 4.9: Normalisiertes Fluoreszenzsignal auf Tetrakis-NTA-Spots (aus 100 μM Lösung) nach Inkubation mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH und Zugabe von 50 μl einer 0,5 M Imidazolösung zu verschiedenen Zeitpunkten. Nach etwa 3 Minuten hatte sich das meiste Oligohistidin von der Oberfläche gelöst.

Um für die Titration, die in einer Art Stop-Flow-Arbeitsmethode durchgeführt werden sollte, die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts zu ermitteln, wurde der Oligohistidinlösung über einem Array eine etwas größere Menge Imidazol zugegeben. Der Array wurde dann über eine längere Zeit vermessen, während die Lösung über dem Array permanent durchmischt wurde. Es zeigte sich, dass sich bereits nach kurzer Zeit ein Gleichgewicht zwischen Dissoziation und Assoziation eingestellt hatte (Abbildung 4.9). Somit wurde für die Titration ein Messprotokoll festgelegt, das vom Beginn einer Zugabe von Imidazol und Messung bis zum Beginn der darauf folgenden Zugabe und Messung fünf Minuten vorsah. Die Zugabemenge an Imidazol wurde dabei schrittweise erhöht.

4.2 Dissoziationsmessungen auf NTA-Arrays über konfokale Mikroskopie

4.2.1 Parallele Dissoziationsmessung zweier Oligohistidine auf NTA-Arrays

Nachdem die Erstellung von NTA-Arrays im Rahmen der benutzten Array-Technologie reproduzierbar gelungen war, wurden Dissoziationsmessungen mit diesen Arrays mit Hilfe konfokaler Laserscanning Mikroskopie durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden ob das parallele Auslesen unterschiedlich dicht beladener NTA-Spots mit verschiedenen NTA-Molekülen möglich ist, und wie sich der Unterschied zwischen den NTA-Molekülen und zwischen den unterschiedlich dicht beladenen Spots einer NTA-Sorte für verschiedene Ligandenpeptide darstellt.

Hierzu wurden zunächst Arrays erstellt, bei denen jeder Spot ausreichend weit getrennt von seinen benachbarten Spots war, und verschiedene Konzentrationen einer NTA-Sorte pipettiert. Jeder Spot wurde als Duplett erstellt. Für jede Messung wurde der Mittelwert aus den Intensitäten der beiden Spots gebildet. Zu niedrig konzentrierte Lösungen ergaben Spots, die so dunkel waren, dass sie nicht sinnvoll detektiert werden konnten. Die Abweichung von Aufnahme zu Aufnahme wurde dabei sehr groß. So wurden nur zu Beginn einer Dissoziationsmessung ausreichend helle Spots vermessen. Die Parameter des Mikroskops wurden daher so eingestellt, dass die Kontrollspots zwar überstrahlt waren, jedoch für die Messspots ein möglichst großer dynamischer Bereich erzielt wurde.

In Abbildung 4.11 sind die Mikroskopieaufnahmen einer kompletten Dissoziationsmessung im Fluoreszeinkanal und im Cy5-Kanal zu sehen. Das Arraylayout ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Die Messsequenz zeigt den Array vor dem Beginn der Zugabe von Imidazol bis zum Erreichen einer Imidazolkonzentration von gut 185 mM. Gut zu sehen ist im Cy5-Kanal, dass das S0387-Ala₂-His₆-OH besser an Tris-NTA gebunden hat als an alle anderen Spots. Fluo-Ahx-His₁₀-OH hatte dagegen am besten an Tetrakis-NTA-Spots mit mittlerer und hoher Dichte auf der Oberfläche angebinden.

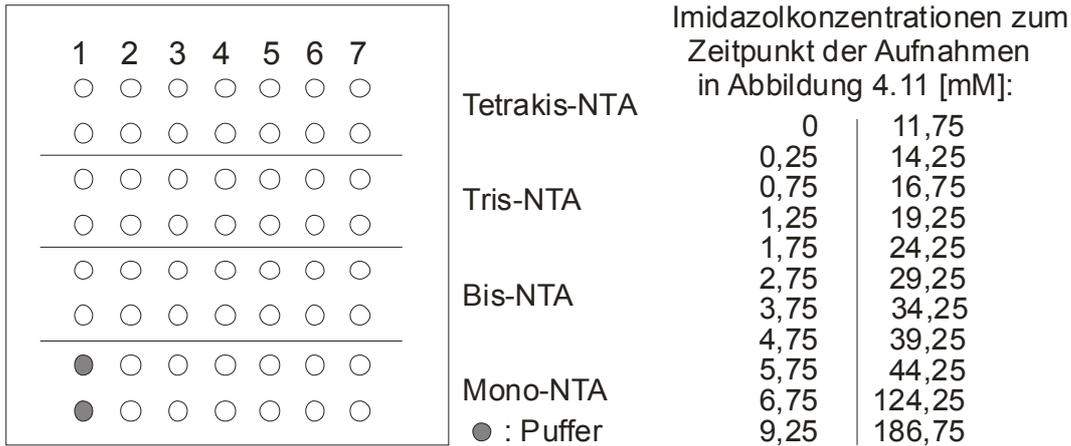


Abbildung 4.10: Arraylayout der in Abbildung 4.11 gezeigten Arrays. Die pipettierten NTA-Lösungen waren aufsteigend von 1-7 wie folgt konzentriert [μM]: 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 500. Die Konzentrationen der Mono-NTA-Lösungen waren jeweils um das 2,5-fache höher. Der Abstand zwischen 2 NTA-Spots betrug $400 \mu\text{m}$.

Weshalb die Spots, die aus einer Konzentration von 10 bis 50 mikromolarer Pipettierlösungen stammen, das stärkste Signal ergaben, konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden. Entweder kann dies bedingt durch Selbstquenching bei zu hohen Konzentrationen der Histidine auf den Spots aus konzentrierteren Pipettierlösungen auftreten, oder sterische Gründe sind die Ursache für eine nicht so gute Anbindung der Histidine an die NTA-Spots mit höherer Dichte. Auch Nickel-Ionen können ein Quenching von vielen Fluoreszenzfarbstoffen bewirken. Die etwas dunkleren Spots mit höherer Dichte zeigten während der Dissoziation die Eigenschaften, die höheren Dichten auf der Oberfläche zugesprochen werden können, nämlich eine etwas spätere Ablösung der Oligohistidine von der Oberfläche als die etwas helleren mit niedrigeren NTA-Dichten. Sie erreichten deren helle Anfangsintensität jedoch nie, was gegen ein Selbstquenching und gegen eine sterische Hinderung der Oligohistidine spricht. Es handelt sich also vermutlich um ein Quenching durch die bei höheren NTA-Dichten zusätzlichen Nickelionen.

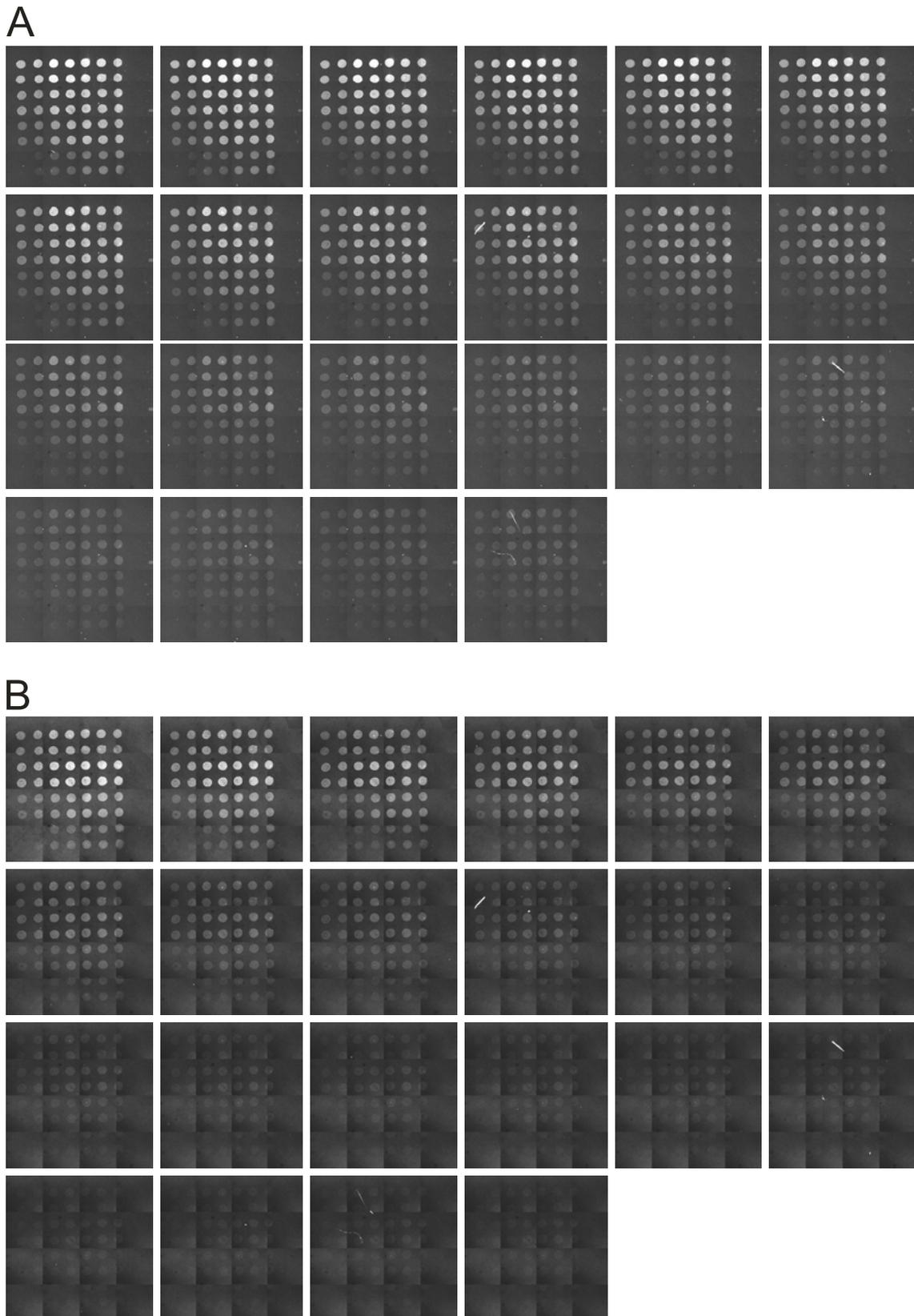


Abbildung 4.11: Komplette Sequenz einer Dissoziationsmessung im Fluoreszein- (A) und Cy5-Kanal (B). Aufnahme alle 5 min mit nachfolgender Erhöhung der Konzentration. Arraylayout und Konzentrationsangaben sind Abbildung 4.10 angegeben.

Ebenfalls zu erkennen ist die erwartete deutlich schnellere Intensitätsabnahme auf den Spots im Cy5-Kanal (entspricht Hexahistidin) im Vergleich zur Abnahme im Fluoreszeinkanal (entspricht Dekahistidin).

Die Signale der fluoreszenten Oligohistidine auf den einzelnen Spots entstanden durch spezifische Anbindung an die Oberflächen. Die daraus erhaltenen Intensitäten wurden um den Hintergrund sowie den unspezifischen Anteil korrigiert und normalisiert. Die so ermittelten Werte für die Nettofluoreszenz wurden gegen die Imidazolkonzentration aufgetragen.

In Abbildung 4.12 sind die auf diese Werte nach Gleichung 3.14 angepassten Kurvenscharen sowie die Messwerte selbst abgebildet. Als charakteristischer Wert für die Dissoziation wurde R_{fest} bei 50% (als EC_{50}) für die Dissoziationskurven bestimmt (Tabelle 4.1). Diese Konzentration stellt eine charakteristische Größe für eine spezifische Interaktion dar. Je stabiler die Wechselwirkung ist, desto höher muss die Konzentration des Kompetitors sein um sie zu lösen. In diesem Fall war Imidazol der Kompetitor. An den (normalisierten) Dissoziationskurven fällt zunächst auf, dass für jedes der vier verschiedenen NTAs gilt, dass sich die Kurven für die unterschiedlichen NTA-Belegungen auf den Oberflächen für Dekahistidin gut sichtbar unterscheiden, für Hexahistidin jedoch nur sehr gering. Niedriger belegte NTA-Oberflächen zeigen für Dekahistidin bei kleinerem EC_{50} -Wert einen etwas flacheren Kurvenverlauf als höher belegte. Auch Dissoziationskurven für die hellsten Spots zeigen durchweg einen etwas flacheren Verlauf, als die etwas dichteren und dunkleren (Abbildung 4.13).

Als Maß für die Steilheit der Kurven dient nach Gleichung 3.14 der Exponent P . Die nach Gleichung 3.14 auf die Messwerte angefitzten Kurven wurden auf einen Startwert von eins gesetzt auch wenn die Messwerte des fluoreszeinmarkierten Dekahistidins, aufgrund von Energietransfer an das S0387-markierte Hexahistidin, einen niedrigeren Anfangswert ergaben und erst nach Ablösen einer gewissen Menge des Hexahistidins einem Maximum zustrebten. Dies ist auch an den Messwerten in Abbildung 4.12 zu beobachten.

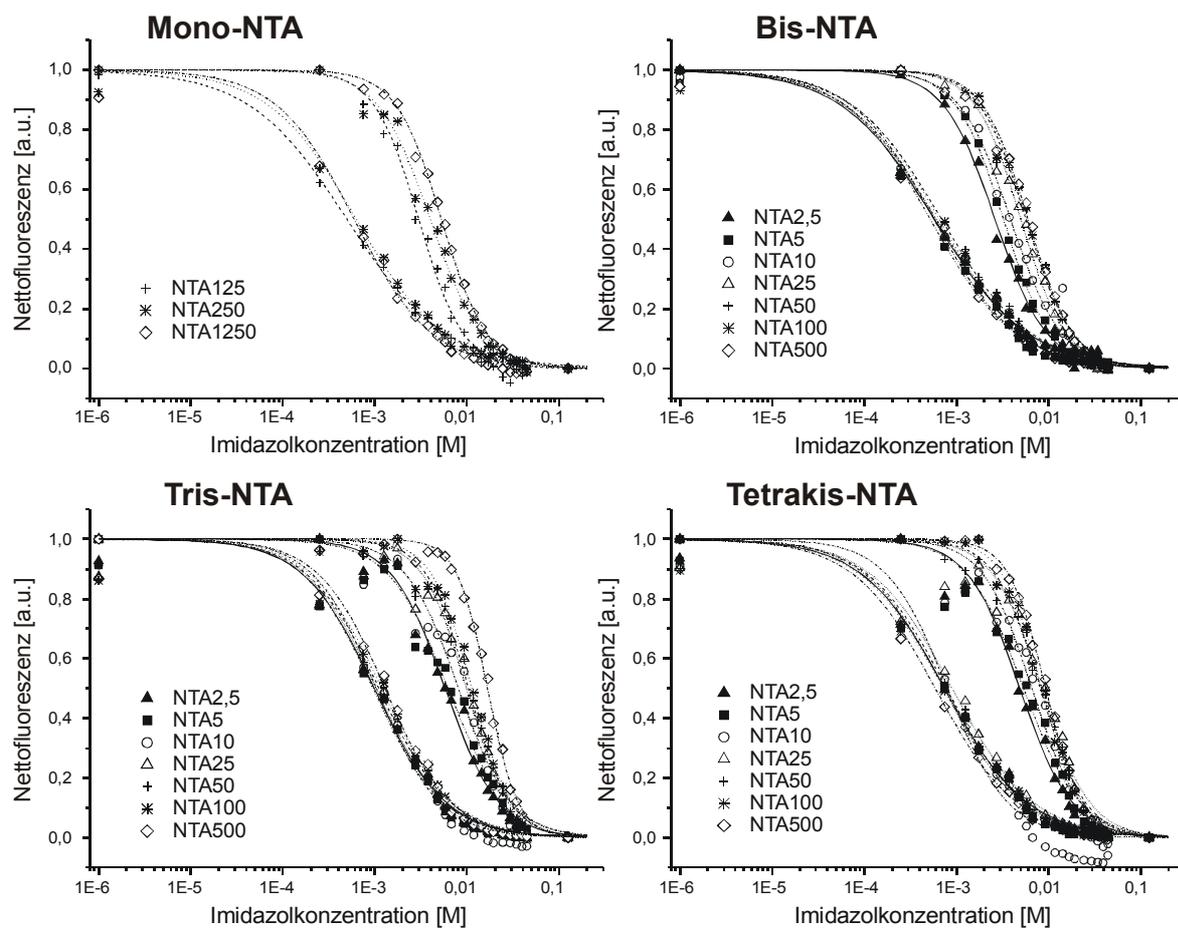


Abbildung 4.12: Übersicht über die normalisierten und korrigierten Messwerte und darauf angepasste Dissoziationskurven für die vier verschiedenen NTA-Moleküle. Die steileren Kurven stammen von Dekahistidin, die flacheren von Hexahistidin. Angegeben sind ebenfalls die Konzentrationen der verwendeten jeweiligen NTA-Lösungen in μM .

Im Falle sehr niedriger Konzentrationen der NTA-Pipettierlösungen war die Signalintensität bereits von Anfang an stets ziemlich gering und die Schwankungen der Signale fielen groß aus. Dies gilt insbesondere für die Signale, die auf Mono-NTA-Spots erhalten wurden, da hier die Anbindung der Histidine mangels einer Mehrfachanbindungsmöglichkeit an die Oberfläche^[133] besonders schlecht und instabil war. Dementsprechend fallen auch die Schwankungen bei EC_{50} und P bei niedrigen Dichten aller NTAs höher aus (Tabelle 4.1). Die EC_{50} -Werte und die P -Werte sind für diese Fälle auch sehr klein, was die Vermutung unterstützt, dass die Histidine bei dieser Oberflächendichte (und speziell auf Mono-NTA) nicht sehr stabil auf der Oberfläche verankert waren und auch kaum Rückbindung stattfand. Ganz besonders die P -Werte von Hexahistidin bleiben für Mono-, Bis- und auch von Tetrakis-NTA so gering (< 1), dass eine stabile Immobilisierung auf der Oberfläche bei diesen niedrigen Dichten fraglich ist.

Dies steht in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Lata und Piehler.^[133,137] Auch die EC₅₀-Werte waren für Hexahistidin auf diesen NTA Spots unter Berücksichtigung der schwachen Signalintensität und der sich daraus ergebenden größeren Schwankungen nahezu gleich bleibend. Für Dekahistidin ergab sich dagegen eine Steigerung der EC₅₀-Werte auf den Mono-NTA-Spots in Abhängigkeit von der Dichte.

Insgesamt waren die Werte, die von den mikroarray-basierten Messungen abgeleitet wurden, deutlich kleiner als bei Dissoziationsmessungen von Oligohistidinen auf großen Oberflächen.^[133] Jedoch entstanden die Messwerte unter völlig anderen Messbedingungen. Die in dieser Arbeit gezeigten Messungen wurden mit einer Stop-Flow-Methode durchgeführt, wobei die Konzentration an Oligohistidinen auch nach dem Beladen immer konstant blieb (abzüglich der angebondenen Moleküle).

Die Messungen wurden auch in permanenter Konkurrenz durchgeführt, wobei Dekahistidin und Hexahistidin gleichzeitig vorhanden waren und vermessen wurden. Bisher veröffentlichte Messungen wurden kontinuierlich im Fluss unter Veränderung der Oligohistidinkonzentration und unter steter Erhöhung der Imidazolkonzentration gemessen. Dabei war, außer bei spezifischen Konkurrenzversuchen ohne Imidazolzugabe, immer nur ein Oligohistidin auf der Oberfläche vorhanden. Zudem kann vermutet werden, dass die hier gewählte NTA-Immobilisierungsmethode eine geringere Oberflächendichte erzeugt als dies bei Immobilisierung der NTA-Moleküle durch klassische organische Chemie auf den Glaträgern der Fall ist.

Mikroarrayexperimente zeigen für gewöhnlich eine größere Streuung der Ergebnisse, insbesondere dann, wenn es nicht nur um eine Binder-Nichtbinder-Antwort geht und die Versuche manuell durchgeführt werden. Ein weiterer wichtiger Grund für die Streuung der Ergebnisse liegt in der Reproduzierbarkeit der Oberflächenchemie. Unterschiedliche Bedingungen (z.B. Luftfeuchtigkeit und Temperatur im Sommer/Winter) können zu unterschiedlichen Reaktionseffizienzen auf den Glasoberflächen führen wenn nicht in klimatisierten Reinräumen gearbeitet wird. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine systematischen Untersuchungen durchgeführt. Die Unterschiedlichkeit der Oberflächen und die Differenzen, die durch manuelles Arbeiten entstehen, werden deutlich, wenn die Standardabweichungen betrachtet werden (Abbildung 4.13). Hierbei ist der Fehler erwartungsgemäß bei niedrigen Signalintensitäten am größten (Abbildung 4.13 C).

Tabelle 4.1: Vergleich von EC_{50} und P-Werten (nach Gl.3.14). Die angegebenen Fehler setzen sich aus den Fehlern der Messwerte und den Fehlern der Ausgleichsrechnung zusammen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Pipettierlösungen.

	Mono-NTA 12,5 μ M	Mono-NTA 25 μ M	Mono-NTA 62,5 μ M	Mono-NTA 125 μ M	Mono-NTA 250 μ M
EC_{50} [mM](His ₆)	0,78 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,63 ± 0,02
P (His ₆)	0,87 ± 0,04	0,75 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,82 ± 0,02	0,92 ± 0,02
EC_{50} [mM](His ₁₀)	0,94 ± 0,24	1,72 ± 0,22	1,84 ± 0,34	2,97 ± 0,10	3,97 ± 0,15
P (His ₁₀)	1,42 ± 0,45	2,06 ± 0,46	2,57 ± 1,07	1,80 ± 0,10	1,53 ± 0,08
	Mono-NTA 1250 μ M	Bis-NTA 2,5 μ M	Bis-NTA 5 μ M	Bis-NTA 10 μ M	Bis-NTA 25 μ M
EC_{50} [mM](His ₆)	0,59 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,59 ± 0,02
P (His ₆)	1,04 ± 0,04	0,86 ± 0,03	0,94 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,88 ± 0,02
EC_{50} [mM](His ₁₀)	5,25 ± 0,14	2,64 ± 0,08	3,25 ± 0,05	3,82 ± 0,09	5,02 ± 0,15
P (His ₁₀)	1,76 ± 0,07	1,55 ± 0,06	1,68 ± 0,04	1,67 ± 0,06	1,77 ± 0,09
	Bis-NTA 50 μ M	Bis-NTA 100 μ M	Bis-NTA 500 μ M	Tris-NTA 2,5 μ M	Tris-NTA 5 μ M
EC_{50} [mM](His ₆)	0,69 ± 0,04	0,65 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,98 ± 0,04	0,95 ± 0,02
P (His ₆)	0,90 ± 0,03	0,93 ± 0,03	0,97 ± 0,04	1,12 ± 0,04	1,15 ± 0,04
EC_{50} [mM](His ₁₀)	5,71 ± 0,19	5,80 ± 0,17	6,0 ± 0,17	5,76 ± 0,25	6,19 ± 0,34
P (His ₁₀)	1,72 ± 0,09	1,76 ± 0,09	1,77 ± 0,08	1,49 ± 0,09	1,34 ± 0,10
	Tris-NTA 10 μ M	Tris-NTA 25 μ M	Tris-NTA 50 μ M	Tris-NTA 100 μ M	Tris-NTA 500 μ M
EC_{50} [mM](His ₆)	1,03 ± 0,07	1,03 ± 0,05	1,1 ± 0,05	1,17 ± 0,05	1,28 ± 0,05
P (His ₆)	1,26 ± 0,09	1,14 ± 0,05	1,12 ± 0,04	1,13 ± 0,05	1,21 ± 0,05
EC_{50} [mM](His ₁₀)	8,05 ± 0,57	9,8 ± 0,51	10,3 ± 0,37	11,2 ± 0,44	16,5 ± 0,45
P (His ₁₀)	1,52 ± 0,15	1,82 ± 0,15	1,91 ± 0,12	2,00 ± 0,14	2,62 ± 0,17
	Tetrakis- NTA 2,5 μ M	Tetrakis- NTA 5 μ M	Tetrakis- NTA 10 μ M	Tetrakis- NTA 25 μ M	Tetrakis- NTA 50 μ M
EC_{50} [mM](His ₆)	0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,8 ± 0,10	0,9 ± 0,04	0,78 ± 0,04
P (His ₆)	0,97 ± 0,04	1,02 ± 0,04	1,33 ± 0,18	0,99 ± 0,04	1,02 ± 0,04
EC_{50} [mM](His ₁₀)	4,90 ± 0,23	5,39 ± 0,32	6,62 ± 0,46	8,41 ± 0,47	8,17 ± 0,31
P (His ₁₀)	1,54 ± 0,10	1,42 ± 0,11	1,65 ± 0,18	1,66 ± 0,14	1,78 ± 0,11
	Tetrakis- NTA 100 μ M	Tetrakis- NTA 500 μ M			
EC_{50} [mM](His ₆)	0,72 ± 0,04	0,59 ± 0,03			
P (His ₆)	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,03			
EC_{50} [mM](His ₁₀)	8,44 ± 0,24	9,35 ± 0,22			
P (His ₁₀)	2,05 ± 0,11	2,18 ± 0,10			

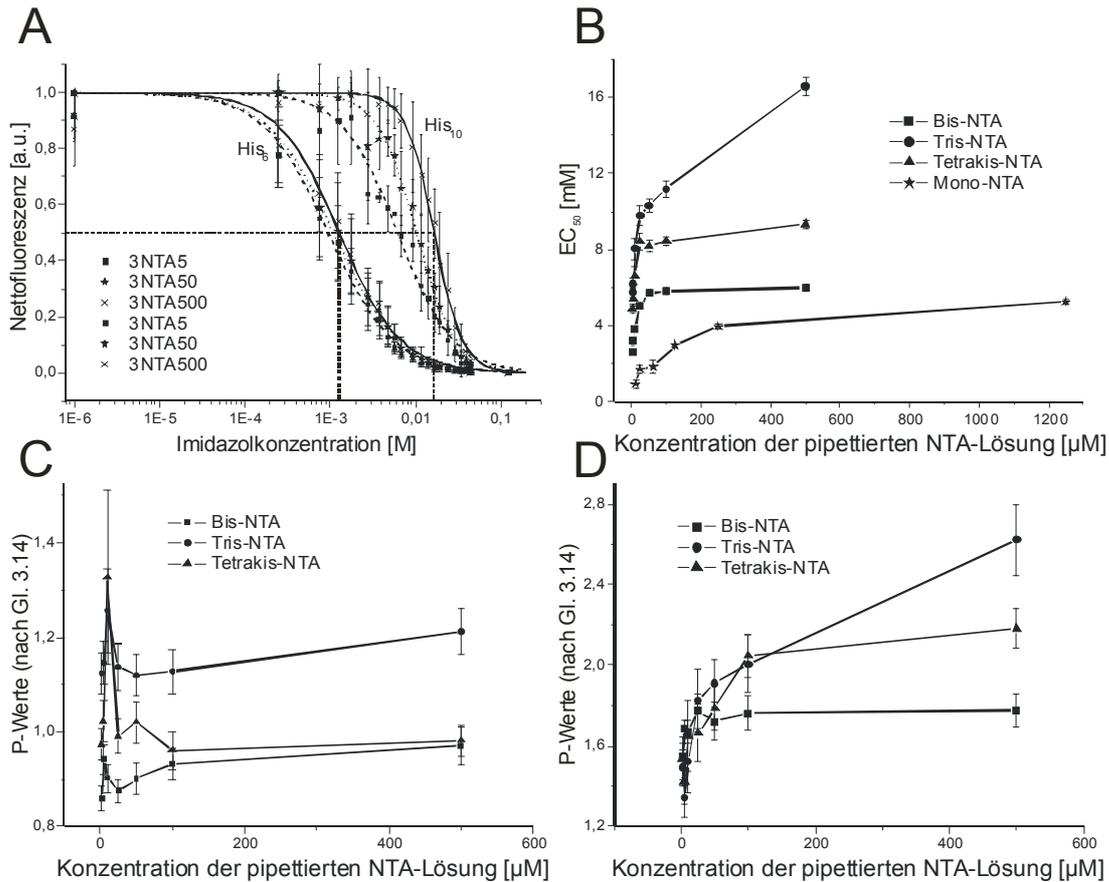


Abbildung 4.13: (A) Angepasste Dissoziationskurven von Dekahistidin und Hexahistidin für jeweils drei verschiedene Oberflächendichten auf Tris-NTA-Spots. Die angegebenen Werte (5, 50, 500) beziehen sich auf die Konzentrationen der pipettierten Lösungen in μM . (B) EC_{50} -Werte (nach Gl.3.14) für Dekahistidin bei unterschiedlichen Dichten verschiedener NTA-Oberflächen. (C) P-Werte (nach Gl.3.14) für Hexahistidin bei unterschiedlichen Dichten verschiedener NTA-Oberflächen. (D) P-Werte für Dekahistidin bei unterschiedlichen Dichten verschiedener NTA-Oberflächen.

Bei der Beurteilung der Kurvenverläufe und Absolutintensitäten (Abb. 4.11) sollte berücksichtigt werden, dass nicht nur eine Konkurrenz mit Imidazol stattfinden kann. Denkbar ist ebenfalls, dass eine Konkurrenz der Oligohistidine untereinander an den NTA-Molekülen stattfindet. Zu dieser Konkurrenz wurden bereits von Lata *et al.* Untersuchungen in Lösung durchgeführt.^[137] Zudem können die erreichten Dichten auf der Oberfläche für Tris- und Tetrakis-NTA-Moleküle bei gleicher eingesetzter Konzentration

der Pipettierlösungen aufgrund struktureller Unterschiede der Moleküle unterschiedlich ausfallen. Es lassen sich jedoch einige bemerkenswerte Merkmale an den ermittelten Dissoziationskurven feststellen.

1. Dekahistidin zeigte sich sensitiv gegenüber Änderungen der Dichte auf der Oberfläche, während dies für Hexahistidin bei den untersuchten Dichten offensichtlich weniger relevant war. In Abbildung 4.13 ist die Drift für Dekahistidin bei unterschiedlichen Oberflächendichten für Tris-NTA im Vergleich zu Hexahistidin dargestellt. Die Kurven zeigen eine deutliche Drift in Richtung niedrigerer P-Werte (geringere Steigung der Kurven). Dies wird noch deutlicher, wenn auch die P-Werte im Verlauf der Oberflächendichten betrachtet werden (Abb. 4.13 D). Interessanterweise tritt dieser Effekt besonders stark bei Tris-NTA-Oberflächenfunktionalisierungen auf. Bei allen weiteren NTA-Molekülen eine geringere Abnahme der Kurvensteilheit zu beobachten (Abb. 4.12 A-D). Bei Messungen mit Hexahistidin sind diese Effekte weniger ausgeprägt.

2. Die EC_{50} -Werte nehmen erwartungsgemäß bei Dekahistidin für höhere Oberflächenbelegungen zu. Wiederum am ausgeprägtesten findet sich dies - für Hexahistidin und Dekahistidin - bei Tris-NTA-Oberflächenfunktionalisierungen. Dies ist im Falle von Hexahistidin damit erklärbar, dass hier ein äquimolares Verhältnis zwischen einem Hexahistidin und einem Tris-NTA theoretisch möglich ist, und bereits die hohe Stabilität des Tris-NTA-Ni-His₆-Komplexes auf Oberflächen beschrieben wurde.^[133,137]

3. Überraschend erscheinen die geringeren Intensitäten der Spots von S0387-Ala₂-His₆-OH auf Tetrakis-NTA-Oberflächen im Vergleich zu Tris-NTA (Abb. 4.11). Bei ausschließlicher Inkubation mit Hexahistidin waren die Intensitäten auf den Tetrakis-NTA-Spots höher als jene auf den Tris-NTA-Spots (Abbildung 4.14). Dies impliziert eine bessere Bindung von Hexahistidin an Tris-NTA im Vergleich zu Tetrakis-NTA, obwohl selbst bei hypothetischer stöchiometrischer Anbindung die gleiche Anzahl von Bindungen möglich ist. Es tritt auf der Oberfläche der gleiche Effekt bei der Konkurrenz der Oligohistidine untereinander auf wie er bereits bei Messungen in verdünnter Lösung beschrieben wurde.^[137] Im Vergleich zu den Lösungsexperimenten könnte ein wesentlich höherer Anteil an Oligohistidinen an die Oberflächen gebunden sein, wobei mehrere NTA-Moleküle auf der Oberfläche gleichzeitig adressiert werden. Da bei stöchiometrischer Anbindung von Hexahistidin an Tetrakis-NTA eine Ni²⁺-NTA-Gruppe nicht koordiniert werden kann, kann diese freie Ni²⁺-NTA-Gruppe für einen aktiven Austausch durch Koordination mit Dekahistidin sorgen. Dieses kann, einmal angebonden, die Verdrängung von Hexahistidin an allen anderen Ni²⁺-NTA-Gruppen bewirken.

4. Bei Dekahistidin ist eine umgekehrte Redundanz vorhanden, infolge dessen stets mehr Histidine zur Anbindung zur Verfügung stehen als anbinden können und ein aktiver Austausch daher nicht mehr möglich ist. Dennoch zeigten sich die Dekahistidin-Nickel-Tetrakis-NTA-Komplexe überraschend instabil bei der Konkurrenz gegen Imidazol und sind sogar instabiler als die Komplexe des Dekahistidins mit Tris-NTA.

Erwartet wurde jedoch, dass Tetrakis-NTA theoretisch durch zusätzliche Anbindung an Dekahistidin für eine Verbesserung der Stabilität sorgen sollten. Insgesamt dürften also weniger stöchiometrische Aspekte sondern vielmehr sterische Gründe bei den Oligohistidinen und auch topologische Aspekte der NTA-Moleküle für die Stabilität der Bindung verantwortlich sein. Das zyklische Tris-NTA-Molekül präsentiert seine NTA-Gruppen vermutlich in anderer Weise als die linearen Bis- und Tetrakis-NTA-Moleküle.

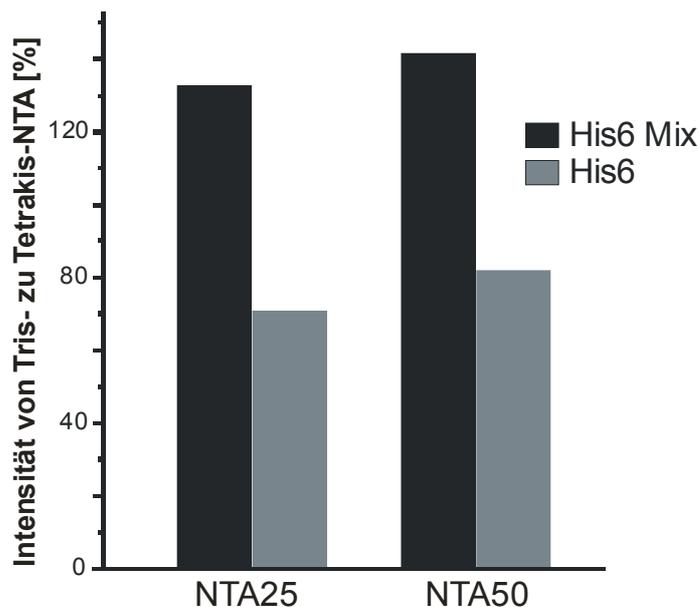


Abbildung 4.14: Vergleich der Signalintensitäten von Hexahistidin auf zwei verschiedenen dichten Tetrakis- und Tris-NTA-Spots. Angegeben ist das prozentuale Verhältnis der Signalintensitäten von Tris-NTA zu Tetrakis-NTA. Die Signalintensitäten von Fluo-Ahx-His₆-OH auf Tris-NTA-Spots waren im Falle einer Mischung von S0387-Ala₂-His₆-OH mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH (His₆ Mix) aufgrund der aktiven Konkurrenz etwas höher als die auf Tetrakis-NTA-Spots.

Tabelle 4.2: EC₅₀-Ratio (His₁₀/His₆) auf Spots aus verschiedenen konzentrierten Spotlösungen von Bis-, Tris- und Tetrakis-NTA-Molekülen.

	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM	500 µM
EC ₅₀ -Ratio Bis-NTA	4,6	6,3	6,3	8,5	8,3	8,9	10,5
EC ₅₀ -Ratio Tris-NTA	5,9	6,5	7,8	9,5	9,4	9,6	12,9
EC ₅₀ -Ratio Tetrakis-NTA	6,5	7,4	8,3	9,3	10,5	11,7	15,6

Bei niedriger und mittlerer Dichte auf der Oberfläche fällt auf, dass sich Dekahistidin nahezu gleich (in)stabil für Tris- und Tetrakis-NTA verhielt. Bei höheren Oberflächendichten wurde der Unterschied größer. Aus dem Verlauf der EC₅₀-Werte von Dekahistidin ist ersichtlich, dass eine Sättigung der Anbindung an die Oberfläche nicht erreicht wurde (Tabelle 4.1, Abbildung 4.13 B). Bei höherer Dichte auf der Oberfläche sollten daher noch wesentlich höhere EC₅₀-Werte erzielt werden können (jedoch wegen des Quenching keine stärkere Fluoreszenz). Dies wurde im Prinzip auch bereits bei anderen nicht veröffentlichten RfS- und SPR-Messungen bestätigt.^[178]

Die Absolutwerte der EC₅₀-Werte zeigen das Verhalten der verschiedenen NTAs im Zusammenspiel mit den Oligohistidinen bei Anwesenheit beider Oligohistidine. Zur Beurteilung der Stabilitätsunterschiede von Oligohistidinen mit NTA-Molekülen ist der Unterschied der EC₅₀-Werte wichtig. Die Ratio der EC₅₀-Werte von Dekahistidin zu Hexahistidin für verschieden konzentrierte Pipettierlösungen von Bis-, Tris-, und Tetrakis-NTA-Moleküle ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Der größte Unterschied zwischen den EC₅₀-Werten zeigte sich für Tetrakis-NTA bei den am höchsten eingesetzten Konzentrationen. Aufgrund des Verlaufs der Werte ist zu erwarten, dass mit steigender Dichte der NTA-Moleküle auf der Oberfläche eine wesentlich stärkere Unterscheidung zwischen Dekahistidin und Hexahistidin stattfinden wird.

Um herauszufinden bei welchen Imidazolkonzentrationen auf den einzelnen Spots der größte Unterschied zwischen Hexahistidin und Dekahistidin zu finden ist, wurde die Veränderung des Verhältnisses der Fluoreszenz von S0387 zu Fluoreszein im Verlauf der Änderung der Imidazolkonzentrationen betrachtet (Abb. 4.15). Dabei zeigte sich, dass für Tris-NTA das Unterschiedsmaximum zwischen Dekahistidin und Hexahistidin bei höheren Imidazolkonzentrationen liegt im Vergleich zu Tetrakis- oder Bis-NTA (Abb. 4.15 A). Ebenfalls zu sehen war dabei, dass sich das Unterschiedsmaximum für Tris- und Tetrakis-NTA bei verschiedenen Dichten auf den Oberflächen nur wenig oder gar nicht verändert.

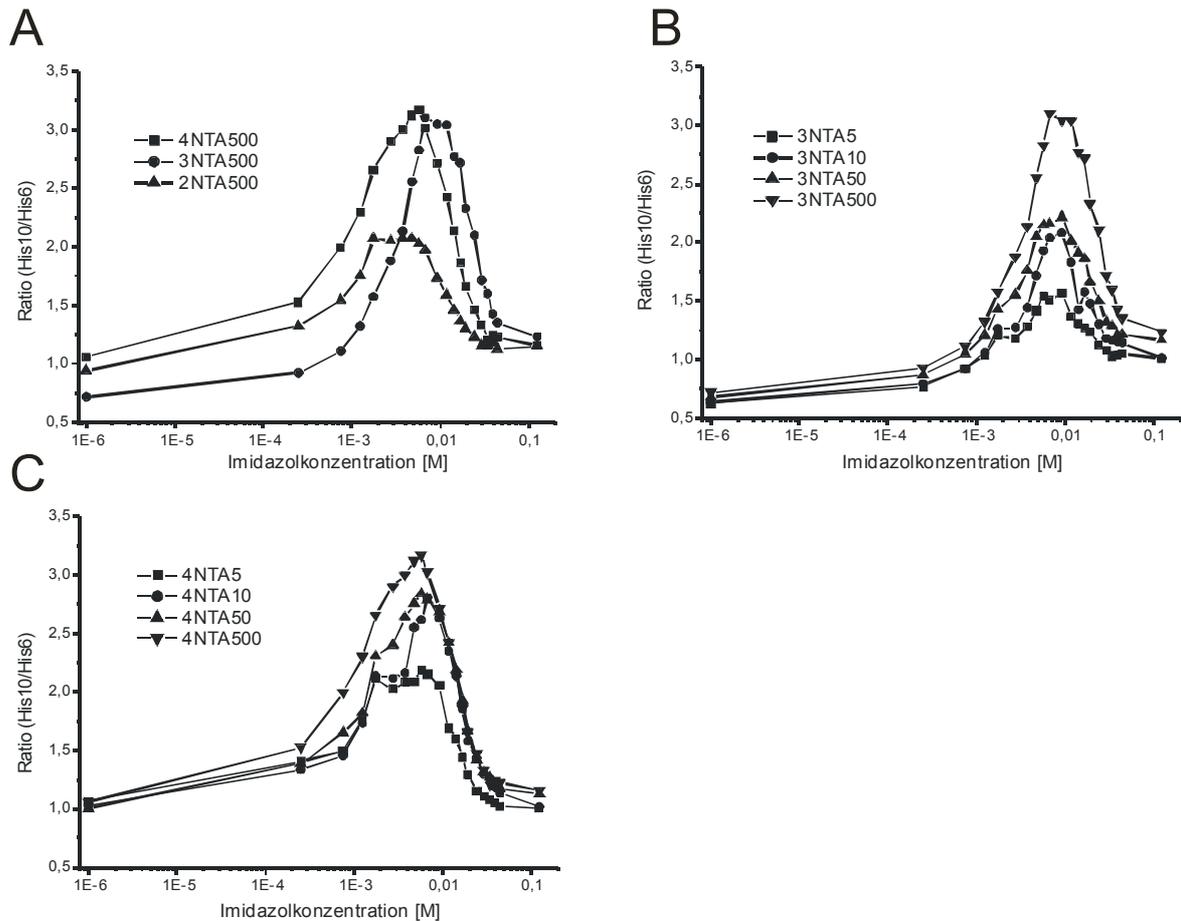


Abbildung 4.15: Selektivität der NTA-Moleküle in Abhängigkeit vom Chelator und dessen Dichte. (A) Veränderung des Verhältnisses der Fluoreszenz von Dekahistidin (20 nM) zu Hexahistidin (20 nM) auf verschiedenen NTA-Molekülen bei gleicher eingesetzter Konzentration (500 μ M) im Verlauf der Titration mit Imidazol. (B) und (C) Vergleich der Veränderung des Maximums für unterschiedliche Konzentrationen der Spotlösungen für Tris- und Tetrakis-NTA (5, 10, 50, 500 μ M).

4.2.2 Parallel- und Einzel-Dissoziationsmessung von His₆ und His₁₀

Es ist evident, dass sich Dekahistidin und Hexahistidin auf den NTA-Oberflächen gegenseitig beeinflussen^[137] (Abb. 4.14). Zur Bestätigung der gegenseitigen Beeinflussung, wurden auch Einzelmessungen nur mit Dekahistidin und nur mit Hexahistidin auf den NTA-Mikroarrays durchgeführt. Zudem sollten Effekte, die möglicherweise die Fluorophore verursachen könnten, ausgeschlossen werden.

In Abbildung 4.16 ist eine Auswahl verschiedener Dissoziationskurven gezeigt. Es zeigt sich, dass die Unterschiede bei dieser Messmethode und den auf den Oberflächen erzielten NTA-Dichten zwischen Hexahistidin und Dekahistidin deutlich geringer sind als unter

zusätzlichen kompetitiven Bedingungen der Histidine untereinander (= interne Competition). Auch wurden die Dissoziationskurven von Einzelmessungen mit denen aus parallelen Messungen unter kompetitiven Bedingungen verglichen. Um auszuschließen, dass nur die Fluorophore für diesen Unterschied zwischen kompetitiver Messung und Einzelmessung verantwortlich sind, wurden für Hexahistidin zwei verschiedene Fluorophore bei Einzelmessungen eingesetzt (Abb. 4.17 C und D).

Vergleicht man die Messpunkte bzw. Dissoziationskurven von Dekahistidin und Hexahistidin aus Abbildung 4.12 und 4.13 mit denen aus Abbildung 4.16 A und 4.16 B, fällt der kleinere Unterschied zwischen den Kurven von Hexahistidin und Dekahistidin auf. Dies bedeutet, dass sich Hexahistidin und Dekahistidin bezüglich ihres Dissoziationsverhaltens auf den Mikroarrays ohne interne Competition deutlich geringer unterscheiden. So lässt sich im Fall fehlender interner Competition bei Hexahistidin eine Verschiebung in Richtung höherer Imidazolkonzentration und bei Dekahistidin eine Verschiebung in Richtung niedrigerer Imidazolkonzentration feststellen (Abbildung 4.16 C und D). In Abbildung 4.17 A und B ist dies nochmals für beide Oligohistidine verdeutlicht.

Während Hexahistidin bei interner Competition niedrigere EC_{50} -Werte aufweist als bei Einzelmessungen, ergibt sich bei Dekahistidin der umgekehrte Effekt. Die Anwesenheit beider Oligohistidine förderte also die Differenzierung zwischen den Oligohistidinen auf den Mikroarrays. Die Abbildungen 4.17 C und D zeigen, dass bei Einsatz eines anderen Fluorophors bei Hexahistidin nur geringe Unterschiede zu beobachten waren, denn die beiden Kurven für S0387-Ala₂-His₆-OH und Fluo-Ahx-His₆-OH unterscheiden sich nur gering. Bei Dekahistidin wurden alle Messungen ausschließlich mit Fluoreszein durchgeführt, womit ein Effekt des Fluorophors ausgeschlossen werden kann.

Um den Effekt von Dekahistidin auf die Dissoziation von Hexahistidin mit Hilfe der Mikroarrays zu untersuchen, wurden zusätzlich Dissoziationsmessungen mit nichtfluoreszентem Ahx-His₁₀-OH und S0387-Ala₂-His₆-OH durchgeführt. So sollte ausgeschlossen werden, dass die Fluorophore die Dissoziationsmessungen bei paralleler Messung beider Oligohistidine beeinflussen. In Abbildung 4.18 ist eine Auswahl dieser Dissoziationsmessungen jeweils im Vergleich zu parallelen Messungen mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH und Einzelmessungen ohne Dekahistidin dargestellt.

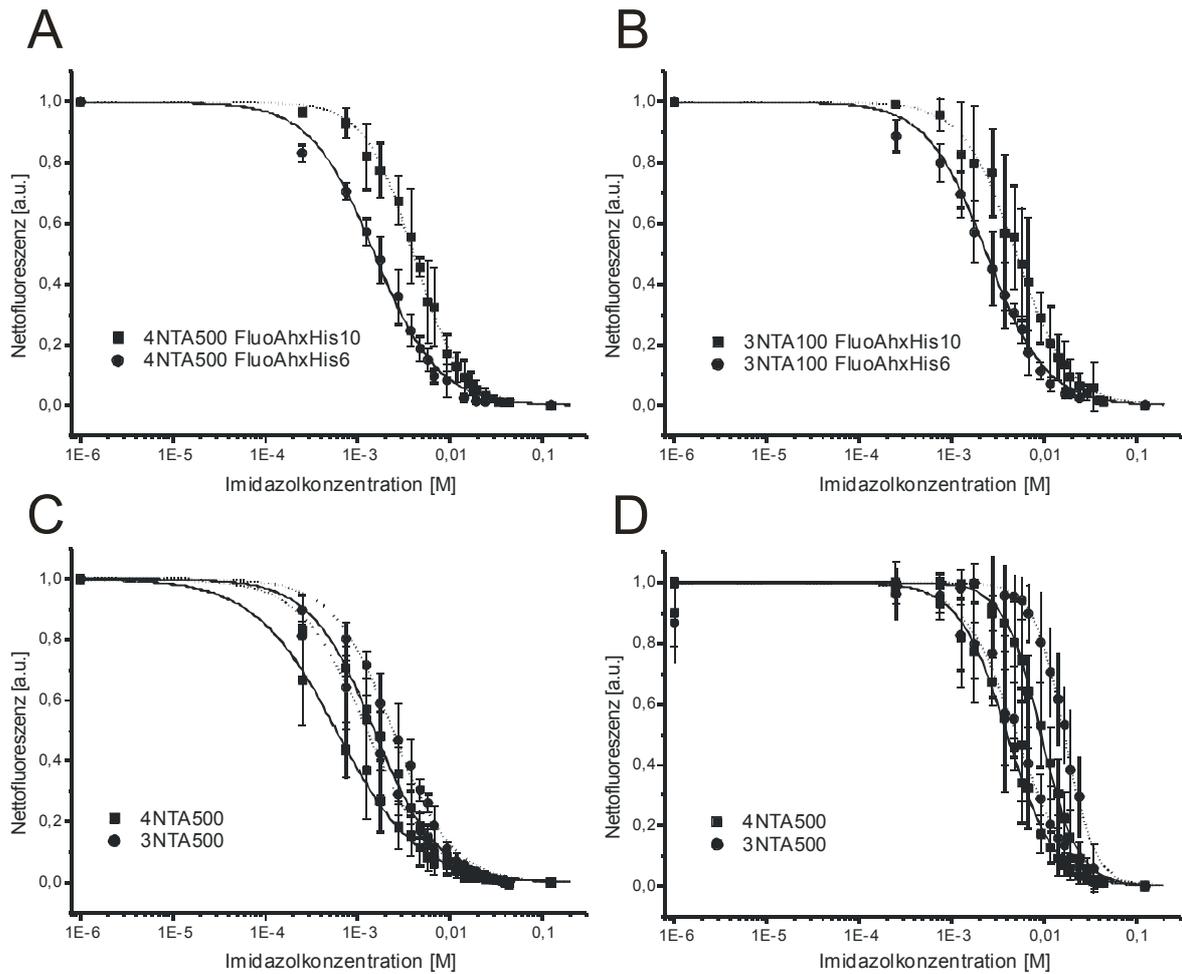


Abbildung 4.16: Vergleiche zwischen Einzel- und Parallelmessung von His₁₀ und His₆. (A) Angepasste Dissoziationskurven und Messwerte von Fluo-His₁₀ (Quadrate bzw. durchgehende Linie; 20 nM) und Fluo-His₆ (Kreise bzw. punktierte Linie; 20 nM) auf Tetrakis-NTA-Spots (500 μ M) bei Einzelmessungen der Dissoziation mit Imidazol. (B) Angefittete Dissoziationskurven und Messwerte von Fluo-His₁₀ (Quadrate) und Fluo-His₆ (Kreise) auf Tris-NTA-Spots (100 μ M) bei Einzelmessungen der Dissoziation mit Imidazol. (C) Vergleich von Dissoziationsmessungen von S0387-His₆ bei paralleler Detektion (interner Konkurrenz) von His₁₀ und His₆ mit denen aus Einzelmessungen mit Fluo-His₆ auf Tris-NTA und Tetrakis-NTA. Der höhere jeweilige Messpunkt der Quadrate oder Kreise (bzw. die höher liegende durchgehende oder punktierte Linie) entstammt den Einzelmessungen. (D) Wie bei (C) jedoch für Fluo-His₁₀ und hier entstammen die jeweils niedrigeren Messpunkte und Linien den Einzelmessungen.

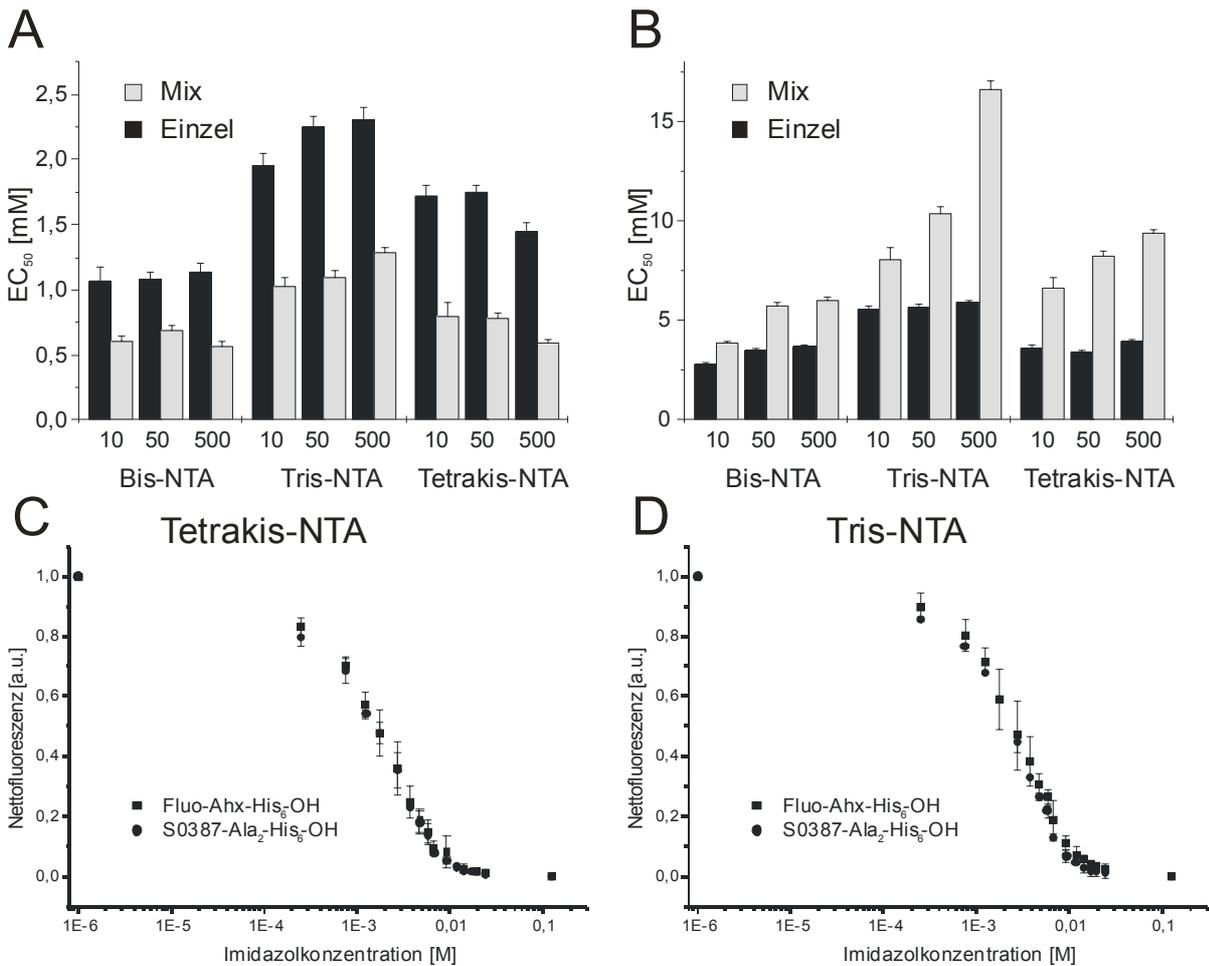


Abbildung 4.17: Effekt von Parallel- und Einzelmessung auf die EC₅₀-Werte von Hexahistidin (A) und Dekahistidin (B). (C) und (D) zeigt den Effekt des Fluorophors auf die Dissoziationsmessung. Vergleich von Hexahistidin mit zwei verschiedenen Fluorophoren auf Tetrakis-NTA-Spots die aus Spotlösung mit 500 μM entstanden waren (C). (D) wie (C) jedoch auf Tris-NTA-Spots, die ebenfalls aus Spotlösungen mit 500 μM stammen. Die Konzentrationen der Histidine waren jeweils 20 nM.

Messwerte die mit nichtfluoreszentem Dekahistidin entstanden sind, tendieren dazu, zwischen den Werten von Messungen mit Fluo-Ahx-His₁₀-OH und den Werten der Einzelmessungen zu liegen. Ein Grund hierfür kann darin liegen, dass die Lösung von nichtfluoreszentem Dekahistidin durch Einwaage hergestellt wurde und nicht wie alle anderen fluoreszenten Oligohistidine durch die wesentlich präzisere Absorptionsmessung. Dabei kann sich durch Salzbildung und Feuchtigkeit die tatsächliche Menge an Dekahistidin unterscheiden. Somit unterscheidet sich die vorhandene Konzentration an Dekahistidin sehr wahrscheinlich von der von Hexahistidin. Ebenfalls allen Messungen

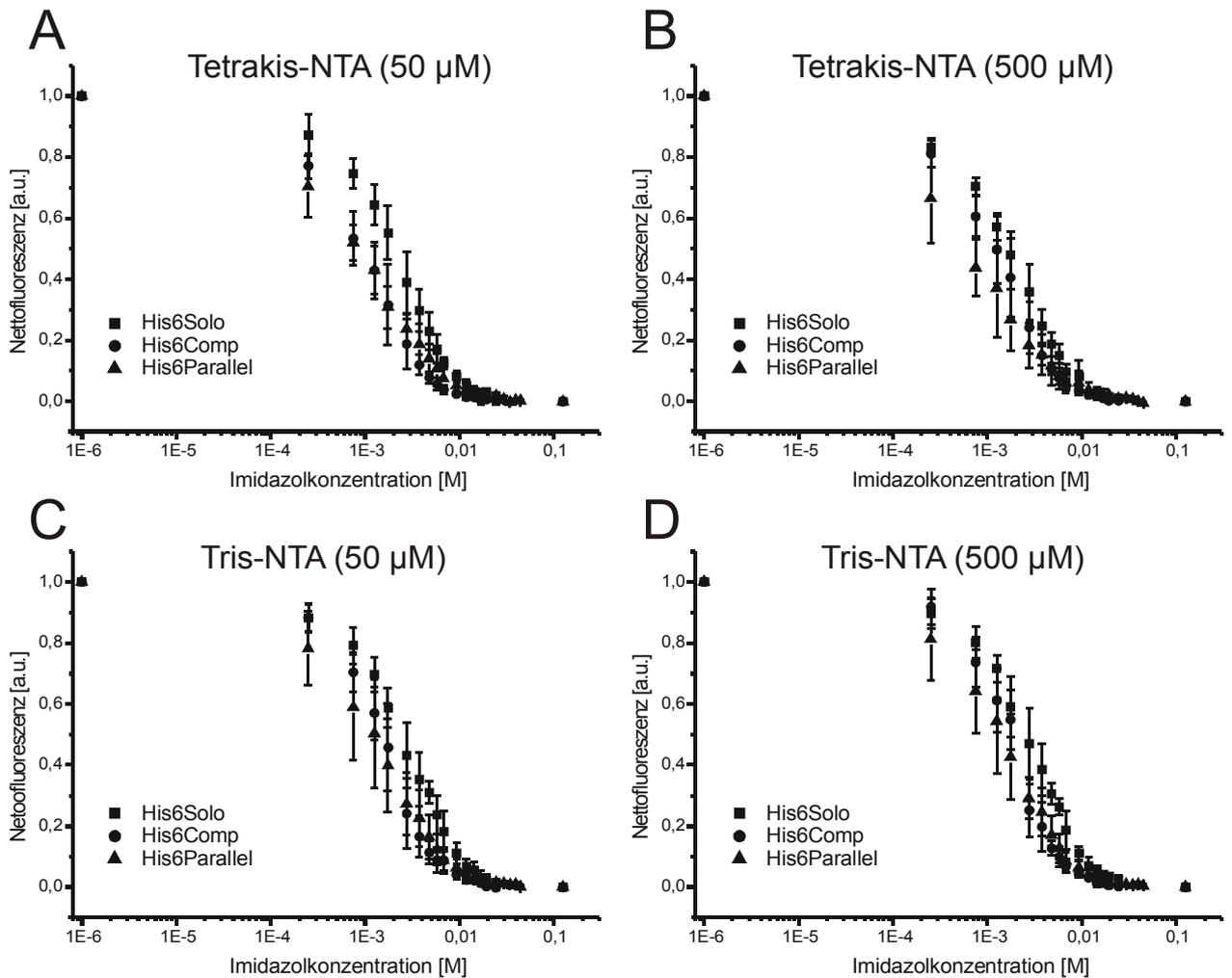


Abbildung 4.18: Einfluss von fluorophormarkiertem und nicht fluoreszente m His₁₀ auf die Dissoziation von Hexahistidin. (A) Messwerte aus Dissoziationsmessungen von Hexahistidin (20 nM) mit Imidazol ohne anderes Oligohistidin (Quadrat, His₆Solo), in Anwesenheit von nichtfluoreszente m Ahx-His₁₀-OH (Kreis, His₆Comp; 20 nM) oder von Fluo-Ahx-His₁₀-OH (Dreieck, His₆Parallel; 20 nM) auf Tetrakis-NTA-Spots aus 50 μ M Spotl o sung. (B) Wie bei (A) jedoch auf Tetrakis-NTA-Spots aus 500 μ M Spotl o sung. (C) Wie bei (A) jedoch auf Tris-NTA-Spots aus 50 μ M Spotl o sung. (D) Wie (C) jedoch aus 500 μ M Spotl o sung.

gemein ist, dass die Werte der Ahx-His₁₀-OH-Messungen bei niedrigen Imidazolkonzentrationen eher \ddot{u} ber den Messwerten bei gleichzeitiger Messung beider Fluorophore liegen und bei h o heren Imidazolkonzentrationen eher darunter. Somit ergibt sich ein steilerer Kurvenverlauf.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Dissoziationsmessungen

Bei den Dissoziationsmessungen der Oligohistidine auf NTA-Mikroarrays konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung der Stabilität von Hexahistidin und Dekahistidin in Abhängigkeit von der vorhandenen Imidazolkonzentration durch parallele Detektion auf Mikroarrays möglich ist. Die Stabilität der Oligohistidine auf den Spots ist von der Dichte der NTA-Moleküle auf der Oberfläche abhängig. Die absolute Dichte der Oberflächenbelegung auf den Spots wurde nicht bestimmt, aber es konnten durch die Verwendung von Mikroarrays die Unterschiede zwischen verschiedenen dichten Spots auf einem Array parallel detektiert werden. Bei höheren Dichten der NTA-Moleküle auf der Oberfläche waren die Unterschiede zwischen Dekahistidin und Hexahistidin höher. Hier zeigte sich, dass bei höheren Dichten eine bessere Mehrfachanbindung an die Oberfläche erfolgen kann, was mit auf anderen Oberflächen durchgeführten Messungen in Übereinstimmung steht^[178]. Außerdem sollte bei höheren NTA-Dichten eine erhöhte Rückbindung an die Oberfläche erfolgen.

Auf den Mikroarrays beeinflussten sich Hexahistidin und Dekahistidin in ihrem Dissoziationsverhalten gegenseitig. Die Beeinflussung führte dazu, dass bei den auf den gewählten Oberflächen möglichen Dichten von NTA-Molekülen, die Unterschiede bei interner Konkurrenz ausgeprägter waren, als dies bei Einzelmessungen zwischen Hexahistidin und Dekahistidin auftrat. Hexahistidin zeigte sich dabei wesentlich weniger stabil auf der Oberfläche und ließ sich im Vergleich zu einer Einzelmessung mit Imidazol leichter wegkompetieren. Im Gegenzug zeigte sich Dekahistidin gegenüber Imidazol im Vergleich zu einer Einzelmessung als stabiler angebonden. Auf molekularer Ebene könnte dies bedeuten, dass das auch unter erhöhter Imidazolkonzentration noch stabiler anbindende Dekahistidin über einen gewissen Konzentrationsbereich von Imidazol an die frei gewordenen Koordinationsstellen der NTA-Moleküle anbindet, auf diese Weise das Hexahistidin ersetzt und eine Rückbindung von Hexahistidin aus der Lösung stärker unterdrückt. Allerdings lässt sich damit nicht die erhöhte Stabilität von Dekahistidin bei kompetitiver Messung erklären sondern nur die zügigere Dissoziation von Hexahistidin.

Ein weiteres Charakteristikum der Messungen ist, dass bei paralleler Detektion beider Oligohistidine die maximale Differenz der EC_{50} -Werte bei Tris-NTA-Molekülen bei höheren Imidazolkonzentrationen zu finden ist als bei Tetrakis-NTA oder Bis-NTA. Hier zeigt sich, dass die Anbindung von Hexahistidin an Tris-NTA ohne Redundanz stattfinden kann und dies offensichtlich auch Auswirkungen auf die Stabilität auf den Oberflächen hat.

Allerdings lässt sich daraus nicht die ebenfalls höhere Stabilität von Dekahistidin erklären. Somit spielt für Tris-NTA wahrscheinlich nicht die Redundanz oder die eher unwahrscheinliche 1:1 Stöchiometrie mit Hexahistidin die wichtige Rolle, sondern die mögliche Anordnung der Ni²⁺-NTA-Gruppen von Tris-NTA, so dass sowohl Hexahistidin als auch Dekahistidin stabiler binden. Auf den Tetrakis-NTA-Spots zeigte sich die maximale EC₅₀-Differenz zwischen Dekahistidin und Hexahistidin bei niedrigeren Imidazolkonzentrationen im Vergleich zu Tris-NTA. Dabei war möglicherweise der zusätzliche Verdrängungseffekt, den Dekahistidin auf Hexahistidin aufgrund der vorhandenen Redundanz der Bindung hat, ein wichtiger Faktor.

Für das Dissoziationsverhalten eines Oligohistidins stellte sich heraus, dass die an diesem Oligohistidin angebondenen Fluorophore keinen Einfluss auf das Dissoziationsverhalten haben. Der Einfluss des Fluorophors des konkurrierenden Oligohistidins kann nach Berücksichtigung der Messungen mit nichtfluoreszentelem Oligohistidin als eher gering eingestuft werden und den großen Unterschied zwischen Einzelmessung und paralleler Messung nicht erklären. Bei der parallelen Detektion von S0387- und fluoreszeinmarkierten Oligohistidinen konnte ein schwacher Energietransfer beobachtet werden. Gleiches trat wesentlich stärker für die Fluoreszenzfarbstoffkombination Fluoreszein und Tetramethylrhodamin zutage. Durch die nicht mehr steigende Fluoreszenz bei Spots aus höher konzentrierten Spotlösungen (sowohl im Falle paralleler Messungen als auch im Fall von Einzelmessungen) zeigte sich der fluoreszenzquenchende Effekt des Nickels. Dementsprechend konnten keine direkten Helligkeitsvergleiche zwischen verschiedenen Spots angestellt werden. Die Spots zeigten jedoch unterschiedliche Eigenschaften im Zusammenspiel mit den Oligohistidinen, so dass das Quenching bei der Ermittlung der Dissoziationskurven durch die Normierung der Signalintensitäten weniger relevant war.

4.3 Molekulardynamische Untersuchung von Histidin-Nickel-NTA-Komplexen

Für die Entwicklung von möglichst komplementären Bindungspaaren auf der Grundlage des Systems der Oligohistidin-Nickel-NTA-Wechselwirkung wurde mit molekulardynamischen Methoden untersucht, ob spezielle Geometrien bzw. Strukturen von Oligohistidinen zu bevorzugten Bindungen führen könnten. Daraus gewonnene Erkenntnisse sollten in das Design optimierter Oligohistidine einfließen. Dazu wurden zunächst die Oligohistidine His₆ und His₁₀ mit einem Mono-NTA untersucht um festzustellen, ob es hier eine Vorzugskoordination gibt, oder ob nur durch die mögliche Mehrzahl an Bindungsmöglichkeiten das Dekahistidin besser bindet. Nachfolgend wurde eine simultane Versuchsreihe mit den Oligohistidinen und Bis-NTA wiederholt. Zunächst musste jedoch überprüft werden, ob die Parameterisierung für die Moleküle und Ionen korrekt war. Dazu wurde als erstes eine Energieminimierung (gemäß des Teils im Anhang, der die Minimierung beschreibt) zwischen Ni²⁺ und einem vorher minimierten Oligohistidin vorgenommen um zu sehen, ob die molekularen und atomaren Parameter für eine Molekulardynamik richtig waren. Da das Ni²⁺-Ion im ESF-Kraftfeld nicht parametrisiert war, mussten erst Ladung und Koordination zugeordnet werden. Gemäß bekannten Röntgenstrukturen zwischen Ni²⁺-Ion, Wasser und Histidinen^[145] wurden zwei positive Ladungen und eine oktaedrische Koordinationssphäre für Nickel gewählt. Für die Minimierung zwischen Nickel und Histidin wurde das Nickel knapp drei Ångström entfernt zu einem Stickstoff des Imidazolrings von His3 platziert. Die Struktur zeigte nach Ende der Minimierung (Abb. 4.19), dass Nickel am Stickstoff des Imidazolringes des Oligohistidins gehalten wurde. Die Koordination von Nickel an Hexahistidin führte zu einem Energieminimum. Andernfalls wäre Nickel sonst nicht ohne Constraints am Oligohistidin koordiniert worden. Gleichzeitig zeigte die Minimierung, dass der zusätzliche Imidazolring von His5 an das Nickel koordinierte. Das Ergebnis bestätigte, dass die Parameter für diese Wechselwirkung richtig gewählt waren, da freies Nickel korrekt koordiniert wurde.

Die nachfolgend durchgeführten Minimierungen für Ni²⁺-NTA-Komplexe ergaben, dass die Komplexe zwar nicht zerfielen, aber Bindungswinkel und -längen eine sehr große Abweichung von bekannten Röntgenstrukturen zeigten.^[145] Daher war es nötig, die Geometrie des Komplexes durch Beschränkungen der Freiheiten während der Simulation

zu fixieren. Dazu wurden die Bindungslängen und Bindungswinkel sowohl innerhalb der Teilstruktur des NTAs, der die Koordination zum Ni^{2+} herstellt, als auch die Bindungslängen und Winkel zwischen NTA und Ni^{2+} auf vorgegebene Werte gesetzt (siehe Anhang) und durch große Kraftkonstanten dort fixiert. Die minimierten Ni^{2+} -NTA-Komplexe zeigten bei molekulardynamischen Untersuchungen nur eine geringe Affinität zu Histidinen. Die Bindungslänge zwischen dem Ni^{2+} -Ion und dem entsprechenden Stickstoff am Oligohistidin war wesentlich größer als in bekannten Röntgenstrukturen.^[145]

Diese Röntgenstrukturen zwischen NTA-Nickel und Imidazolringen dienten als Vorbild für die Parameter (Bindungslängen und -winkel) um Beschränkungen für die Wechselwirkung zwischen Mono-NTA-Nickel und dem Oligohistidin einzuführen.

Aus zwei solchen Einheiten wurde auch das Bis-NTA-Molekül aufgebaut und minimiert. Mit Hilfe dieser Parameter wurden nach der Methode des Simulated Annealing mehrere Wechselwirkungen zwischen Mono-NTA-Ni-Molekülen und Oligohistidinen untersucht. Dazu wurden beide Koordinationsstellen von Nickel mit den entsprechenden Stickstoffen im Heterzyklus der beiden ausgewählten Histidine des Oligohistidins koordiniert. Dies wurde für verschiedene Kombinationen von Anbindungen zwischen dem NTA und den Histidinen der Oligohistidine durchgeführt.

Die gleiche Prozedur wurde mit Bis-NTA-Ni-Molekülen und Dekahistidin durchgeführt. Hier wurden nicht an jedes Nickel-NTA zwei Histidine, sondern nur ein Histidin mit einem Nickel-NTA koordiniert. Dies sollte für eine Untersuchung einer Vorzugskoordination ausreichen. Die verbliebenen Valenzen des Ni^{2+} -Ions wurden nicht abgesättigt. Abbildung 4.20 und 4.21 zeigen die erreichten Energiewerte der Systeme für die verschiedenen Kombinationen von Histidinen des Oligohistidins und den NTA-Molekülen.

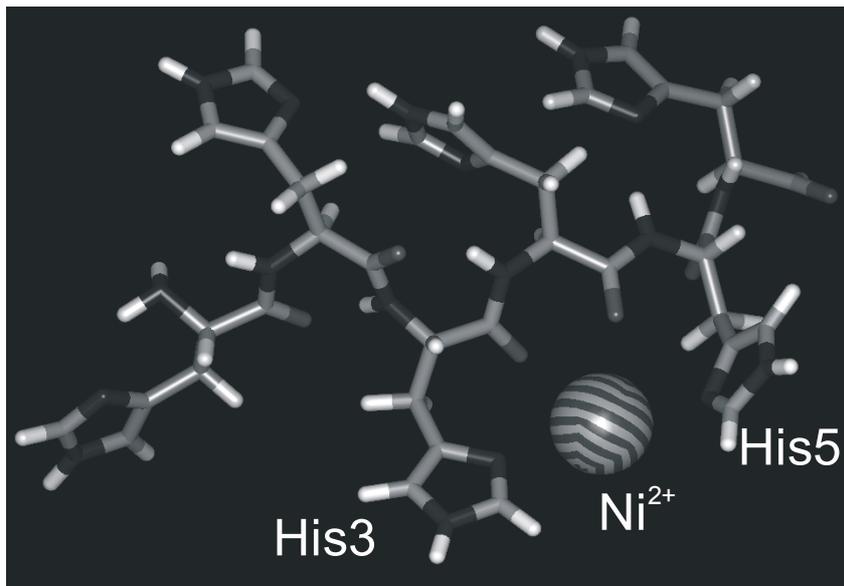


Abbildung 4.19: Sinnvolle Korrdination des Hexahistidins an das Ni^{2+} nach einer Minimierung mit Discover 3.1. Minimierung zunächst mit "Conjugate Gradients" (Polak-Ribère) und nachfolgend mit "Steepest Descent" (BFGS). Insgesamt wurden maximal 2300 Iterationen durchgeführt. Die gezeigte Wechselwirkung stellt eine His3-5 Wechselwirkung dar.

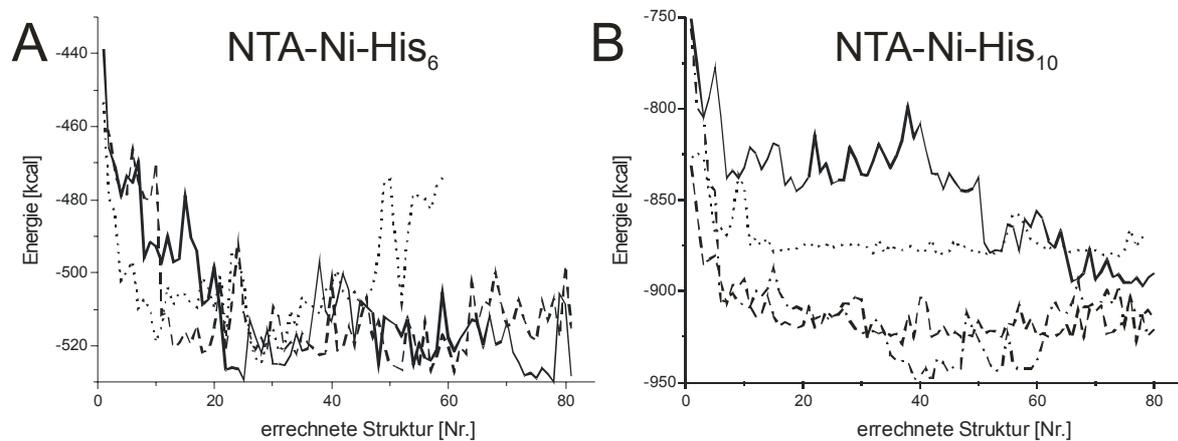


Abbildung 4.20: Durch Simulated Annealing erhaltene Energien von Wechselwirkungen zwischen Oligohistidin und Ni^{2+} -NTA-Komplex nach abschließender Minimierung. Histidin 1 befindet sich am N-terminus der Oligohistidinkette. Es wurden verschiedenen Kombinationen von zwei Histidinen eines Oligohistidins mit einem Ni^{2+} -NTA untersucht.

(A) Wechselwirkung zwischen Hexahistidin und Nickel-Mono-NTA. (---) His2-4 WW, (····) His2-5 WW, (–) His2-6 WW.

(B) Wechselwirkung zwischen Dekahistidin und Nickel-Mono-NTA. (–) His2-7 WW, (····) His2-8 WW, (---) His2-9 WW, (---) His2-10 WW.

Abbildung 4.22 gibt einen Eindruck einer simulierten Niedrig-Energie-Struktur zwischen Dekahistidin und Bis-NTA wieder. Die Durchführung des Simulated Annealing zur Berechnung einer begrenzten Anzahl von minimierten Strukturen benötigte für jede Kombination eine Rechenzeit von mehreren Tagen. Daher musste die Zahl der untersuchten Kombinationen eingeschränkt werden. Berechnungen, die wegen Softwareinstabilitäten abbrechen, konnten nicht wiederholt werden.

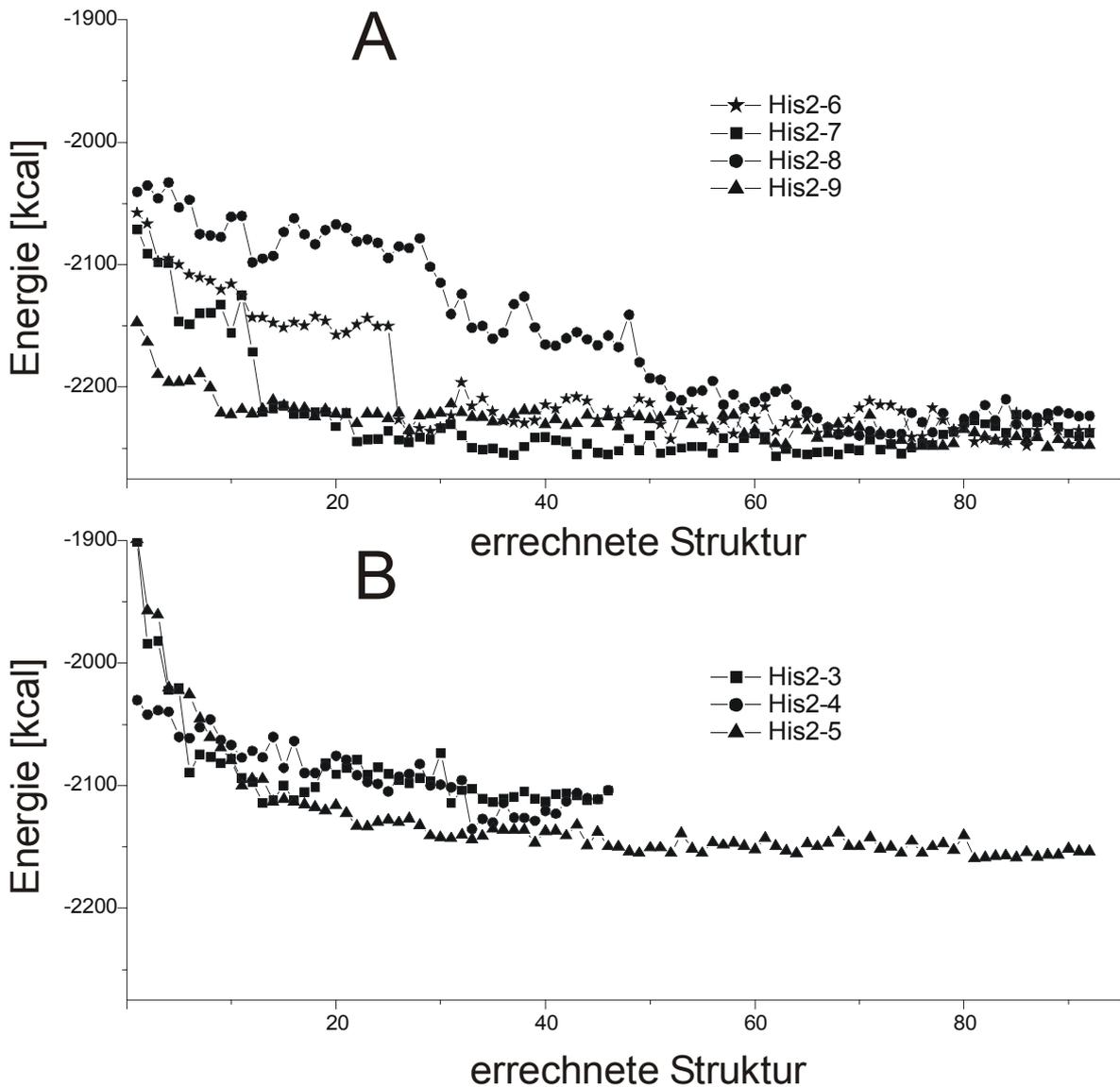


Abbildung 4.21: Ähnlich Energien für die Kombinationen von Wechselwirkungen des Systems Dekahistidin–Nickel-Bis-NTA nach Simulated Annealing. Jedem NTA wurde dabei ein Nickelion und der Imidazolring eines Histidins zugeordnet.

Die Kombination His2-3 ließ sich initial nicht sinnvoll für die Simulated Annealing Prozedur zwischen Hexahistidin und Mono-NTA einrichten. Die Bindungsabstände ergaben unabhängig von der anfangs gewählten Konformation des Hexahistidins bei der anschließenden Annealing-Prozedur keine sinnvollen Werte. Insgesamt sind die Energieunterschiede zwischen den verschiedenen Geometrien gering. Lediglich die Energie des Systems mit der Kombination His2-8 blieb im Rahmen der Berechnungen etwas höher als bei den anderen Kombinationen (Abb. 4.20 B).

Die anschließende Simulation von Strukturen zwischen Dekahistidin und Nickel-Bis-NTA zeigte, dass der Abstand zwischen den beiden Histidinen, die mit den NTA-Gruppen in Wechselwirkung traten, ab einem Minimalabstand von drei Histidinen für die Energie des Systems keine Rolle mehr spielte (Abb. 4.21 A). Alle Kombinationen zeigten etwa gleich niedrige Energiewerte. Kürzere Abstände führten bei den durchgeführten Simulationen zu ungünstigeren Konformationen des Dekahistidins, des Bis-NTAs oder beiden, und somit zu etwas höheren Energien (Abb. 4.21 B).

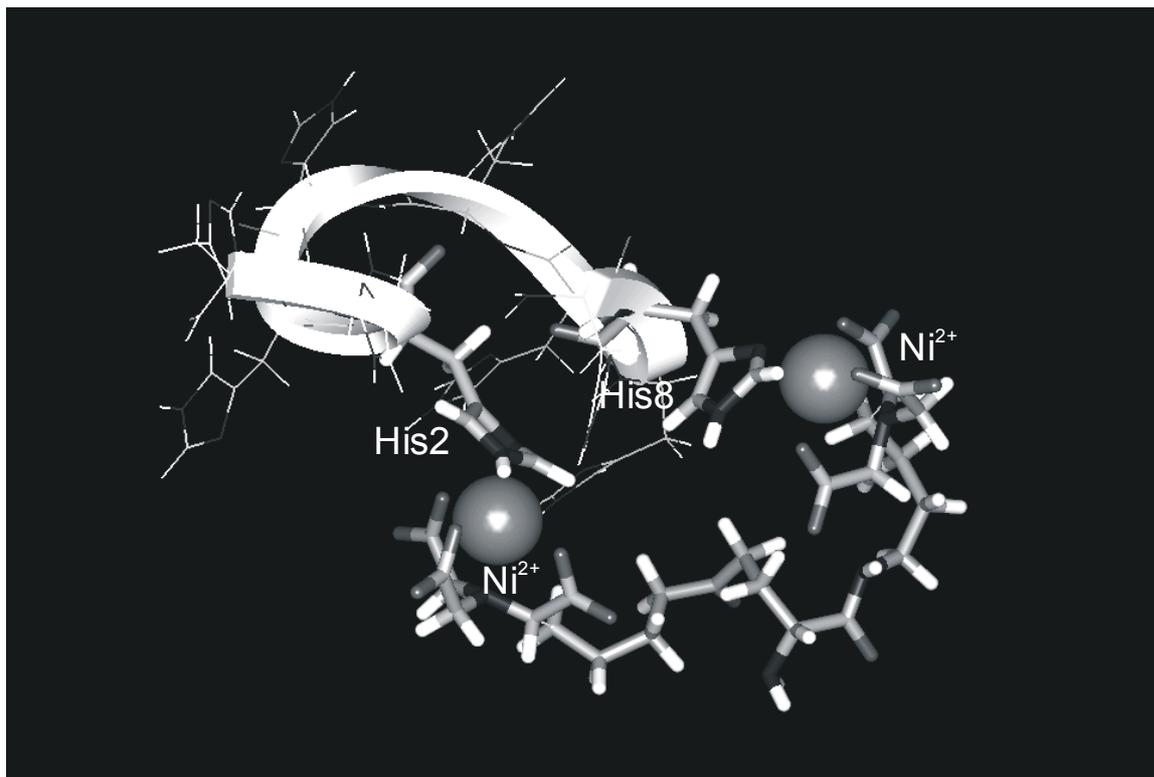


Abbildung 4.22: Darstellung einer Niedrigenergiestruktur von Dekahistidin mit Bis-NTA.

Die großen Kugeln stellen die Ni-Ionen dar. Die beteiligten Histidine His2 und His8 sowie das Bis-NTA sind in der Stab-Darstellung illustriert. Die Kette des Oligohistidins ist zusätzlich als hellgraues Band dargestellt.

Bei Betrachtung von Abbildung 4.22 werden die räumlichen Begrenzungen deutlich, die bei der Gruppierung der Histidine um die beiden Ni^{2+} -NTAs existieren. Die Kette des Oligohistidins läuft in einem weit geschwungenen Bogen um das Bis-NTA, um eine energetisch möglichst ungezwungene Konformation einnehmen zu können. Die Simulationen zeigen, dass es im Prinzip keine signifikanten Vorzugsbindungen bzw. -koordinationen gibt. Daraus lässt sich vermuten, dass der Zugewinn an zusätzlichen Permutationsmöglichkeiten und der damit verbundene Entropiegewinn zu einer höheren Stabilität der Dekahistidin-Nickel-NTA-Bindungen im Vergleich zu Hexahistidin führt.

Für das Design der Oligohistidine lässt sich daraus ableiten, dass eine Verlängerung der Oligohistidinkette eine bessere Anbindung ergibt. Ob nun ein Tris-NTA oder ein Bis-NTA eine bessere Bindung ausbildet, ließ sich mit dieser Untersuchungsmethode nicht erklären.

Für den Fall von zwei Bindungen pro Histidin speziell bei der Bindung von Dekahistidin an Tris-NTA oder Tetrakis-NTA wird deutlich, dass hier die räumlichen Verhältnisse sehr eng werden und eine optimale topologische Anpassung zwischen Oligohistidin und NTA-Molekül notwendig ist. Außerdem muss die Bindung einen deutlichen Energievorteil bringen, da eine Mehrfachanbindung zu großen Einschränkungen der Oligohistidinkonformation führen muss und somit zu einem Entropieverlust führt.

Experimentell wurde von einem Kooperationspartner durch isothermische Kalorimetrie gezeigt, dass die Verbesserung der Bindung von Tris-NTA zu Bis-NTA (oder von Tetrakis-NTA zu Tris-NTA) ein Entropiegewinn durch zusätzliche Bindungen zwischen dem zusätzlichem Multichelatorkopf und dem Oligohistidin als treibende Kraft für die erhöhte Stabilität verantwortlich ist.^[137]

4.4 Entwicklung und Anwendung der nativen chemischen Ligation auf Oberflächen

Nachdem Erfahrungen mit verschiedenen Oberflächenderivatisierungen zeigten, dass viele unspezifische Anbindungsprozesse an die Oberflächen stattfinden können, sollte eine hochselektive Anbindungsmethode entwickelt werden, die möglichst wenig unspezifische Wechselwirkungen erlaubt. Viele Immobilisierungsmethoden stellen eine Anbindung über funktionelle Gruppen her, die sich in Proteinen und auch Peptiden häufig mehrfach finden. Somit ist selten eine spezielle Immobilisierung mit nur einer Anbindung möglich. Außerdem können manche Oberflächenderivatisierungen mehrere funktionelle Gruppen gleichzeitig binden, so dass die Chemospezifität dieser Oberflächen eingeschränkt ist.

N-terminale Cysteine kommen in Proteinen und Peptiden jedoch nur einmal vor. Somit bot sich eine Anwendung der nativen chemischen Ligation (NCL)^[155] an. Diese Kupplungsmethode wurde bisher hauptsächlich zur Synthese und Derivatisierung von Proteinen und langen Peptiden verwendet.

Die Aminosäuresequenzen aller in diesem Abschnitt eingesetzten Peptide sind in Tabelle 6.4 angegeben.

4.4.1 Peptidarrays durch Native Chemische Ligation

Die Anbindung an die Oberfläche sollte so gestaltet werden, dass die zu immobilisierende Substanz einen einfach zu verwendenden Baustein trägt. Daher sollte die Oberfläche den Thiolester, und das zu immobilisierende Polypeptid ein Cystein tragen. Somit musste eine Thiolesteroberfläche hergestellt werden. Als Grundsubstrat hierfür wurde zunächst eine Amin-funktionalisierte Oberfläche gewählt. Nachfolgend erfolgte der Aufbau des Thiolesters mit einfachen Kupplungsmethoden aus der Peptidchemie. Der Aufbau der Thiolesteroberfläche auf die Aminooberfläche erfolgte zunächst in 2 Schritten. Zuerst wurde mit Bernsteinsäureanhydrid gekuppelt und nach anschließender Aktivierung, mit Benzylmercaptan derivatisiert (Array in Abb. 4.23). Später wurde die Thiolesteroberfläche in einem Schritt durch Immobilisierung eines vorher synthetisierten Thiolesterlinkers (Abschn. 6.3.6) über seinen Aktivester auf der Amin-funktionalisierten Oberfläche hergestellt (Abb. 4.24, Arrays in Abb. 4.23-4.32).

Die Amin-funktionalisierte Oberfläche wurde dabei auf zwei verschiedene Arten hergestellt und die Resultate miteinander verglichen. In einem Fall wurde der Linker direkt

auf einem durch direkte Silanisierung mit Aminopropyltriethoxysilan hergestellten Substrat immobilisiert. Im anderen Fall wurde nach der Derivatisierung der Glasoberfläche zu einem Epoxid ein Diaminopolyethylenglykol (800) auf der Oberfläche immobilisiert (Abb. 4.24). Letztlich wurde so eine Aminoberfläche mit größerem Abstand zum Glas erhalten.

Allerdings unterscheiden sich die beiden Oberflächen in ihren Eigenschaften hinsichtlich der Adsorptivität von Peptiden und Proteinen (s.u.) und auch bezüglich ihrer Hydrophobizität. Zunächst stand die Selektivität der Oberflächenimmobilisierung im Vordergrund der Untersuchungen.

Da in dieser Arbeit Peptidmikroarrays und Small-Molecule-Mikroarrays im Fokus der Arrayentwicklung standen und der Nachweis der Immobilisierung über einfache Fluoreszenz erfolgen kann, wurden Peptide als Verbindungen für die Immobilisierung gewählt. Um die Kompatibilität mit biochemischen und biologischen Anwendungen aufzuzeigen wurden mit den Peptidarrays außerdem Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die myc-tag-Sequenz, die manche Peptide enthielten, wurde über Anti-c-myc-Primärantikörper und Alexa546 markierte Sekundärantikörper nachgewiesen. Da direkte Nachweise der chemischen Anbindung bei der Immobilisierung auf den verwendeten Oberflächen nicht zur Verfügung standen, wurden indirekte Methoden

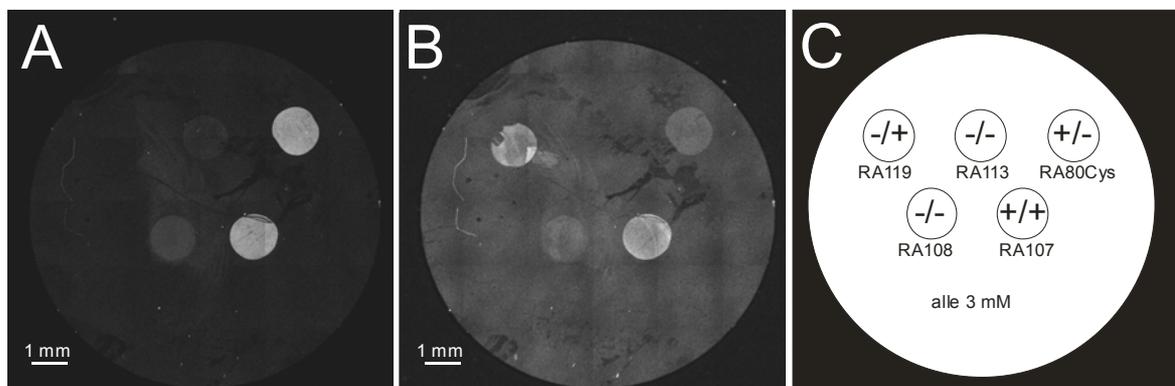


Abbildung 4.23: Spezifität der Anbindung auf einer Thiolesteroberfläche.

Mikroskopieaufnahme eines Arrays mit verschiedenen Peptiden auf einer Thiolesteroberfläche. (A) zeigt den Fluoreszenzkanal, (B) den Cy3-Kanal und (C) das Arraylayout mit den erwarteten Signalen in den beiden Fluoreszenzkanälen. Die Konzentrationen der pipettierten Lösungen waren 3 mM in Denaturierungspuffer + 1% (w/v) MESNA. Der Array wurde auf einem DG über zweistufige Herstellung der Thiolesteroberfläche hergestellt. Peptidsequenzen siehe Tabelle 6.4.

benutzt. Als Negativkontrollen dienten Peptide, die entweder eine Anbindung von vornherein verhinderten, da die Thiofunktion nicht vorhanden (z.B. RA80Ala) oder an der falschen Stelle (mitten im Peptid, RA108) positioniert war. Als weitere Negativkontrolle wurde ein Peptid eingesetzt das den S→N-Acyltransfer nicht zuließ, da der N-Terminus des Peptides acetyliert vorlag (RA113). Um auszuschließen, dass der bei diesen Peptiden verwendete Fluorophor Fluoreszein einen besonderen Einfluss auf die Anbindung hat, kam häufig auch ein unmarkiertes Peptid zum Einsatz (RA119). Es wurde über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. In Abbildung 4.18 sind die Mikroskopiebilder einer Immobilisierung solcher Peptide auf einer Thiolesteroberfläche gezeigt. Im Fluoreszeinkanal (Abb. 4.23 A) sind die hellen Spots der Peptide RA107 und RA80Cys, die ein freies N-terminales Cystein enthalten, deutlich zu sehen. Sehr schwach ausgeprägt sind die unspezifischen Signale von RA113 (mit acetyliertem Cystein) und das Signal von RA108.

Zusätzlich zum direkten Nachweis wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen

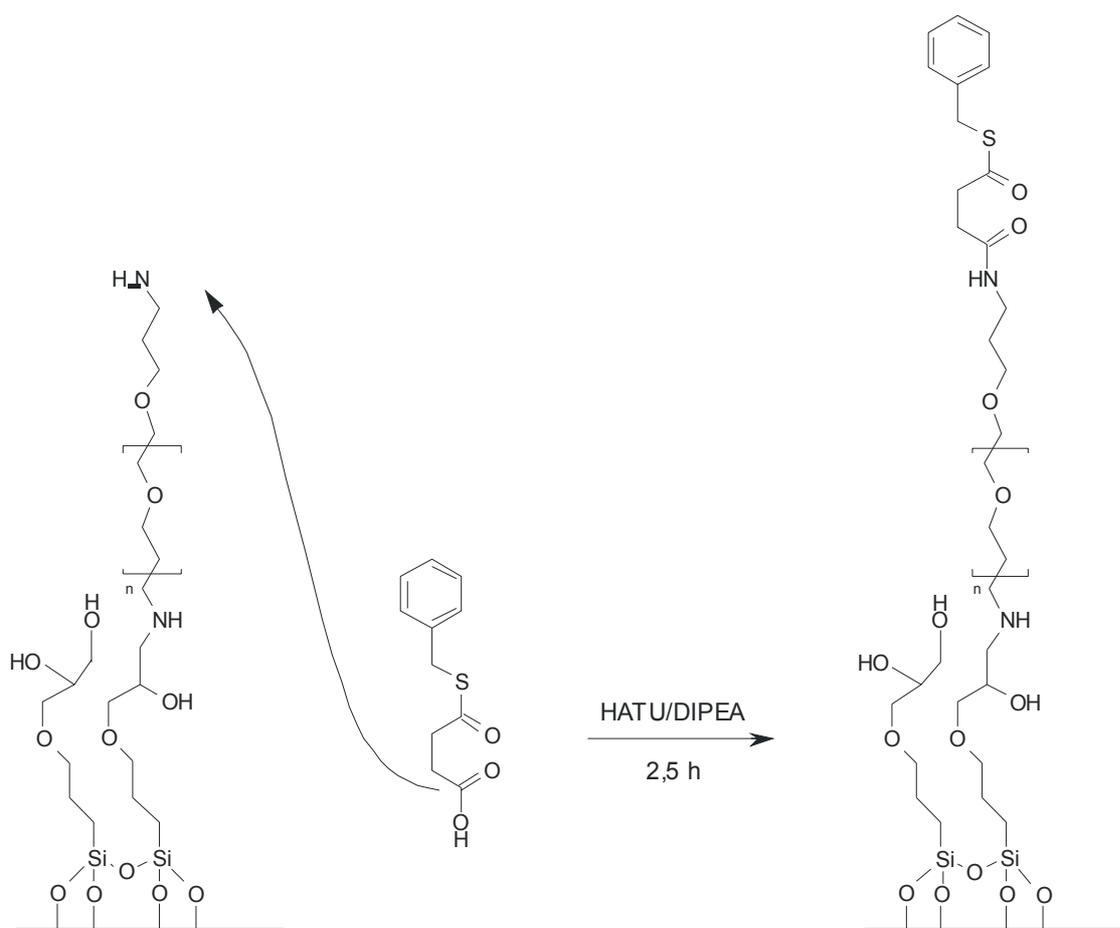


Abbildung 4.24: Derivatisierung einer aminofunktionalisierten Oberfläche zum Thiolester für die native chemische Ligation auf einer nach Abbildung 3.5 hergestellten Amino-PEG-derivatisierten Oberfläche

die myc-tag-Sequenz gerichteten anti-c-myc-Primär-Mausantikörper und einem Alexa546 markierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper durchgeführt (Abb. 4.23 B).

Neben dem hohen Hintergrund sind die spezifischen Signale der myc-tag-Peptide RA119 und RA107 neben geringen Signalen auf den Spots von RA108 und auf RA80Cys sichtbar. Offensichtlich binden nur die Peptide an die Oberfläche, die ein Cystein am N-terminus enthalten. Allerdings sind leichte unspezifische Anbindungen von RA108 und RA113 an die Oberfläche festzustellen. Das Signal des RA80Cys-Spots im Cy3-Kanal ist vermutlich durch Übersprechen des Fluoreszeins in diesen Kanal entstanden.

Zu Anfang der Entwicklung der nativen chemischen Ligation auf Oberflächen wurden,

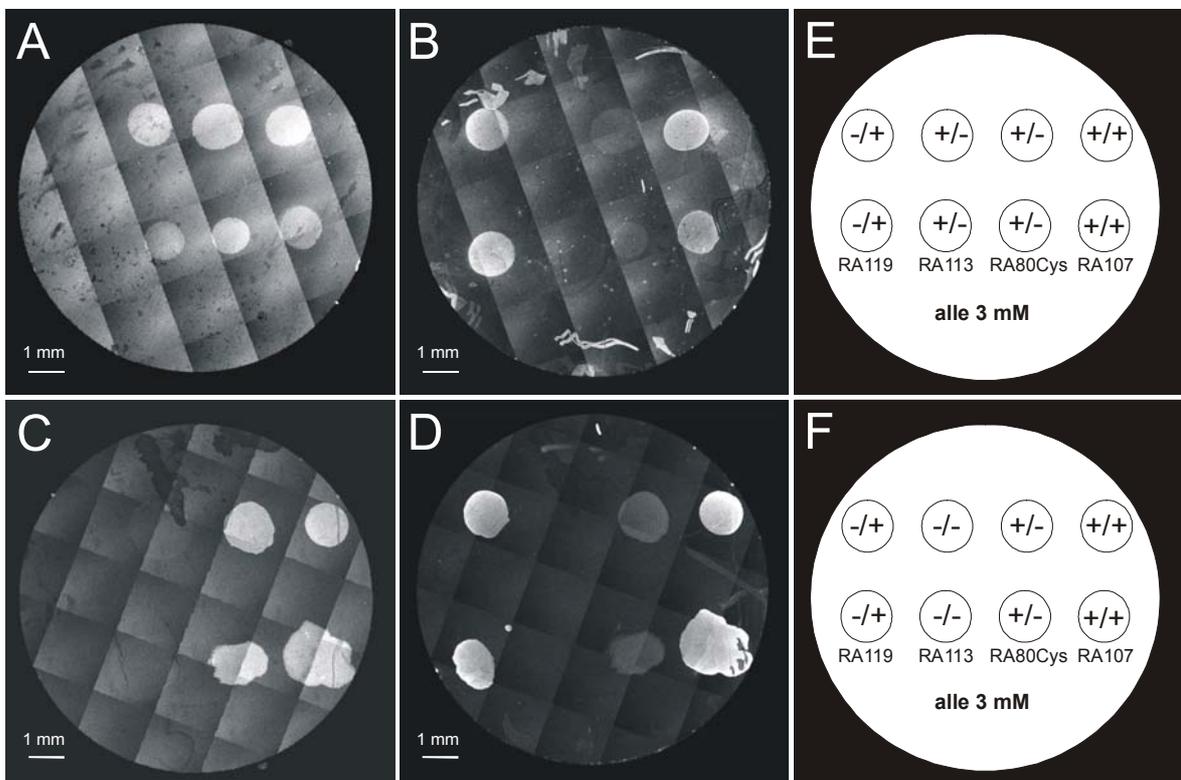


Abbildung 4.25: Vergleich zwischen Maleinimid- und Thiolesteroberfläche bei Anbindung der gleichen Peptide. (A) zeigt den Fluoreszenzkanal eines Arrays auf einer Maleinimidoberfläche. (B) zeigt den gleichen Array im Cy3-Kanal nach Immunfluoreszenzfärbung (myc-tag). (C) zeigt den im Prinzip gleichen Array auf einer Thiolesteroberfläche im Fluoreszenzkanal und (D) wiederum die Immunfluoreszenzfärbung im Cy3-Kanal. (E) (F) geben das Arraylayout und die erwarteten Signale für beide Fluoreszenzkanäle auf den DGs wieder. Die Konzentration aller Peptidlösungen war 3 mM.

analog zur Herstellung von Proteinen, konzentrierte Puffer mit einem hohen Anteil von Guanidiniumhydrochlorid und einem kleinen Anteil von MESNA (1%) zugegeben^[155]. Allerdings war MESNA nicht nötig, weil der auf der Oberfläche vorliegende Thiolester bereits eine gute Abgangsgruppe für den Thiolester austausch besaß (im Gegensatz zu denen von Ayers *et al.*^[155] und Camarero *et al.*^[179]). Auf Guanidiniumhydrochlorid konnte ebenfalls verzichtet werden, da keine Proteine denaturiert werden mussten. Zunächst wurde aber unter Beibehaltung dieser Puffer und Zusätze immobilisiert (Abb. 4.23, 4.25, 4.27-4.29). Diese ersten Arrays für die NCL wurden nicht mit einem Pipettierroboter, sondern manuell hergestellt. Daher zeigen die Abbildungen sehr große und unregelmäßige Spots. Die Peptidkonzentrationen betragen immer 3 mM.

Um die Unterschiede zu anderen Oberflächenimmobilisierungen darzustellen, wurden die gleichen Peptide auf eine maleinimidfunktionalisierte Oberfläche gebracht. In Abbildung 4.25 ist der Unterschied deutlich zu erkennen. RA113 ist auf der Maleinimidoberfläche angebunden, da das Cystein frei für eine Anbindung (durch Michael-Addition) zur Verfügung steht und der acetylierte N-terminus eine Anbindung nicht verhindert.

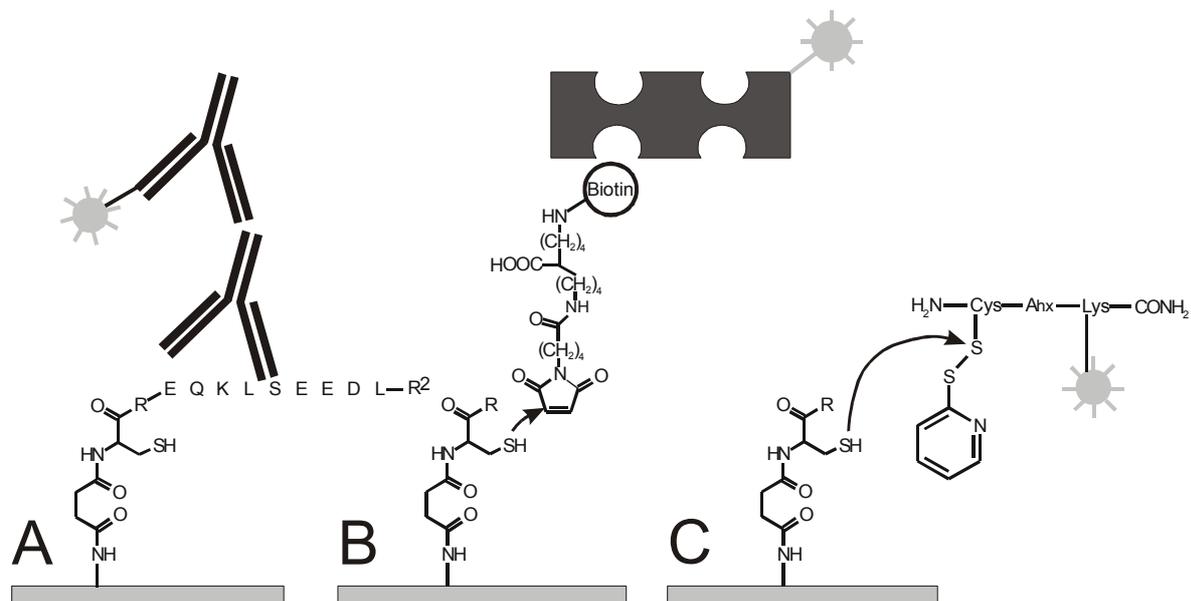


Abbildung 4.26: Prinzipien der Nachweismethoden für die angebundenen Peptide auf Thiolesteroberflächen außer der direkten Fluoreszenz. Immunfluoreszenzfärbung (A) gegen Myc-tag-Sequenz über Primär- und Sekundärantikörper bei entsprechenden Peptiden. (B) Nachweis des Thiols über ein Maleimidobiotin-Streptavidin-System. (C) Nachweis des Thiols über eine Disulfidbrücke mit einem fluoreszenten Peptid.

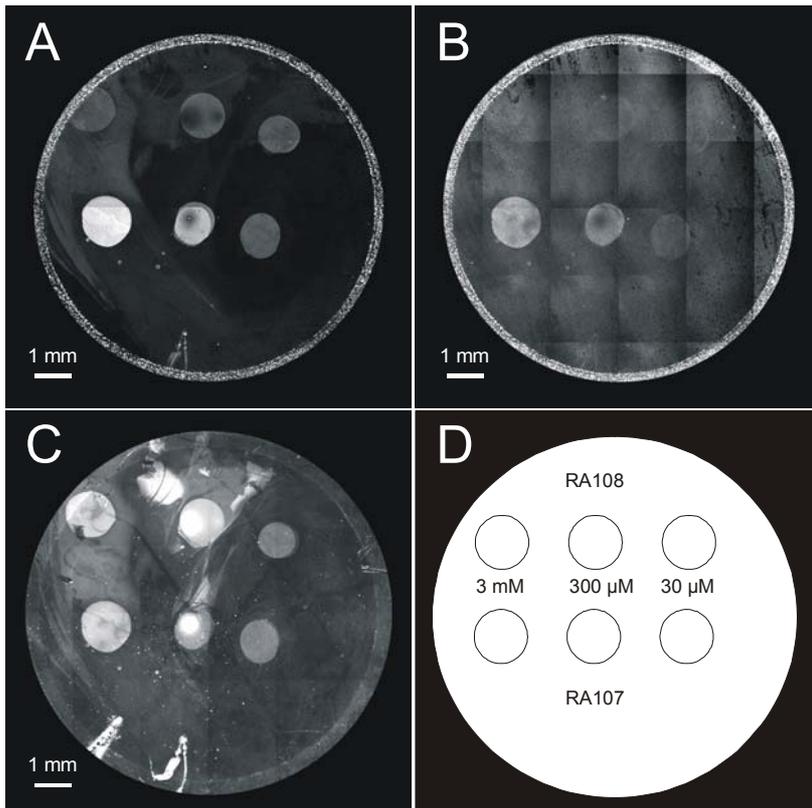


Abbildung 4.27: Abhängigkeit der Signalintensität von der Oberflächendichte über eine Konzentrationsreihe zweier Peptide auf Thiolesteroberflächen nach Immunfluoreszenzfärbung und Maleimidobiocytin-Färbung mit Alexa633-Streptavidin. Die Peptide RA108 (ohne N-terminales Cystein) und RA107 (mit N-terminalem Cystein) sind beide mit Fluoreszein markiert. (A) zeigt den Fluoreszeinkanal, (B) die Immunfluoreszenzfärbung im Cy3-Kanal (myc-tag), (C) die Fluoreszenz im Cy5-Kanal (Alexa633) und (D) gibt das Arraylayout wieder.

4.4.2 Nachweise der Thiofunktion nach S→N-Acyltransfer

Ein interessanter Aspekt der nativen chemischen Ligation, und ein weiterer Beweis für eine Immobilisierung über einen S→N-Acyltransfer, ist die Tatsache, dass die Thiofunktion des Cysteins wieder frei wird. Falls sie nach dem Transfer nicht oxidiert vorliegt, sollte diese nachweisbar sein. Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um das freie Thiol auf der Oberfläche nachzuweisen. Alle Nachweismethoden für die Anbindung und Funktionalität der Peptide auf den Oberflächen, außer der direkten Fluoreszenz der Peptide, sind in Abbildung 4.26 schematisch dargestellt.

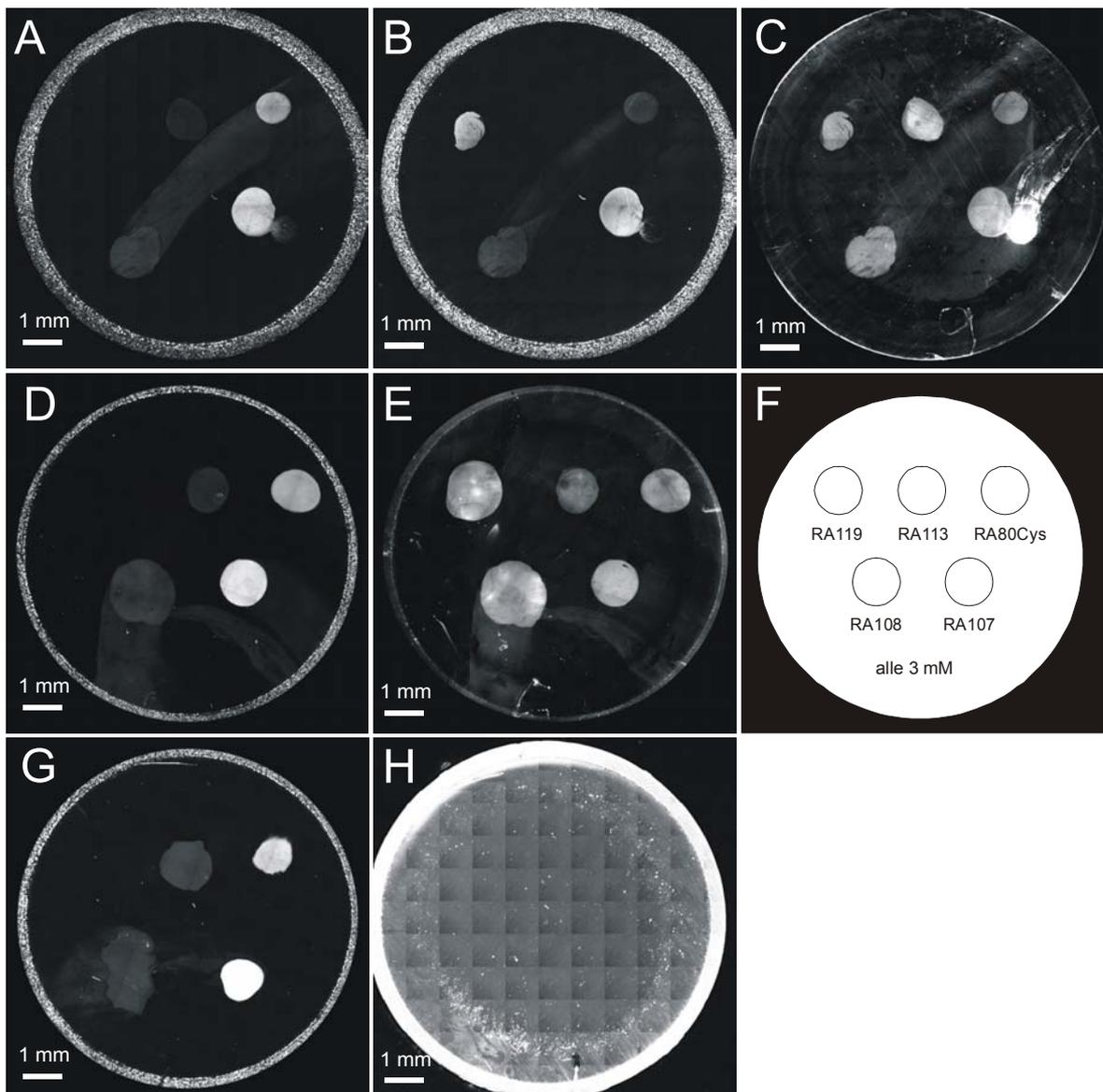


Abbildung 4.28: Untersuchung der Unabhängigkeit des Thioldnachweises von der Immunfluoreszenzfärbung durch Einzelexperimente. Fluoreszenzaufnahmen von drei gleichen Peptidarrays (Array 1: (A-C); Array 2: (D,E); Array 3: (G,H)) auf Thiolesteroberflächen. Der erste Array (A-C) wurde erst mit Maleimidobiocytin inkubiert, dann einer Immunfluoreszenzfärbung gegen die myc-tag-Sequenz unterzogen und nachfolgend mit Alexa633-Streptavidin gefärbt. Der zweite Array (D,E) wurde nur mit Maleimidobiocytin inkubiert und mit Alexa633-Streptavidin gefärbt. Der dritte Array wurde ohne Immunfluoreszenzfärbung und ohne Maleimidobiocytin nur mit Alexa633-Streptavidin inkubiert. (A,D,G): Fluoreszenzeinkanal (=Kontrolle der Anbindung). (B): Cy3-Kanal (=myc-tag). (C,E,H): Cy5-Kanal (=Maleimido-biocytyl). (F): Arraylayout aller drei Arrays. Die Arrays wurden auf DGs über den Thiolesterlinker RA220 auf AminoPEG(800)-Oberflächen hergestellt.

Zunächst wurde versucht das Thiol über ein biotinyliertes Maleinimid und nachfolgender Inkubation mit fluoreszent markiertem Streptavidin nachzuweisen (Abb. 4.27 und 4.28). Dieser Nachweis war jedoch nur manchmal positiv, fast immer unspezifisch und selten reproduzierbar. Auch vorherige Reduktion mit DTT führte zu keiner Veränderung. Meistens waren alle Peptidspots gefärbt, unabhängig davon, ob eine Anbindung stattfand, oder ob nur Spuren von unspezifisch angebondenen Peptiden auf der Oberfläche vorhanden waren (Abb. 4.27C, 4.28 C). Mitunter wurde auch der komplette Hintergrund mit Ausnahme der Peptidspots stark angefärbt (ohne Abb.). Streptavidin alleine zeigte keine unspezifische Anbindung an die Peptide (Abb. 4.28 H). Auch war es irrelevant, ob der Array vor der Streptavidininkubation noch einer Immunfluoreszenzfärbung gegen die myc-tag-Sequenz unterzogen wurde (Abb. 4.27 C, 4.28 C) oder nicht (Abb. 4.28 E). Zusätzlich wurde eine Konzentrationsreihe der Spotlösungen ausgetestet (Abbildung 4.27), um den Einfluss von Fluoreszenzquenching auszuschließen. RA108 (ohne N-terminales Cystein) zeigte eine geringe unspezifische Anbindung ohne Helligkeitsgradient an die Oberfläche. Das Konzentrationsgefälle auf der Oberfläche wird durch die Primärfluoreszenz und die Immunfluoreszenzfärbung von RA107 gut wiedergegeben. Es ist auch abgeschwächt bei der sehr deutlichen Fluoreszenz durch die Alexa633-Streptavidinanbindung sichtbar. Aber auch hier waren die Peptidspots von RA108 selbst nach langem Waschen immer noch durch Alexa633-Streptavidin angefärbt obwohl sie nicht gefärbt sein sollten (Abb. 4.27 C). Nach Abschluss aller dieser Testreihen wurde angenommen dass der Nachweis des frei gewordenen Thiols über Maleimidobioctin versagt.

Da die Anbindung mit Maleimidobioctin nicht spezifisch war, wurde eine andere Nachweismöglichkeit für das Thiol des angebondenen Cysteinpeptids gesucht. Dazu wurde ein kurzes, S0387-markiertes cysteinhaltiges Peptid (TA42) synthetisiert, das über eine Thiopyridingruppe am Thiol des Cysteinrestes verfügt (Tab. 6.3). Durch Tausch des Thiopyridins gegen die an den Peptiden auf der Oberfläche wieder frei gewordenen Thiolgruppen der Cysteinreste sollte TA42 spezifisch an die Peptidspots binden. Um sicherzustellen, dass die Cysteinreste auf der Oberfläche nicht oxidiert vorlagen, wurde in manchen Versuchsreihen vorher mit DTT reduziert (Abb. 4.22 D,E).

Nach der Inkubation mit TA42 war für gewöhnlich die gesamte Oberfläche (unspezifisch) gefärbt, dabei stellte sich der Hintergrund teilweise heller gefärbt als die Peptidspots selbst dar. Da längere Peptide die Oberfläche abschirmen könnten und um eventuelle andere Effekte auszuschließen, die mit den Eigenschaften der immobilisierten Peptide in

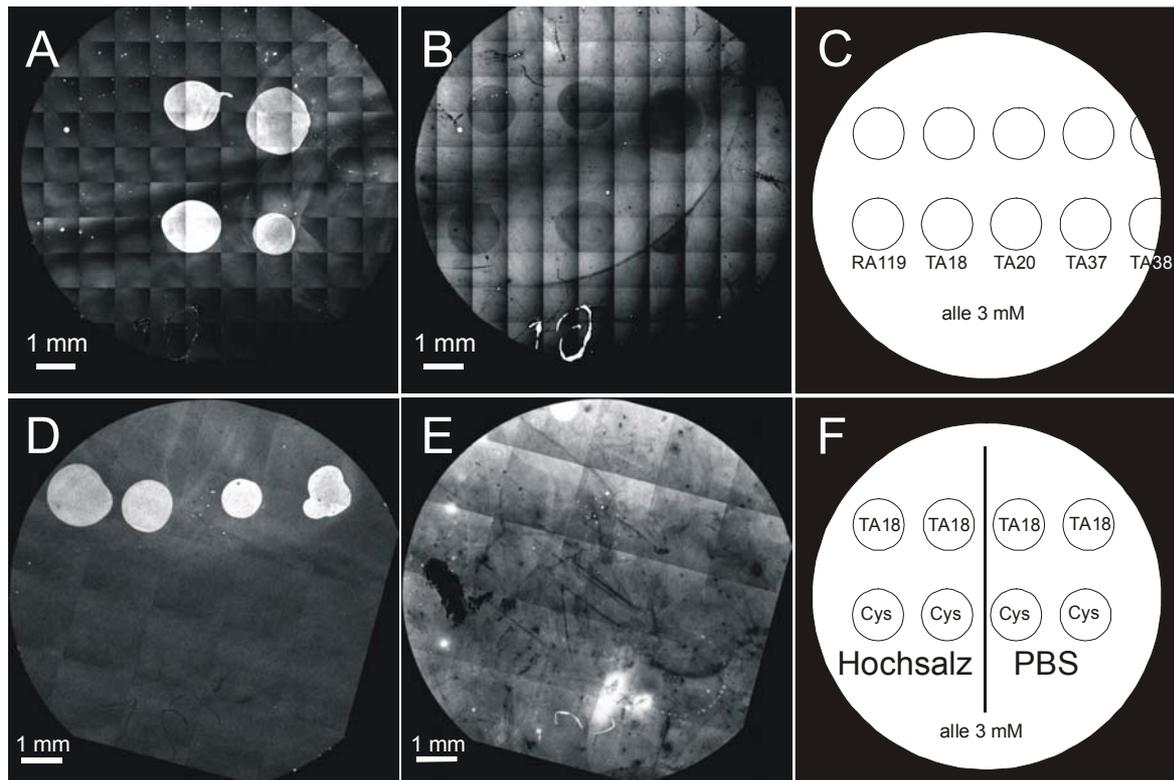


Abbildung 4.29: Versuche zum Nachweis des frei gewordenen Thiols mit Hilfe des Peptides TA42. Fluoreszenzaufnahmen zweier Fluoreszenzkanäle von zwei Peptidarrays auf DGs. Auf dem ersten Array (A-C) wurden mehrere Peptide für 16 h auf Thiolesteroberflächen immobilisiert und anschließend mit TA42 für 15 min inkubiert. Auf dem zweiten Array (D-F) wurden Peptid und freies Cystein für 16 h immobilisiert, mit DTT (10 mM in PBS) reduziert und anschließend mit TA42 für 15 min inkubiert. Dabei wurden Hochsalzpuffer und PBS-Puffer verwendet. (A,D): Fluoreszeinkanal; (B,E): Cy5-Kanal (=TA42); (C,F): Arraylayout.

Verbindung mit TA42 auftraten, wurde auch nur die Aminosäure Cystein auf der Oberfläche immobilisiert.

Durch die Verwendung dieses kleinen Bausteins sollte eine mögliche sterische Abschirmung des Thiols auf der Oberfläche minimiert werden. Zusätzlich wurde PBS mit den bisher verwendeten Hochsalzpuffern für die Peptidlösungen verwendet (Abb.4.29 D,E), ein organisches Lösungsmittel (DMF) für die Inkubationslösung von TA42 verwendet und die Inkubationszeiten variiert. Bei längerer Inkubation mit TA42 (bis zu 16 h) färbte sich der Hintergrund stärker, jedoch kein Peptidspot. Die Helligkeit des Hintergrundes ließ sich für gewöhnlich durch intensives Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln wieder verringern. Falls die Spots dunkler blieben, so war dieser Effekt für

alle Spots einheitlich. Auch erschienen die Spots von Peptiden, die nicht angebunden hatten, dunkler als der Hintergrund. Gleiches war für reine Pufferspots zu beobachten. Nach der Inkubation mit TA42 reduzierte sich die Fluoreszeinfluoreszenz der angebundenen fluoreszent markierten Peptide. Mit nachfolgendem Waschen wurden die Peptidspots jedoch wieder heller. In keinem der Fälle ließ sich das Thiol auf chemischem Wege auf der Oberfläche reproduzierbar nachweisen. Weil jedoch alle anderen Positiv- und Negativkontrollen funktioniert hatten, wurde diese Immobilisierungstrategie weiter untersucht.

Da der Hintergrund bei dieser Immobilisierungsmethode häufiger unbefriedigend hoch ausfiel, wurde die Oberflächenchemie etwas verändert. Dabei wurde das gereinigte Glas zunächst mit GOPTS funktionalisiert^[117] und nachfolgend mit Diaminopolyethylenglykol (800) weiterbehandelt^[180]. Die dabei erhaltene Aminooberfläche wurde nun mit Hilfe des Linkers RA220 in einen Thiolester umgewandelt (Abb. 4.28). Um die Immobilisierungsmethode kompatibel zu einem Nanopipettier-Roboter zu machen, mussten die Zusammensetzungen der Spotlösungen geändert werden. Die Verwendung eines Hochsalzpuffers hätte an den Pipetten beim Antrocknen zu Problemen führen können. Außerdem sind derart hochkonzentrierte Puffer mit den Pipetten schwieriger zu dosieren. Wie bereits in Abbildung 4.29 D und E gezeigt, konnten bei Verwendung von Peptidlösungen mit PBS anstatt mit Hochsalzpuffer gleiche Ergebnisse im Hinblick auf die Spotqualität erhalten werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Peptide in PBS-Puffer

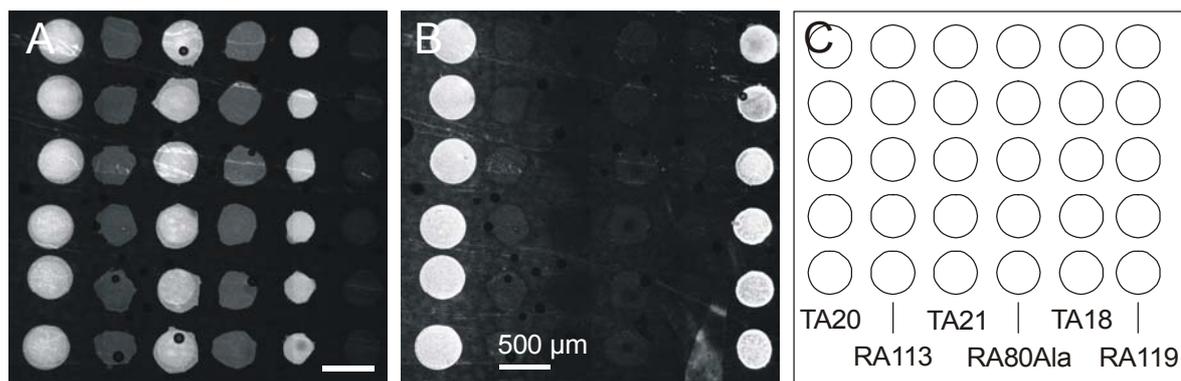


Abbildung 4.30: Mit Nanopipettierer hergestellter Peptidarray (3 h Inkubationszeit) auf Polyethylenglykol-Thiolesteroberfläche nach einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Myc-tag-Peptide. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurde der Array mit Top-Block (1%) gegen unspezifische Anbindung geblockt. Aufnahmen nach dem Waschen mit Wasser, Aceton und DMF. (A) zeigt den Fluoreszeinkanal, (B) den Cy3-Kanal (Immunfluoreszenzfärbung), (C) gibt das Arraylayout wieder. Alle Peptide wurden mit einer Konzentration von 3 mM in PBS pipettiert.

und der absoluten Notwendigkeit von homogenen Lösungen bei der Nutzung mit einem Nanopipettier-Roboter bestand ein Drittel der Lösungen aus Dimethylformamid. Das bedeutete, dass die Spots etwas größer ausfallen würden, als im Falle von reinem PBS-Puffer. Außerdem tendieren Flüssigkeiten mit hohem DMF-Anteil dazu sich etwas unregelmäßiger auf der Oberfläche zu verteilen. Die Reaktionszeit der Peptide auf den Oberflächen wurde auf drei Stunden ohne sichtbare Verschlechterung verkürzt. Trotz des ausführlichen Waschens mit Wasser, Aceton und DMF in einem Ultraschallbad (jeweils 30 min) war die Fluoreszeinfluoreszenz der Negativkontrollen immer noch leicht sichtbar (Abb. 4.30 A). Ansonsten war das Hintergrundsignal im Vergleich zu den Peptidspotsignalen sowohl im Fluoreszeinkanal als auch im Cy3-Kanal nach der Immunfluoreszenzfärbung zufriedenstellend gering. RA119 zeigte bei Immunfluoreszenzfärbung im Cy3-Kanal eine etwas geringere Intensität als TA20, was seinen Grund in der durch Einwaage eingestellten Konzentration der Pipettierlösung haben kann. Durch verbesserte Waschprotokolle konnte die Helligkeit der Negativkontrollen weiter verringert werden (Abb. 4.31). Anstatt Wasser wurde PBS als Waschagens verwendet und bei Waschschrinen zunächst mit organischen Lösungsmitteln gearbeitet. Zusätzlich wurde Acetonitril (0,1 % TFA) als Waschagens verwendet, so dass Lösungsmittel mit verschiedenster Polarität zum Einsatz kamen.

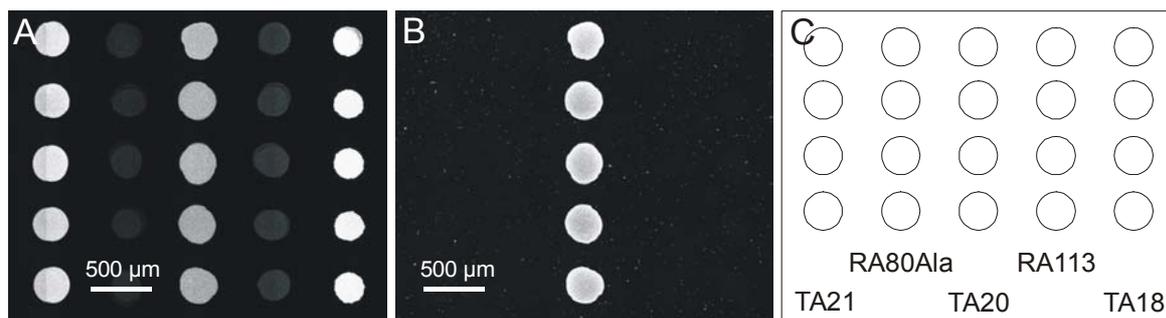


Abbildung 4.31: Einsatz verbesserter Waschprotokolle zur Minimierung der Signale der Negativkontrollen. Array hergestellt wie in Abb. 4.30 (ohne RA119) nach Immunfluoreszenzfärbung gegen myc-tag-Sequenz. (A) Fluoreszeinkanal. (B) Cy3-Kanal (=myc-tag). (C) Arraylayout.

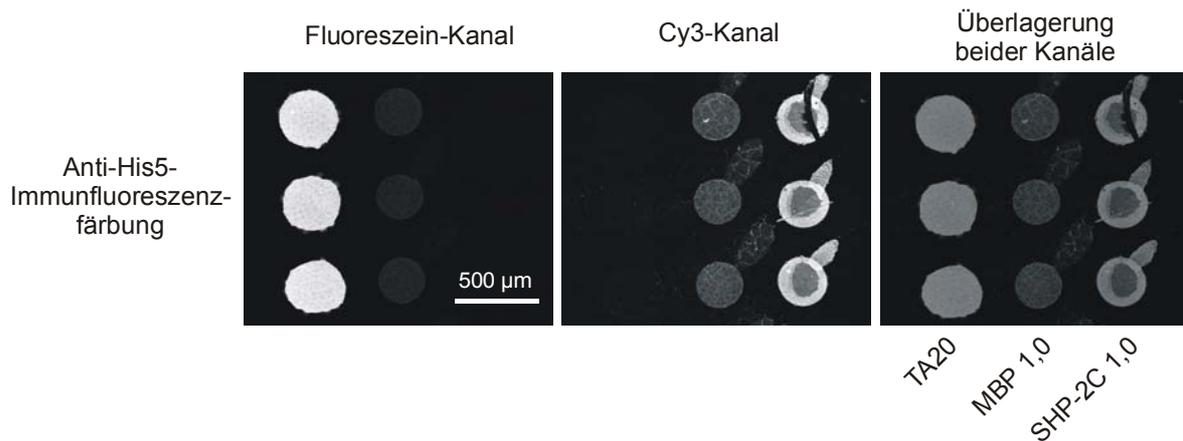


Abbildung 4.32: Nachweis und Negativkontrolle für die spezifische Anbindung von SHP-2C mit Immunfluoreszenzfärbung. Mikroskopieaufnahmen nach Anti-His5-Primärantikörper (Maus) und Ziege-anti-Maus-Alexa546-Antikörper im Fluoreszein und Cy3-Kanal. Beide Proteine wurden aus einer Lösung mit 1 mg/ml pipettiert.

4.4.3 Proteinarrays durch Native Chemische Ligation

Neben den Peptidarrays, die im Fokus der Entwicklung dieser Immobilisierungsmethode standen, wurde auf den Thiolesteroberflächen auch die Aktivität von funktionellen Proteinen untersucht. Hierzu wurde das Protein SHP-2C (freundlicherweise bereitgestellt von Manuel Baca, Ph.D., Victoria, Australien) in seine native Konformation gebracht und in einer Konzentration von 0,5 mg/ml oder 1 mg/ml auf die Thiolesteroberflächen pipettiert. Das Protein stellt einen Ausschnitt aus der Tyrosin-Protein Phosphatase SHP-2 dar. Als Maßstab für die Aktivität des Proteins diente die Affinität bestimmter Peptide. Zunächst wurde getestet, inwieweit das Protein überhaupt an die Oberfläche anbindet, und ob dies spezifisch geschieht.

Da das Protein nicht in seinen verschiedenen Varianten zur Verfügung stand, z.B. mit N-terminalem Alanin anstatt Cystein, oder mit acetyliertem N-Terminus, wurde als einfache Kontrolle das Protein Fluo-MBP-His₁₄ als Kontrollprotein auf die Oberfläche pipettiert. Da es über kein Cystein verfügt, sollte nur unspezifische Anbindung sichtbar sein, was über die direkte Fluoreszenz des Proteins nachgewiesen wurde. Für den Nachweis beider Proteine (MBP und SHP-2C) auf der Oberfläche wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-His₅-Antikörper durchgeführt (Abb. 4.32), da auch SHP-2C mit einem His₆-tag versehen war. MBP ist nach einfachem Waschen mit Puffer und Detergenz (0,1% Tween20) besonders im Cy3-Kanal noch schwach sichtbar. Waschprotokolle unter

Verwendung organischer Lösungsmitteln waren nicht möglich, da die Proteine denaturieren würden. Eine Erklärung für die Helligkeit der Spots im Cy3-Kanal könnte sein, dass bei Verwendung des Maus Anti-His₅-Antikörpers mehrere Primärantikörper und somit durchschnittlich auch mehr Sekundärantikörper anbinden, da das MBP-Protein über ein His₁₄-tag verfügte. Daher könnten die Spots heller erscheinen, als es ihrer tatsächlichen Dichte auf der Oberfläche im Vergleich zu SHP-2C entspräche.

Nachdem die spezifische Anbindung des Proteins mittels Immunfluoreszenz gezeigt wurde, sollte ein weiterer Nachweis zur Kompatibilität der Oberfläche mit spezifischeren und weniger affinen Wechselwirkungen durchgeführt werden. Hierzu diente die Spezifität bestimmter Phosphopeptide zur Anbindung an die SH2-Domäne des Proteins SHP-2C.

Bei den Peptiden handelte es sich um S0387-markierte phosphorylierte und nichtphosphorylierte Peptide (KK80, TA54, TA55), die im phosphorylierten Zustand spezifisch an die SH2-Domäne des Proteins anbinden sollten. Die Peptide TA54 und TA55 enthalten eine Sequenz aus der Cytokinrezeptor Untereinheit gp130 um die Aminosäure Y757.^[73,181] Die Aminosäuresequenz des Peptides KK80 stammt aus dem Protein siglec-7 aus der Immunoglobulin-Superfamilie um die Aminosäure Y437.^[182] Ließ man das Protein nach dem Spotvorgang und einer Inkubationszeit von drei Stunden völlig eintrocknen und spülte den Array gut ab, konnte keine Anbindung dieser Peptide festgestellt werden. Da allerdings Tropfen und im Mikroskop auch Spots auf der Oberfläche zu sehen waren, die sich vom Hintergrund etwas abhoben, konnte daraus geschlossen werden, dass zwar Material auf die Oberfläche übertragen wurde, sich jedoch keine Aktivität zeigte. Die Nachweise für die aktive Konformation auf der Oberfläche sind in Abbildung 4.33 gezeigt. Bei hohen Konzentrationen dieser Peptide (im mikromolaren Bereich) war es irrelevant, ob die Peptide in phosphoryliertem oder nichtphosphoryliertem Zustand vorlagen (Abb. 4.34). Die Affinität war stets hoch genug um anzubinden. Bei Konzentrationen im oberen nanomolaren Bereich zeigte sich jedoch der Unterschied zwischen phosphoryliert und nichtphosphoryliert.^[183]

Um zunächst den Unterschied zwischen denaturiertem und nichtdenaturiertem Protein auf der Oberfläche zu zeigen, wurde ein Array direkt nach dem Pipettieren getrocknet, mit einem organischen Lösungsmittel (DMF) gewaschen und zwei Tage aufbewahrt. Abbildung 4.33 zeigt, wie sich die Denaturierung von SHP-2C auf die Erkennung des Phosphopeptides KK80 auswirkte. Das Protein wurde mit gleichen Konzentrationen pipettiert und mit dem gleichen Phosphopeptid (in mikromolarer Konzentration) inkubiert. Der Array aus Abbildung 4.33 A zeigt das denaturierte Protein. Das Phosphopeptid KK80

wurde nicht an das Protein angebunden sondern eher abgestoßen. Falls der Array jedoch nicht getrocknet, sondern feucht gehalten und mit PBS (0,1% Tween20) anstatt eines organischen Lösungsmittels gewaschen wurde, wurde das Phosphopeptid durch das Protein auf der Oberfläche gebunden (Abb. 4.33 B).

Nun sollte noch die Spezifität des Proteins durch die Differenzierung von phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Peptid auf der Oberfläche bewiesen werden. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen (100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM) von TA54 und TA55 auf Peptid/Proteinarrays inkubiert, drei Mal gewaschen und in feuchtem Zustand mit Puffer über dem Mikroarray mikroskopiert. Bis zu einer Konzentration im oberen nanomolaren Bereich wurde das Phosphopeptid TA54 selektiv von der SH2-Domäne des Proteins erkannt. Das nichtphosphorylierte Peptid TA55 mit der ansonsten gleichen Aminosäuresequenz wurde hingegen nicht angebunden (Abb. 4.34 A). Unterhalb von 250 nM war Detektion aufgrund der schnellen On-Off-Rate und der niedrigen Bindungskonstante im unteren mikromolaren Bereich nicht eindeutig.^[183] Ab einer Peptidkonzentration von 500 nM war bei hoher Verstärkung des Signals bereits ein schwaches Signal des nichtphosphorylierten Peptides zu erkennen (Abb. 4.34 B Cy5-Kanal). Bei höheren Konzentrationen oberhalb von 1 µM wurden beide Peptide in etwa gleich gut von SHP-2C erkannt. Abbildung 4.34 C zeigt das Ergebnis nach der Inkubation mit einer Peptidkonzentration von 5 µM. Die Konzentrationsunterschiede der pipettierten Proteine (Abb. 4.34 A und B) wurde nur bedingt wiedergegeben. Möglicherweise bindet besonders bei höheren Proteinkonzentrationen nicht die gesamte pipettierte Menge des Proteins an die Oberfläche an.

Zusammenfassend zeigte die Immobilisierungsmethode durch die native chemische Ligation auf Oberflächen ein sehr selektives Anbindungsverhalten, speziell im Zusammenhang mit kleineren Molekülen. Der in der Literatur noch nie beschriebene Nachweis der bei der Anbindung freiwerdenden Thiofunktion konnte ebenfalls nicht erbracht werden. Jedoch konnte unter Verwendung von Peptiden mit vielen, so bisher noch nicht beschriebenen, sehr spezifischen Negativ- und Positivkontrollen, die exakte Chemoselektivität der Anbindung zwischen dem auf der Oberfläche vorliegenden Thiolester und einem N-terminalen Cystein mit seinem freien N-Terminus gezeigt werden. Die Gründe für die fehlende Nachweisbarkeit der Thiofunktion bleiben unbekannt. Es könnte beispielsweise daran liegen, dass das Thiol selbst bei kleinen Molekülen bereits sterisch zu gut abgeschirmt wird, oder dass es nach der Umlagerung durch einen weiteren Thiolester austausch mit einer Nachbargruppe nicht mehr zur Verfügung steht, obwohl

diese Reaktion reversibel ist. Die Kompatibilität von Thiolesteroberflächen zu physiologischen Assaysystemen, die bis dahin noch nicht gezeigt war, konnte durch die spezifische Immobilisierung eines funktionellen und konformationell intakten Proteins auf einer Thiolesteroberfläche und dessen selektive Erkennung eines Phosphopeptides durch seine SH2-Domäne gezeigt werden.

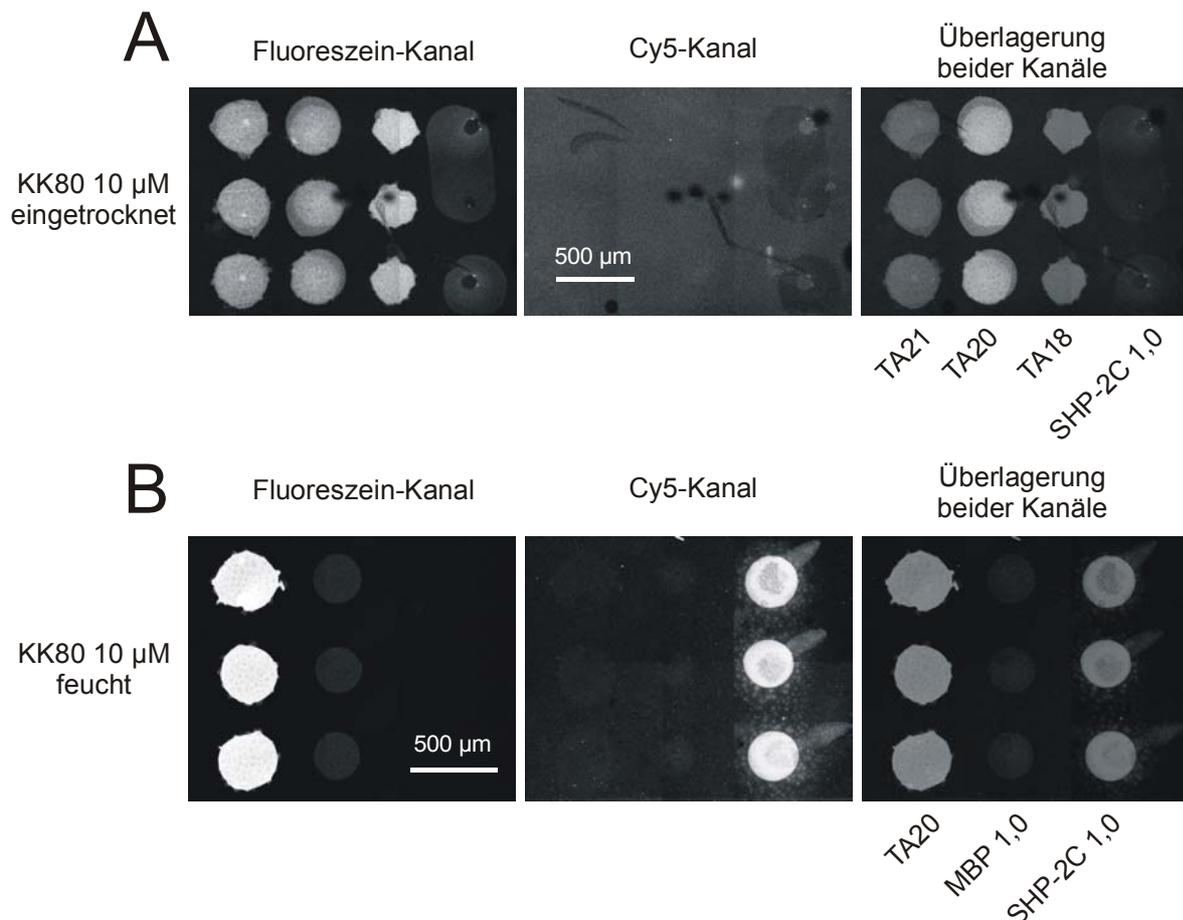


Abbildung 4.33: Nachweis für die Spezifität der Anbindung von KK80 bei denaturiertem (A) und nichtdenaturiertem (B) SHP-2C. (A) Array (ohne MBP, aber mit zusätzlichen Peptiden) wurde nach 3 h Inkubation getrocknet, mit DMF gespült und anschließend wieder getrocknet. Im Cy5-Kanal ist das Ergebnis nach Inkubation mit dem Phosphopeptid KK80 (10 µM) gezeigt. (B) Array wurde nach 3 h Inkubation 5x mit PBS (0,1% Tween20) gespült und mit KK80 (10 µM) inkubiert. Der Cy5-Kanal zeigt das durch KK80 erhaltene Signal. Peptide wurden aus Lösungen mit 3 mM, Proteine aus Lösungen mit 1 mg/ml pipettiert.

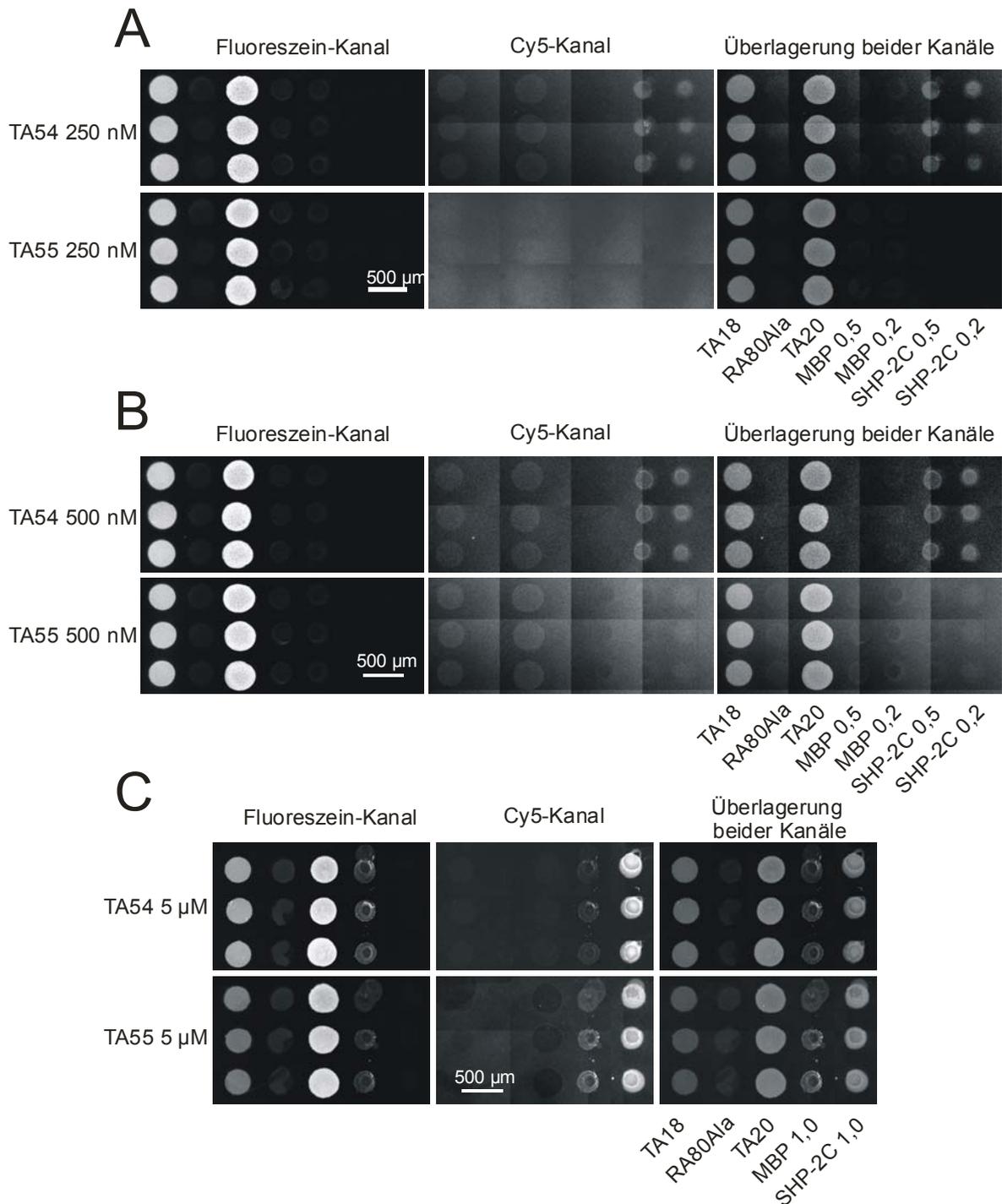


Abbildung 4.34: Spezifität in Abhängigkeit von der Konzentration der Phosphopeptide. Inkubation von Peptid/Proteinarrays mit unterschiedlichen Konzentrationen (250 nM, 500 nM, 5 μM) von TA54 und TA55. Die Proteine wurden zur Herstellung der Arrays in den angegebenen Konzentrationen pipettiert [mg/ml], Peptide immer mit 3 mM. (A) und (B) wurden auf einem Glassubstrat erstellt (gleiches Arraylayout), (C) entstand auf einem anderen Glassubstrat. Die Aufnahmeparameter wurden so gewählt, dass in den Fluoreszenzkanälen die hellsten Signale die maximal mögliche Signalintensität besaßen.

4.5 Pipettieren auf Cantileverarrays mit Hilfe eines Nanopipettier-Roboters

Ein weiteres Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Beschichtung von Mikrocantilever zu erleichtern und eine individuelle Beschichtung der einzelnen Cantilever mit Hilfe eines Nanopipettier-Roboters zu erreichen. Dazu wurde auf Vorarbeiten von O.Mader^[68,100] zurückgegriffen und auf das dort eingesetzte molekulare Erkennungssystem (Peptid/Antikörper) übernommen.

Die Bedingung für eine erfolgreiche Immobilisierung des eingesetzten myc-tag-Peptides (OM-P18, Tab. 6.3) auf Cantileverarrays war, dass der funktionalisierte Cantilever und der nichtfunktionalisierte Referenzcantilever direkt nebeneinander liegen, da das Messprinzip auf der unterschiedlichen Verbiegung von Referenzcantilever und Messcantilever bei Zugabe der Analytlösung beruht. Daher musste der Nanopipettier-Roboter sehr kleine Tropfen abgeben, die möglichst genau die einzelnen Cantilever treffen sollten. Deshalb wurde die kleinste für diesen Nanopipettier-Roboter erhältliche Pipette gewählt, die für wässrige Lösungsmittel Tropfen mit einem Volumen von 150 pl abgeben kann.

Diese Tropfengröße machte einen Wechsel des Lösungsmittels zu weniger flüchtigen Lösungsmitteln im Vergleich zu Hak *et al.*^[100] nötig (ACN/H₂O), da nur so eine Inkubationszeit von mehreren Stunden gewährleistet werden konnte. Als Lösungsmittel wurde der vollständig flüchtige Puffer NH₄Ac (10 mM, pH = 7,3) gewählt. Aus Gründen der Löslichkeit des Peptides lag der DMF-Anteil der Pipettierlösung bei 30 Prozent.

Der Nanopipettier-Roboter verfügte über ein Zusatzmodul für eine programmierbare Chiperkennung, so dass eine Automatisierung des Pipettierens möglich gewesen wäre. Aufgrund des anfänglich immer wieder wechselnden Designs der Cantileverarrays und der bevorzugten größeren Freiheit bei der Wahl der Spots, wurde auf diese Funktion verzichtet. Auch das manuelle Ausführen der Spotlayouts war keine Standardfunktion und musste deshalb leicht modifiziert werden.

Ein wichtiges Kriterium für erfolgreiches Pipettieren auf die Cantilever war die gewählte Stärke, Breite und Länge der Cantilever. Die Tropfen konnten durch ihren Impuls die Cantilever beim Aufschlagen gegen die Wandung nach unten drücken. Dabei bestand die Gefahr, dass die Cantilever an der Wandung festkleben und sich nicht mehr lösen, wie in Abbildung 4.35 B bei dem Cantilever auf der rechten Seite zu sehen ist. Außerdem war dabei bei einem Festkleben der Cantilever an die Wandung die Wahrscheinlichkeit groß,

dass die Cantilever unvollständig von der Flüssigkeit bedeckt wurden, und damit unvollständig beschichtet waren. Der rechte Cantilever aus Abbildung 4.35 B war deshalb nach der Immunfluoreszenzfärbung nur an wenigen Stellen schwach fluoreszent. Daher wurden die Cantilever immer von hinten nach vorne bespottet und umgebogene Cantilever bei der Spotkontrolle notiert.

Außerdem musste das Layout des Cantileverarrays an die Fähigkeiten des Roboters angepasst und dazu die Abstände zwischen den Cantilevern von 20 μm auf 50 μm vergrößert werden (im Vergleich zu Hak *et al.*^[100]).

Die Cantileverarrays wurden in ausgeätzten Quadraten mit 1 mm Kantenlänge hergestellt. In jedem Fenster befanden sich neun Cantilever. Die einzelnen Cantilever hatten eine Breite von 50 μm bei einer Länge von 240 μm , der Abstand zwischen ihnen betrug 50 μm . Die Dicke der Cantilever (SiN_x -Schicht) lag bei 500 nm, die der darauf aufgedampften Goldschicht war 30 nm.

Die Erstellung des Spotlayouts erfolgte manuell mit Hilfe der am Nanopipettier-Roboter vorhandenen Mikroskopkamera (Abb. 4.35 A). Der Versatz in X- und Y-Richtung zwischen Mikroskopkamera und Pico-Tip musste nach einer groben Einstellung bei jedem Pipettieren nochmals über eine Tropfenerkennung genauestens ermittelt werden. Dies wurde erreicht, indem zunächst die Kamera über das Zielgebiet, in den ein Tropfen abgegeben werden sollte, gefahren und das Bild von der Software erfasst wurde. Dann wurde ein Testtropfen im Zielgebiet abgegeben, und anschließend wieder die Kamera über das Zielgebiet gefahren. Das Bilderkennungsprogramm konnte nun diesen Tropfen erkennen und unter Berücksichtigung des Fahrweges den genauen Versatz zwischen Kamera und Pipette errechnen. Da die Tropfen auf den Goldoberflächen nur einen geringen Kontrast erzeugten, mussten dafür die Filterparameter der Bilderkennungssoftware angepasst werden.

Das für die Tropfenerkennung und Versatzberechnung verwendete Nanoplotter-Programm „WSP-check.npl“ wurde leicht verändert. Der Messtropfen wurde immer direkt neben den zu pipettierenden Array mit möglichst gleichem Abstand zu den Cantilevern gelegt, um systematische Fehler berücksichtigen zu können. Dies ermöglichte nun im Rahmen der mechanischen Auflösungsgrenze des Roboters die genaue manuelle Festlegung der Abgabepunkte auf dem abgebildeten Mikrocantileverarray (Abb. 4.35 A). Mit Hilfe des Nanoplotter-Programms „TFL-basic2.npl“ wurde der Array über eine Text-Datei analog zum Transferlistenprogramm „transfer8.npl“ (vgl. Abschn.6.6.4) gespottet. Nachfolgend wurde das Ergebnis mit Hilfe der Mikroskopkamera überprüft (Abb. 4.35 B).

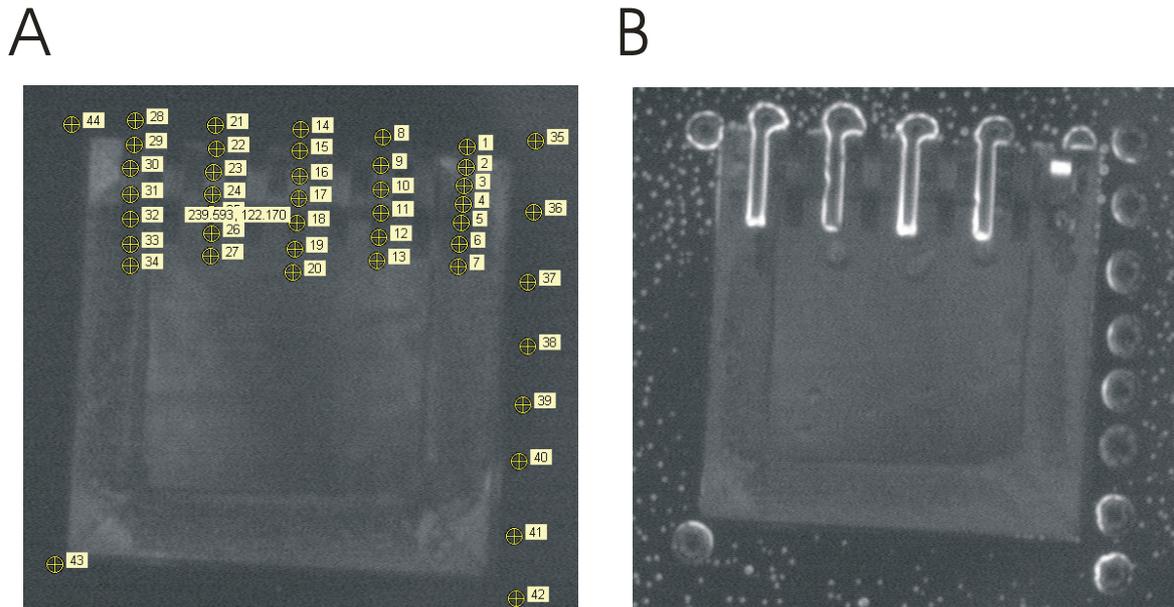


Abbildung 4.35: Anwahl des Spotlayouts und Funktionalisierung eines Cantileverarrays. (A) Manuelle Auswahl der Abgabepunkte vor dem Pipettieren. Die Spotreihen auf den Cantilevern sind länger gewählt als die Cantilever, da an der Auflösungsgrenze des Roboters gearbeitet wurde und die Cantilever vollständig belegt sein sollten. Die Spots auf der Seite und an allen vier Ecken dienten der Orientierung und der Genauigkeitskontrolle. (B) Tropfen nach dem Pipettieren mit einer Peptidlösung in NH_4Ac -Puffer (10 mM, $\text{pH} = 7,3$). Der erste Cantilever von rechts wurde bei dem Beschuss durch die Tropfen an die Seitenwand gedrückt. Die zahlreichen kleinen Tropfen sind Kondensate der erhöhten Luftfeuchtigkeit.

Abhängig von äußeren Einflüssen (Luftfeuchtigkeit und Temperatur) konnte über die Einstellung der Luftfeuchtigkeit in der Umhausung des Roboters und der Temperatur der Kühlplatte auf der sich die Substrate befanden das Eintrocknen der pipettierten Tropfen hinausgezögert werden. Hierbei wurden die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur so eingestellt, dass der Taupunkt möglichst knapp unterschritten wurde.

Nach Beenden des Pipettierens wurde die Luftfeuchtigkeit erhöht um sicher zu stellen, dass die Tropfen nicht eintrocknen. Eine zu hohe Luftfeuchtigkeit, bei der der Taupunkt überschritten wurde, zeigte sich durch kleinste Tropfen auf den Oberflächen (Abb. 4.35 B). Bei zu hoher Luftfeuchtigkeit konnte auch Substanz auf die Referenzcantilever fließen (Abbildung nicht gezeigt), wobei der Array unbrauchbar wurde.

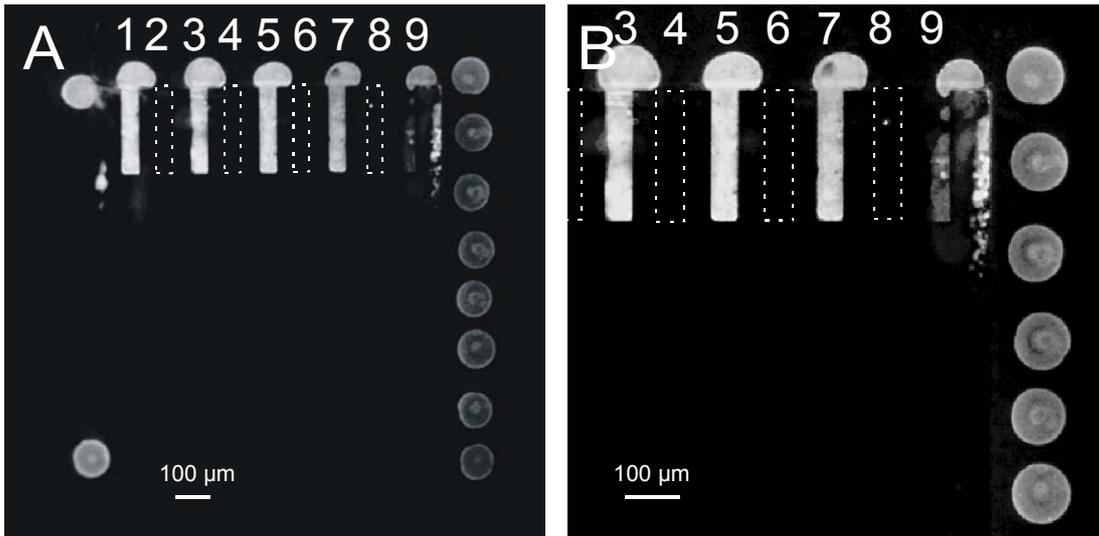


Abbildung 4.36: Fluoreszenzaufnahmen des funktionalisierten Cantileverarrays aus Abbildung 4.35. Nur jeder zweite Cantilever wurde funktionalisiert. Die nichtfunktionalisierten Cantilever dazwischen sind aufgrund der Helligkeit der funktionalisierten Cantilever nicht zu sehen und durch Striche angedeutet. (B) wurde mit einem anderen Objektiv aufgenommen und zeigt den rechten Ausschnitt von (A). Neben den funktionalisierten Cantilevern sind auch die Kontrollspots am Rand des Cantileverarrayfensters zu sehen.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich eine im Rahmen der Immunfluoreszenz homogene Beschichtung auf den Cantilevern (Abb. 4.36). Wie erwartet war Cantilever neun nicht vollständig funktionalisiert. Ein steter leichter Versatz der Spotreihen nach rechts in Abbildung 4.36 ist an den Tropfen, die auf der Umrandung und am Beginn der Cantilever des Arrays gelandet sind, zu erkennen. Nur die Spotreihe am Cantilever neun zeigt eine stärkere Abweichung vom vorgegebenen Spotlayout. Offensichtlich wurde an der Auflösungsgrenze des Roboters gearbeitet. Auch Cantilever drei zeigte gemäß der nicht ganz perfekten Benetzung des Cantilevers am linken Rand einen kleinen Defekt bei der Fluoreszenz. Somit konnte gezeigt werden, dass nur exakt benetzte Gebiete scharfkantig funktionalisiert wurden. Die Fluoreszenz des immobilisierten Peptides ließ sich wegen der starken Reflektionen nicht mit ausreichendem Kontrast zwischen beschichteten und nichtbeschichteten Cantilevern mit dem Mikroskop darstellen, so dass dies nicht als direkter Nachweis für die Immobilisierung herangezogen werden konnte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Untersuchung von Wechselwirkungen niedermolekularer Verbindungen auf Oberflächen durch fluoreszenzmikroskopische Methoden. Ziel war es dabei, spezifische Methoden für die Anbindung von Molekülen auf Oberflächen zu untersuchen. Dabei stand die Verwendung von Mikroarrays im Vordergrund, um mehrere Wechselwirkungen möglichst parallel betrachten zu können.

Zur Lösung der Fragestellung wurden zwei Methoden gewählt, die unterschiedliche Anbindungsmethoden an die Oberfläche erlauben. Zum einen wurde erstmals die native chemische Ligation auf Oberflächen angewandt, die eine sehr chemoselektive, kovalente Anbindung von Proteinen und Peptiden über ein N-terminales Cystein an thiolesterfunktionalisierte Oberflächen erlaubt. Zum anderen wurde die bekannte, selektive, koordinative und reversible Bindung zwischen Oligohistidinen und Ni^{2+} -NTA-Komplexen angewendet. Beide Methoden erwiesen sich als robust und konnten erfolgreich für die selektive Anbindung unterschiedlicher Moleküle im Mikroarrayformat etabliert werden.

Für die koordinative Bindung wurde gezeigt, dass Unterschiede in der Selektivität bei gleichem Bindungsmotiv (Oligohistidin) existierten, falls die Länge des Oligohistidins variiert wurde. Um ein Maß für die Stabilität der Bindung der Oligohistidine an die Ni^{2+} -Multichelatoren zu erhalten, wurden die Oligohistidine durch Titration mit dem Kompetitor Imidazol von den Chelator-Spots abgelöst. Längere Oligohistidine waren wesentlich stabiler auf den Oberflächen immobilisiert als kurzkettinge, und benötigten zur Ablösung von der Oberfläche höhere Konzentrationen an Imidazol. Die Stabilitätsunterschiede bei der Anbindung zwischen langkettigen und kurzkettingen Oligohistidinen wurden durch den Einsatz von Multichelatoren noch vergrößert. Interessanterweise wurde der Stabilitätsunterschied bei gleichzeitiger Inkubation von kurzkettingem Hexahistidin und langkettigem Dekahistidin noch deutlicher. Somit war die Selektivität der Anbindung eines Oligohistidins abhängig von der Anwesenheit des anderen Oligohistidins.

Die Untersuchung der Oligohistidin-NTA-Wechselwirkung mit Hilfe von simulierten molekulardynamischen Methoden (molecular modeling) zeigte, dass keine energetisch stark begünstigten Konformationen bestimmter Koordinationen existieren. Dies wurde

durch experimentelle Ergebnisse von Kooperationspartnern bestätigt (His₁₄ ist beispielsweise noch affiner als His₁₀).

Die chemoselektive, gerichtete, kovalente Anbindung über die native chemische Ligation stellt eine sehr spezifische Immobilisierungsmethode dar. Die als Positiv- und Negativkontrollen eingesetzten Peptide zeigten durch ihre Anbindung und Nichtanbindung an die Oberfläche Übereinstimmung mit dem Bindungsmechanismus der nativen chemischen Ligation. Es konnten nur Peptide an die Oberfläche anbinden, die über ein N-terminales Cystein verfügen. Die Immobilisierungsmethode war kompatibel für Anwendungen im Bereich von Proteinmikroarrays, da spezifisch angebundene Proteine auf definierte Art immobilisiert sind, und ihre räumliche Orientierung damit festgelegt ist. Die physiologisch relevanten Eigenschaften des auf diesen Oberflächen getesteten Proteins blieben erhalten was durch die selektive Erkennung eines Phosphopeptides durch die intakte SH2-Domäne des Proteins nachgewiesen werden konnte.

Die bereits etablierte Methode zur Beschichtung von Mikrocantilever Arrays mit Cystein-Peptiden konnte durch den Einsatz eines Nanopipettier-Roboters weiter verbessert werden. Einzelne Cantilever eines Mikrocantilever Arrays ließen sich mit Hilfe des Nanopipettier-Roboters selektiv mit einem Cystein-Peptid beschichten. Durch immunhistochemische Methoden konnte gezeigt werden, dass die durch den Roboter mit Peptidlösung getroffenen Cantilever scharfkantig beschichtet waren, und das Peptid stabil immobilisiert war. Die Referenzcantilever mussten bei dieser Methode nicht nachbehandelt werden. Sie zeigten nach der immunhistochemischen Färbung keine Anbindung der Antikörper.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Puffer

Lösungsmittel wurden von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Lancaster (Mühlheim am Main), Acros (Ulm), Fisher Scientific (Loughborough, UK) und Sigma-Aldrich (Steinheim) in p.a. Qualität bezogen. Wasserfreie Lösungsmittel DMF, DCM, DMSO, Methanol, Toluol, Diethylether und Acetonitril wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Acetonitril und Methanol zur HPLC- sowie MS-Analytik wurden in LiChrosolv Gradient Grade Qualität von Merck (Darmstadt), J.T. Baker (Deventer, Niederlande) oder Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) verwendet. Wasser für das Spülen von Oberflächen, für die Verwendung als Systemflüssigkeit des Nanopipettier-Roboters und für die HPLC wurde über eine Milli Q Anlage der Fa. Millipore (Eschborn) gewonnen oder über die Destamat-Anlage der Schott AG (Mainz) doppelt destilliert.

Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol stammte ebenfalls von der Firma Merck (Darmstadt).

Für die Modifizierung von Glasoberflächen wurden Chemikalien von Merck (Darmstadt), ABCR (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen) und Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet.

Geschützte Aminosäuren stammten von der Firma Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz).

Alle anderen Chemikalien und Reagenzien wurden in der erforderlichen Reinheit von Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Lancaster (Mühlheim am Rhein) und Merck (Darmstadt) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Rink-Amid-Harze wurden von der Firma Rapp-Polymere (Tübingen) bezogen. Sofern Peptide nicht selbst synthetisiert wurden, wurden diese, oder Bausteine davon von EMC microcollections (Tübingen) bezogen. Die Fluoreszenzfarbstoffe 5(6)-Carboxyfluoreszein (Fluo) sowie 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (Tamra) wurden von Fluka (Neu-Ulm) und der Farbstoff S0387 von FEW-Chemicals (Wolfen) bezogen.

Folgende Puffer wurden verwendet:

- HBS (pH = 7,3 oder 8,0), bestehend aus 10 mM HEPES, 135 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid und 1,8 mM Kaliumchlorid.
- PBS (pH = 7,2), bestehend aus 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 137 mM Natriumchlorid und 2,7 mM Kaliumchlorid.
- TRIS-Puffer (pH = 8,8), bestehend aus 0,1 M TRIS.

- NH₄Ac-Puffer (pH = 7,3 und 8,0)
- Phosphatpuffer (pH=8,0), bestehend aus 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat.
- Rekonstitutionspuffer, bestehend aus 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Natriumphosphat (pH = 7,5), 10 mM DTT.
- Dialysepuffer, bestehend aus 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 2 mM EDTA, 2 mM DTT.
- Denaturierungspuffer (pH = 7,2), bestehend aus 0,2 M Natriumphosphat, 0,2 M NaCl, 2 M Guanidiniumhydrochlorid.

6.2 Antikörper und Proteine

Primär- und Sekundärantikörper wurden von Dianova (Hamburg) und Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) bezogen. Weitere Proteine stammten von Dianova (Hamburg), von PhD Manuel Baca (Victoria, Australien) und von PD Dr. Jacob Piehler (Frankfurt).

Tabelle 6.1: Verwendete Antikörper und Proteine

Antigen/Proteinbezeichnung	Quelle	Konjugation
Myc-Peptid-sequenz, human	Monoclonal Maus, IgG1 κ	-
Pentahistidin, AntiHis5	Maus	-
Maus IgG	Ziege	Alexa 488, Alexa 546 oder Alexa 633
SHP-2C	<i>E. coli</i>	-
Fluo-Ahx-MBP-His ₁₄	<i>E. coli</i>	Fluoreszein

6.3 Peptidsynthese

Alle manuellen Syntheseschritte wurden bei Raumtemperatur in 2 ml Einwegspritzen mit Filterfritten auf einem Schüttler durchgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, bestanden Waschschritte bei der Peptidsynthese aus der Zugabe und anschließendem Absaugen von je 3 x 2 ml DMF, MeOH, DCM und Diethylether. Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde an einem Peptidsynthesizer (RSP 5032, Tecan, Männedorf, Schweiz; Software Syro von MultiSynTech, Bochum) durchgeführt. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte nach der Fmoc-Strategie^[184] in 10-fachem Überschuss mit DIC/HOBT-Aktivierung^[185] (Tab. 6.2). Als Reaktionsgefäße dienten 2 ml Einwegspritzen mit Filterfritten. Vorbelegtes oder freies Harz wurde in einer Menge eingewogen, die 15 μmol an reaktiven Gruppen entsprach. Das Harz wurde 10 min in DMF vorgequollen, um reaktive Stellen im Inneren der Harzkugeln besser zugänglich zu machen. Vor der Kupplung mit einer neuen Aminosäure wurde die Fmoc-Schutzgruppe am Harz bzw. an der vorhergehenden Aminosäure mit 20%-iger Piperidinlösung in DMF abgespalten. Alle selbst hergestellten Peptide wurden auf Rink-Amid-Harz synthetisiert.

Tabelle 6.2: Standard-Synthesezyklus für die Festphasen-Peptidsynthese am multiplen Syntheseautomaten. Alle Angaben beziehen sich auf eine Ansatzgröße von 15 μmol an reaktiven Gruppen.

Operation	Reagenz/Solvens	Volumen [μl]	Zeit [min]
Quellen	DMF	500	10
Entschützen	20% Piperidin in DMF	400	10
Waschen	DMF	600	6 x 1
Kupplung	a) 0,5 M Fmoc-Aminosäure/HOBT in DMF	300	
	b) 1 M DIC in DCM/DMF (2:3)	300	40
	DCM/DMF (2:3)	100	20
Waschen	DMF	600	6 x 1

6.3.1 N-Terminale Fluoreszenzmarkierung von Peptiden

Fluoreszente Markierungen von Peptiden deren N-terminales Ende nicht für eine Oberflächenanbindung frei bleiben musste, wurden an fester Phase nach dem Aufbau der

Peptidsequenz durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass die α -Aminofunktion der zuletzt gekuppelten Aminosäure frei von Fmoc-Schutzgruppen war, wurde das am Harz befindliche Peptid 10 min mit einer 20%-igen Piperidinlösung in DMF behandelt und anschließend gewaschen. Bei der Kupplung mit den fluoreszenten Farbstoffen wurden die Parameter bezüglich Kupplungsreagenzien, Konzentrationen und Reaktionszeiten gemäß Tabelle 6.3 gewählt.

Tabelle 6.3: Kupplungsreagenzien, Konzentrationen in DMF und Reaktionszeiten bei Kupplung mit Fluoreszenzfarbstoffen.

	Farbstoff (eq)	DIC (eq)	HOBt (eq)	DIPEA (eq)	Reaktionszeit (Stunden)
5(6)-Carboxyfluoreszein	5	5	5		16
5(6)-Carboxytetramethyl- rhodamin	3	4	4	20	24
S0387	3	6	6		16

Nach der Kupplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde das Harz 3 x mit DMF/MeOH/DCM/Diethylether gewaschen. Mehrfach gekuppeltes 5(6)-Carboxyfluoreszein wurde vor dem Waschen 8 min im Durchfluss mit Piperidin/DMF (1:4) entfernt. Im Fall des Farbstoffs S0387 erwies sich während des allgemeinen Waschschrilles ein zusätzliches viermaliges Waschen mit 1% AcOH in DMF als günstig, da sich der Farbstoff schwer aus den Harzkugeln entfernen ließ.

6.3.2 Fluoreszenzmarkierung an der Seitenkette

Bei Peptiden, deren N-Terminus frei bleiben sollte, wurde an ihrer Lys-Seitenkette mit Fluoreszenzfarbstoffen nach Abschnitt 6.2.1 gekuppelt. Lysin war bei diesen Peptiden mit der Allyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Alloc) an der ϵ -Aminogruppe geschützt. Der N-Terminus des am Harz vorhandenen Peptids wurde dazu nach der Fmoc-Abspaltung mit der Boc-Schutzgruppe geschützt.

Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe wurde mit dem Pd-Katalysator Pd(PPh₃)₄ unter Schutzgas in neutraler Reaktionsmischung durchgeführt^[186]. Eine Lösung aus 24 eq PhSiH₃ in DCM wurde unter Schutzgas gesetzt und 0,25 eq Pd(PPh₃)₄ zugegeben. Je 1ml Lösung wurde den unter Schutzgas stehenden Spritzen zugegeben, die Mischung im

Schüttler durchmischt und vor Lichteinfall geschützt. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung nach kurzem Waschen mit DCM durch eine frische ersetzt. Nach weiteren 2 h wurden die Spritzen aus der Schutzgasatmosphäre entnommen, die Reaktionslösung durch Filtration abgetrennt und das durch Palladium dunkel gefärbte Harz mehrfach mit DCM gewaschen. Nachfolgend wurde das Harz 3 x 15 min mit einer 0,5 %-igen Natriumdiethyldithiocarbamat-Trihydrat-Lösung (zur Komplexierung des Palladiums) in DMF behandelt, wobei sich das Harz wieder hell färbte, anschließend 3 x mit DMF/MeOH/DCM/Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

6.3.3 Herstellung von Cystin-Peptiden

Das cysteinhaltige Peptid TA42 mit Mmt-Schutzgruppe am Cystein, das für die Anbindung an Thiole auf Oberflächen in Verbindung mit der nativen chemischen Ligation Verwendung finden sollte, wurde am Cystein mit Thiopyridin in ein Disulfid übergeführt. Die Überführung in das Disulfid fand als letzter Schritt nach Fluoreszenzmarkierung vor dem Abspalten statt. Zunächst wurde die Mmt Schutzgruppe durch tropfenweise Zugabe von 1% TFA in DCM im Durchfluss abgespalten. Die vollständige Abspaltung wurde durch eine Entfärbung der vorher gelben, austropfenden Abspalllösung angezeigt. Es folgte ein Waschschrift mit je 3 x DMF/MeOH/DCM/Diethylether. Anschließend wurden 5 eq Dithiopyridin in 2,5% AcOH/DCM zugegeben. Die Reaktionslösung wurde nach 2 h Reaktionszeit ausgetauscht und für eine weitere Stunde inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit je 3 x DMF/MeOH/DCM/Diethylether.

6.3.4 Synthese des Palladiumkomplexes Pd(PPh₃)₄

Der zur Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe notwendige Palladiumkomplex wurde selbst hergestellt^[187], da kommerziell erhältliche Komplexe für gewöhnlich eine geringe Reinheit besitzen (bräunliche Färbung). Es wurde keine ausführliche Analytik durchgeführt (Elementaranalyse), da eine gelbe Färbung ausreichende Reinheit anzeigte. Die gesamte Synthese inklusive der Filtration und den Waschschriften fand unter Schutzgasatmosphäre (N₂) statt. Das Produkt wurde stets unter Schutzgas gehalten.

Eingesetzt: PdCl₂ (5 g; 28,2 mmol), P(C₆H₅)₃ (36,92 g; 140,9 mmol), N₂H₄·H₂O (5,47 ml, 113 mmol).

Palladiumchlorid und Triphenylphosphan wurden in 338,2 ml DMSO in einem Dreihalskolben mit Septum unter Schutzgas gesetzt. Unter Rühren wurde mit einem Ölbad auf ca. 140 °C erhitzt bis sich alles gelöst hatte. Das Ölbad wurde nun entfernt und ca. 15 min weitergerührt. Anschließend wurde das Hydrazinhydrat zügig unter Rühren durch das Septum zugegeben. Bei der anschließenden heftigen Reaktion wurde sofort mittels Wasserbad gekühlt. Ab ca. 125 °C trat Kristallisation auf. Nach dem vollständigen Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Produkt mehrmals mit Ethanol gewaschen. Anschließend wurde mehrmals mit Diethylether gewaschen und nachfolgend im Stickstoffstrom getrocknet. Das Produkt ist in Diethylether ein wenig löslich. Während der Waschschriffe färbte sich das Produkt von dunkelbräunlich nach gelb. Da auf ausreichende Reinheit abgezielt wurde, waren die Waschschriffe (auch mit Diethylether) sehr ausführlich, was sich durch niedrige Ausbeute bemerkbar machte.

Ausbeute: 23,4 g, (72%)

Reinheit: Smp. 113°C (Lit.: 115-116 °C)

6.3.5 Kaiser-Test

Die Vollständigkeit der manuellen Kupplungsschriffe wurde mittels Kaiser-Test (Nachweis primärer Amine mit Ninhydrin) auf vollständige Umsetzung der freien Aminofunktionen untersucht.^[188]

Für den Kaiser-Test wurden folgende Reagenzlösungen verwendet:

Kaiser I: 50 µl einer 0,01 M wässrigen KCN-Lösung wurden mit Pyridin auf 25 ml aufgefüllt.

Kaiser II: 5 g Ninhydrin wurden in 100 ml n-Butylalkohol gelöst.

Kaiser III: 80 g Phenol wurden in 20 ml n-Butylalkohol gelöst.

Zur Durchführung des Kaiser-Tests wurden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110 °C erhitzt. Sind freie Aminogruppen vorhanden, so tritt eine Blaufärbung der Harzkugeln oder der Lösung auf. Diese Methode eignet sich nicht zur Überprüfung der Kupplungseffizienz von Fluoreszenzfarbstoffen.

6.3.6 Synthese des Bernsteinsäurebenzylthiolesters

Die Synthese des Linkers für die Thiolesteroberfläche (Abb. 4.24) erfolgte nach Stetsenko *et. al.*^[189]. Benzylmercaptan wurde unter Schutzgasatmosphäre in eine Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid und DMAP in Acetonitril/Pyridin (9:1 v/v) unter Rühren zugegeben. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bis fast zur Trockne unter Vakuum eingedampft und anschließend wieder in einer NaHCO₃-Lösung (pH 8,5) gelöst. Die Mischung wurde 2x mit Diethylether extrahiert, die wässrige Phase mittels Eisbad gekühlt und dann mit HCl (5 M) auf pH = 2 angesäuert. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert und zunächst mit kalter HCl (0,1 M), anschließend mit eiskaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Eingesetzt: Benzylmercaptan (2,6 ml, 22 mmol), Bernsteinsäureanhydrid (2 g, 20 mmol), DMAP (122 ml, 1mmol), ACN/Pyridin (2,5 ml/22,5 ml). Ausbeute: 3,4 g, (76%)

Reinheit: >95 % (HPLC), MS(ESI): m/z = 223 (M-H)⁻

6.3.7 Abspaltung und Aufarbeitung

Die Abspaltung der Peptide erfolgte in den für die Synthese verwendeten Reaktionsgefäßen (2 ml Spritzen). Zum beladenen Harz wurden jeweils 400 µl Abspalllösung zugegeben, 4 h geschüttelt und anschließend abfiltriert. Es folgte eine Wiederholung der Prozedur. Die Abspalllösung bestand aus TFA, Wasser und TIS im Verhältnis 95:2,5:2,5 Vol%. Bei Peptiden, die Cystein mit freier Thiolgruppe (also nicht solche mit Thiopyridin) enthielten wurde zum Schutz der Thiolgruppe vor Oxidation die Abspalllösung mit Ethandithiol ergänzt. (TFA, Wasser, TIS und Ethandithiol im Verhältnis 92,5:2,5:2,5:2,5 Vol%). Die TFA der vereinigten Abspalllösungen wurden unter Vakuum am Rotationsverdampfer teilweise entfernt. Nachfolgend wurden die nahezu eingetrockneten Gemische mit 5 ml tiefgekühltem Diethylether (-20 °C) versetzt, geschüttelt, und die ausgefallenen Peptide abzentrifugiert. Die Etherüberstände wurden abdekantiert und die Prozedur 2x wiederholt. Anschließend wurden die Peptide in 6 ml tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert. In Tabelle 6.4 sind alle in dieser Arbeit synthetisierten Peptide aufgeführt.

Auch bei den NTA-Molekülen mussten die noch vorhandenen Schutzgruppen abgespalten werden. Als Schutzgruppen waren tert-Butyl-Gruppen an den Acetatgruppen vorhanden. Auch hier wurde die oben beschriebene Abspalllösung bestehend aus TFA, Wasser, TIS

und Ethandithiol zu den farblosen Lyophilisaten zugegeben. Die Inkubationszeit betrug jedoch 1x 4 und 1x 16 h. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß der oben beschriebenen Prozedur.

Die Sequenz Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (im Einbuchstabencode EQKLISEEDL) aus den Peptiden RA119, TA20, TA21, RA107Fluo, RA108Fluo und OM-P18 stammt aus dem 62 kDa schweren humanen Onkoprotein myc (c-myc). Die Peptide mit dieser Sequenz lassen sich spezifisch mit einem monoklonalen anti-c-myc-Antikörper nachweisen.^[190,191]

Tabelle 6.4: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit synthetisierten, modifizierten und verwendeten Peptide mit Kapitelangabe. Die Peptide TA 47, 53, 54, 55 wurden am Harz gebunden mit Seitenkettenschutzgruppen von der Firma EMC microcollections (Tübingen) bezogen, fluoreszent markiert und mittels der in diesem Kapitel beschriebenen Methode abgespalten.

Peptid/Aminosäuresequenz	Abkürzung	Kapitel
C-Ahx-EQKLISEEDL-Ahx-NH ₂	RA119	4.4
A-Ahx-K(Fluo)-NH ₂	TA37 & RA80Ala	4.4
Ac-C-Ahx-K(Fluo)-NH ₂	RA113, TA38	4.4
C-Ahx-K(Fluo)-NH ₂	TA18 & RA80Cys	4.4
C-Ahx-EQKLISEEDL-Ahx-K(Fluo)-NH ₂	TA20 & RA107	4.4
C-Ahx-LDEESILKQE-Ahx-K(Fuo)-NH ₂	TA21	4.4
C(Thiopyr)-Ahx-K(S0387)-NH ₂	TA42	4.4
S0387-AAHHHHHHH-OH	TA47	4.2
Ac-Ahx-HHHHHHHHHH-OH	TA53	4.2
S0387-Ahx-VE(pY)TQLLW-NH ₂	TA54	4.4
S0387-Ahx-VEYTQLLW-NH ₂	TA55	4.4
Fluo-Ahx-EQKLISEEDL-Ahx-C-NH ₂	OM-P18	4.5
Fluo-Ahx-K-Ahx-EQKLISEEDL-Ahx-C-NH ₂	RA108	4.4
Fluo-Ahx-HHHHHHHH-OH		4.2
Fluo-Ahx-HHHHHHHHHH-OH		4.2
S0387-CGEEREIQ(pY)APLSFHKG-NH ₂	KK80	4.4

6.4 Rekonstitution des Proteins SHP-2C

Das in lyophilisierter Form vorliegende Protein SHP-2C (hergestellt von Manuel Baca, Ph.D., Victoria, Australien)^[73] sollte für die Immobilisierung auf Oberflächen in seine native Konformation überführt werden. Das Protein entsprach einer Domäne (Aminosäuren 109-220) der Tyrosin-Protein Phosphatase und hatte folgende Sequenz:

E RWFHGHLSGK EAEKLLTEKG KHGSFLVRES QSHPGDFVLS VRTGDDKGES
NDGKSKVTHV MIRCQELKYD VGGGERFDSL TDLVEHYKKN PMVETLGTVL
QLKQPLNTR.

Am N-Terminus war das Protein zusätzlich mit der Aminosäuresequenz CHHHHHH versehen. Die Vorschrift zur Rekonstitution stammte von Manuel Baca. Alle Schritte der Dialyse erfolgten bei 4 °C. 1,2 mg des Proteinpulvers wurden in 800 µl des Rekonstitutionspuffers gelöst. Dieser wurde anschließend auf das 1,5-fache mit Wasser verdünnt. Nun wurde die Lösung in eine Dialysekammer (Pierce, Rockford, USA) mit einer Ausschlussmasse von 3500 g/mol eingespritzt. Die Lösung wurde nun gegen 300 ml des Dialysepuffers für 24 h dialysiert, wobei der Dialysepuffer 2 x gewechselt wurde. Nachfolgend wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer Spritze aus der Dialysekammer entfernt und bei 13000 U/min für 20 min zentrifugiert, um vorhandenes Präzipitat aus der Lösung zu entfernen. Anschließend wurde nun noch die Konzentration der erhaltenen Proteinlösung mittels der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt. Zunächst wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt indem eine BSA-Verdünnungsreihe zwischen 0,05 und 0,5 mg/ml in PBS-Puffer in einer 96er Mikrotiterplatte hergestellt und mit Bradford-Lösung versetzt wurde. Anschließend wurde auch SHP-2C Proteinlösung in die Mikrotiterplatte gegeben und mit Bradford-Lösung gefärbt. Danach wurde die Absorption für jede Position der Mikrotiterplatte auf einem ELISA-Plattenlesegerät von Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA; SpectraMax 340) bestimmt und daraus die Konzentration für die Proteinlösung über die Eichgerade bestimmt.

6.5 Modifizierung von Glasoberflächen

Als Glasträger wurden entweder Deckgläser vom Typ1, BK7 mit 12 mm Durchmesser oder Objektträger für die Mikroskopie von Marienfeld (Lauda-Königshofen) mit einer Dicke von 1 mm und einer Oberflächenplanarität von $\pm 12\text{-}20\ \mu\text{m}$ (geläppt bzw. chem. mech. poliert) verwendet. Je nach Anwendung wurden die im Folgenden erwähnten verschiedenen Oberflächenmodifizierungen verwendet.

6.5.1 Aminofunktionalisierte Glasträger

Zunächst wurden die Gläser zum Entfetten für 15 min in Aceton getaucht. Anschließend wurden sie für 16 h in eine frisch zubereitete Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{O}_2(30\%, \text{Vol.}): \text{konz. H}_2\text{SO}_4: 2:3\ \text{v/v}$) getaucht. Nachfolgend wurden die Gläser mit viel Wasser gespült, mit gefilterter Druckluft trocken geblasen und umgehend mit dem nachfolgenden Agens bedeckt oder in dieses eingetaucht. Für den Fall von Verzögerungen wurden die Gläser nach dem Trockenblasen sofort in ein mit Argon gespültes, geschlossenes Gefäß gegeben. Nun wurden die Glasträger mit einer 3%-igen Lösung von 3-Aminopropyltriethoxysilan in Ethanol/Wasser (95:5 Vol%) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch starkes Verdünnen der Lösung mit Ethanol abgebrochen und die Gläser gut mit Ethanol gespült. Um die restlichen Hydroxygruppen zu hydrolysieren und die Silane stärker zu vernetzen, wurden die Gläser für eine Stunde in einem Heihschrank bei $115\ \text{°C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Gläser erneut mit Ethanol abgespült und mit gereinigter Druckluft trocken geblasen. Sollten die aminofunktionalisierten Oberflächen für längere Zeit ($> 5\ \text{h}$) aufbewahrt werden, wurden sie unter Argon bei $4\ \text{°C}$ gelagert.

6.5.2 Epoxyfunktionalisierte Glasträger

Um die Oberfläche mit einer Epoxyfunktionalisierung zu versehen, wurden die Gläser zunächst auf die gleiche Art und Weise gereinigt wie im 1. Absatz unter 6.5.1 beschrieben. Nach dieser Prozedur wurden die Gläser mit 100%-igem GOPTS für 8 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige GOPTS mit Aceton von der Oberfläche gespült und diese mit gereinigter Druckluft trocken geblasen. Epoxyfunktionalisierte Glasträger wurden stets sofort weiterverwendet.

6.5.3 PEG-derivatisierte Oberflächen

Sollte eine PEG-Schicht als Abstandshalter zur Verringerung des Hintergrundsignals zwischen Funktionalisierung und Glas verwendet werden, so wurde diese auf epoxyfunktionalisierten Oberflächen aufgebaut. Dazu wurden die trockenen epoxyfunktionalisierten Glasträger vollständig mit reinem DAPEG 800 bedeckt und bei 75 °C für 36 h inkubiert ^[180]. Nach dem Abkühlen wurden die Gläser durch Spülen mit Wasser von überschüssigem DAPEG befreit und anschließend mit gereinigter Druckluft trocken geblasen.

Wurden die Gläser nicht unmittelbar weiterverwendet, so wurden sie unter Argon bei 4 °C aufbewahrt.

6.5.4 N-Hydroxysuccinimidfunktionalisierte Glasträger

Für die Herstellung von N-hydroxysuccinimidfunktionalisierten Oberflächen wurden aminofunktionalisierte Glasträger verwendet. Die trockenen Amin-funktionalisierten Glasträger wurden mit einer Lösung aus DSS (35 mM) und DIPEA (82,5 mM) in DMF für 2,5 h inkubiert. Nachfolgend wurden die Oberflächen mit DMF gespült und mit gereinigter Druckluft trocken geblasen. NHS-funktionalisierte Oberflächen wurden immer sofort weiterverwendet.

6.5.5 Maleinimidfunktionalisierte Glasträger

Für die Herstellung der zu Vergleichszwecken hergestellten, maleinimidfunktionalisierten Oberflächen wurden ausschließlich Amin-funktionalisierte Glasträger verwendet.

Die trockenen aminofunktionalisierten Glasträger wurden mit einer Lösung aus 3-Maleimido-propionsäure-N-succinidylester (35 mM) in DMF für 3 h bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Oberflächen mit DMF gespült und gereinigter Druckluft trocken geblasen. Maleinimidfunktionalisierte Oberflächen wurden ebenfalls sofort weiterverwendet.

6.5.6 Thiolesteroberflächen

Für die spezifische Anbindung von Peptiden und Proteinen mit N-terminalem Cystein wurden Glasoberflächen zu Thiolesteroberflächen modifiziert.

Die Amin-funktionalisierte Oberfläche wurde mit einer Lösung von Bernsteinsäurebenzylthiolester (10 mM), HATU (54 mM) und DIEA (420 mM) in DMF für 2,5 h inkubiert. Deckgläser wurden mit 80 µl dieser Lösung bedeckt, Objektträger mit 0,5 ml. Anschließend wurden die Gläser mit DMF gespült und mit gereinigter Druckluft trocken geblasen.

6.6 Geräte und analytische Methoden

6.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für analytische HPLC-Trennungen wurde eine Anlage der Firma Waters (Eschborn), bestehend aus einer Steuerungseinheit 600 S, Pumpeneinheit 626, UV-Detektor 486 sowie einem 712 WISP Autosampler, eingesetzt. Die Anlage ist mit einer analytischen Trennsäule Nucleosil C 18 (5 µm Korngröße, 250 x 2 mm, Grom, Herrenberg) ausgestattet. Für die Trennungen wurden Gradienten mit Wasser/0,1% TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril/0,1% TFA (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min gefahren. Es wurden, je nach Trennproblem, folgende Gradienten eingesetzt:

- 0% B auf 100% B innerhalb 30 min, 100% B für 5 min.

- 10% B auf 100% B innerhalb 30 min, 100% B für 5 min.

Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm und die Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen errechnet. Eine absolute Gehaltsangabe ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Verbindungen nicht möglich.

Die präparative Reinigung von Peptiden erfolgte auf einer Anlage der Firma Gilson (Bad Camberg), bestehend aus der Pumpeneinheit 321, dem UV/VIS-Detektor 156, dem Fraktionensammler 202 und der Steuersoftware Unipoint (Version 1.90). Die Proben wurden auf einer präparativen Trennsäule (Grom Sil 120 ODS-4, HE, 10 µm Korngröße) mit den gleichen Laufmitteln wie bei der analytischen HPLC aufgereinigt. Die Flussrate betrug 10 ml/min. Die Gradienten wurden auf das jeweilige Trennproblem angepasst.

6.6.2 Massenspektrometrie

Die Identität der synthetisierten Peptide wurde bei Massen von über 500 mit einem G2025A MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometer*) der Firma Hewlett Packard (Palo Alto, USA) überprüft. Auf einem Goldträger mit 10 Positionen wurden pro Position 0,7 µl einer Matrixlösung (20 mg 2,5-Dihydroxyacetophenon und 5 mg Ammoniumcitrat in 1 ml 80% Isopropanol) aufgetropft und im Vakuum eingedampft. Anschließend wurden jeweils 0,7 µl der zu analysierenden Substanzen (vorzugsweise gelöst in ACN/Wasser 1:1) auf die matrixbeschichteten Positionen gegeben und erneut im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Ionisierung erfolgte in einem Vakuum von $1,33 \cdot 10^{-4}$ Pa durch Laserschüsse im Energiebereich von 7 bis 10 µJ. Das Massensignal baute sich normalerweise aus wenigstens 20 Beschüssen im Single-Shot Modus auf.

Bei kleinerer Masse wurde ein Triple Quadrupol Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS, VG Quattro II, Fisons Instruments, Manchester, UK) gewählt.

6.6.3 Mikroskopie

Bilder die aus Untersuchungen mit modifizierten Glasoberflächen stammten, wurden mit einem inversen, konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM510, Carl Zeiss, Göttingen) aufgenommen. Das Aufbauprinzip des konfokalen Laserscanning-Mikroskops ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Für die Untersuchungen mit Mikroarrays wurden ein Plan-Neofluar 5x / 0,15 NA Objektiv und ein Plan Neofluar 10x / 0,3 NA benutzt. Das Mikroskop verfügte über drei Laser. Einen Argon-Ionenlaser mit einer 458 nm-, einer 488 nm- und einer 514 nm-Linie und 2 Helium-Neon-Lasern mit einer 543 nm- bzw. einer 633 nm-Linie. Die Mikroskopsoftware war Zeiss LSM510 (Version 3.5).

Fluoreszein und Alexa488 wurden bei 488 nm angeregt und mit einem BP 505-550 Filter detektiert, Tetramethylrhodamin und Alexa546 wurden bei 543 nm angeregt und mit einem BP 560-615 Filter detektiert. S0387 und Alexa633 wurden bei 633 nm angeregt und mit einem LP 650 Filter detektiert. Für den Fall der gleichzeitigen Detektion von mehreren Farbstoffen sind die verwendeten Filter, Strahlteiler und Laser in Tabelle 6.5 aufgeführt.

Die Signaleinstellungen des Mikroskops wurden je nach Qualität und Intensität des Signals so gewählt, dass die Anzeige der Verstärkerspannung einen Wert zwischen 600 und 900 hatte um im linearen Bereich des Verstärkers zu arbeiten. Einer höheren Verstärkerspannung wurde innerhalb dieser Grenzen zu Gunsten der Lebensdauer der Fluoreszenzfarbstoffe gegenüber einer höheren Laserleistung stets der Vorzug gegeben. Im Falle von Titrationsen mit fluoreszenten Liganden wurde konfokal gearbeitet. Bei Detektion von trockenen Arrays oder solchen ohne fluoreszente Lösung (z.B. nur Puffer) über dem Array wurde auf eine konfokale Detektion verzichtet.

Tabelle.6.5: Verwendete Filter und Strahlteiler bei gleichzeitiger Fluoreszenzdetektion mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe am LSM (MBS: Main beam splitter, DBS: Dichroic beam splitter)

Farbstoffkombination	Strahlteiler	Laser, Filter
Fluoreszein/ Tetramethylrhodamin -Mehrkanal-Aufnahme	MBS: HFT 488/543 DBS1 NFT545 DBS2: Mirror DBS3: Plate	Kanal1: 543 nm, LP 560 Kanal2: 488 nm, BP 505-530
Fluoreszein/S0387 -Einzelkanal-Aufnahme	MBS: HFT UV/488/543/633 DBS1: NFT 570 DBS2: Mirror DBS3: Plate	633 nm, LP 650 488 nm, BP 505-550
Fluoreszein/Alexa546/Alexa633 -Mehrkanal-Aufnahme	MBS: HFT UV/488/543/633 DBS1: NFT 635vis DBS2: NFT545 DBS3: Plate	Kanal1: 633 nm, LP 650 Kanal2: 543 nm, BP 560-610 Kanal3: 488 nm, BP 505-530

Für Aufnahmen mit Deckgläsern wurden diese mit der beschichteten Seite nach oben in eine Halterung (Abb.6.1) eingespannt. So war es möglich auf der frei zugänglichen Arrayoberfläche wässrige Ligandlösungen auf dem Mikroskop zu inkubieren und deren Zusammensetzung zu verändern.

Um die Arrays, die einen großen Teil der Deckgläser bedeckten, vollständig zu detektieren, wurden diese über die Zeiss Software computergesteuert mosaikartig

abgerastert. So entstand abhängig von der in vertikaler und horizontaler Richtung eingestellten Bildanzahl ein zusammengesetztes Bild, das aus vielen Einzelbildern bestand. Der dabei auftretende Pixelversatz, der durch den Auflösungsfehler des motorgesteuerten Mikroskopisches entstand (max. 4 μm), musste hingenommen werden. Gleiches galt für die teilweise inhomogene Detektion bei manchen Bildern (Schachbretteffekt).

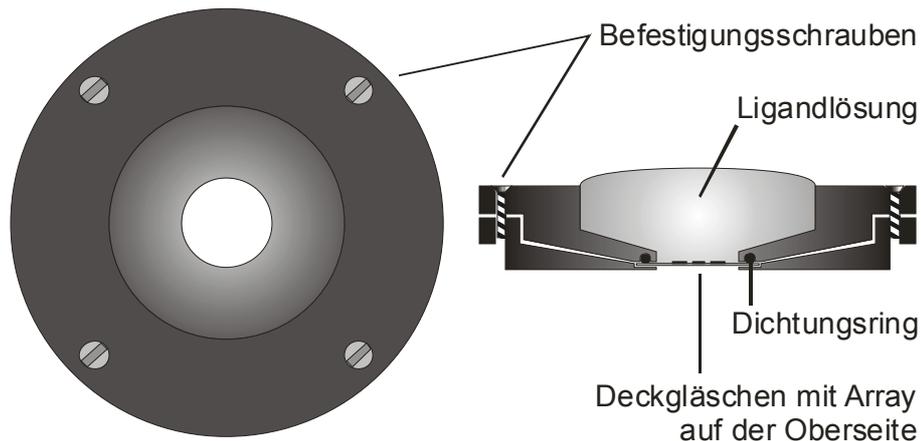


Abbildung 6.1: Deckglashalterung (Aufsicht und Schnitt)^[117]

Da die Mikrocantilever beim Umdrehen durch den Kontakt mit einem Objektträger beschädigt werden können, wurden Mikrocantilever-Arrays nicht am inversen LSM sondern an einem aufrechten Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan2, Carl Zeiss, Göttingen) untersucht. Die verwendete Software war Zeiss AxioVision 4 Version 4.1.1.0 und die verwendeten Objektive waren ein Plan Neofluar 10x / 0,3 NA sowie ein Plan Neofluar 20x / 0,5 A.

6.6.4 Mikroarray-Erstellung

Zur Erstellung von hochdichten Mikroarrays wurde ein piezoelektrischer Nanopipettier-Roboter mit kontaktfreier Tropfenabgabe vom Typ Nanoplotter NP2.0 der Firma GeSiM (Dresden) verwendet. Der Roboter verfügte über einen 8-Kanal-Pipettierkopf, einen 4-Kanal-Dilutor, einen Luftbefeuchter vom Typ AirWin, einer Plattenkühlung mittels Huber Polystat CC3 (Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg) und war mit einer bildgebenden Einheit über eine eingebaute Mikroskopkamera in Verbindung mit einer

Framegrabberkarte ausgestattet. Der Pipettierroboter wurde von der Software NPC16 V2.10 gesteuert.

Die Tropfenabgabe erfolgte durch piezoelektrisch betriebene Mikrodosierköpfe die aus einem Silizium-Glasverbund bestehen. An einer kleinen Kammer, die mit der zu auspipettierenden Flüssigkeit gefüllt ist, ist ein Piezokristall befestigt und durch eine Membran von der Flüssigkeit getrennt. Bei einer Anregung dieses Piezoaktors wird die Flüssigkeit in der Kammer komprimiert und ein Tropfen aus der Düse ejiziert. Nach der Tropfenabgabe kehrt die Piezokeramik in ihre Ruhelage zurück und die Kammer wird wieder befüllt (Abb. 6.2). Mit Hilfe der Parameter Amplitude, Impulsbreite und Frequenz der Anregungsspannung kann das Tropfenvolumen in einem gewissen Bereich eingestellt werden und die Tropfenabgabe an verschiedene Flüssigkeiten mit Hilfe einer Stroboskopkamera abgepasst werden. Es waren zwei verschiedene piezoelektrische Pipettier-Spitzen mit unterschiedlichen Volumina der abgegebenen Tropfen verfügbar. Die Nano-Tip verfügte über ein Tropfenvolumen von etwa 450 pl und wurde als Standardspitze für alle Arrays auf Glasoberflächen eingesetzt. Für das Pipettieren auf den

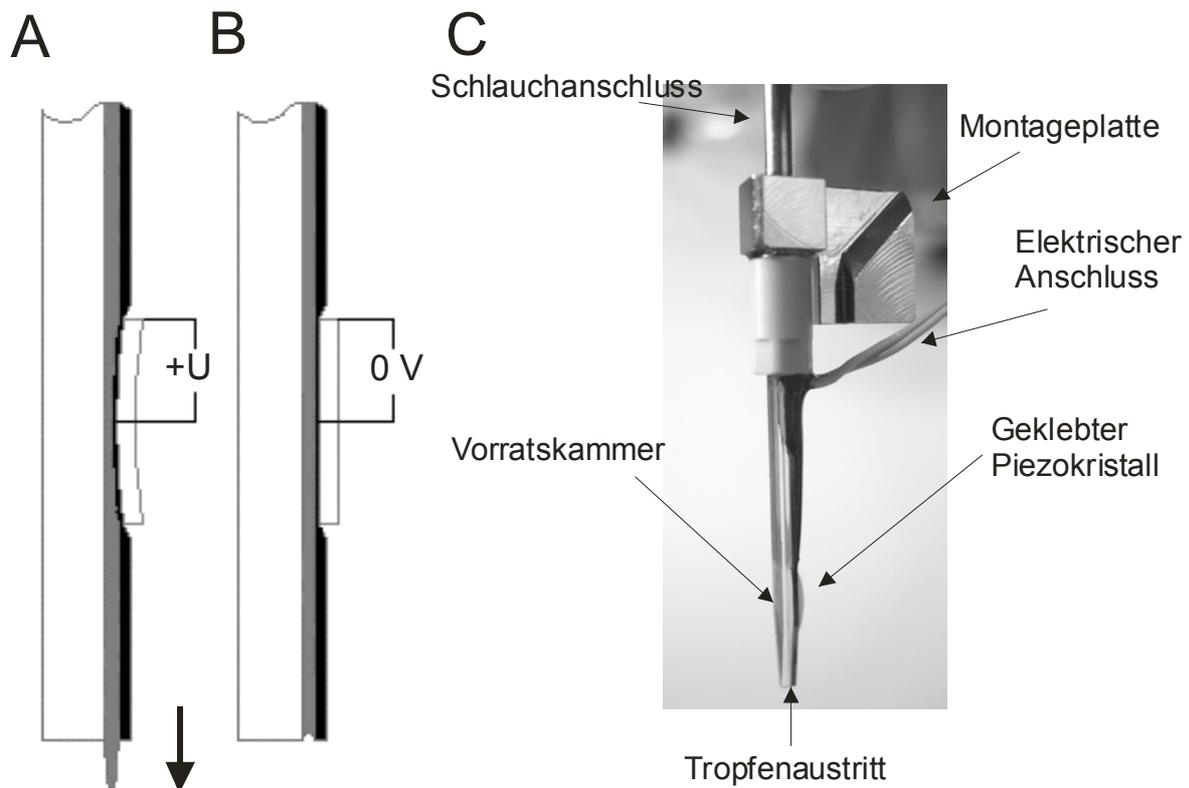


Abbildung 6.2: Schema des Funktionsprinzips der piezoelektrisch betriebenen Mikrodosierköpfe bei Tropfenabgabe (A) und im Ruhezustand (B). Aufbau der piezoelektrisch betriebenen Mikrodosierköpfe (C).

Mikrocantilevern war es nötig, kleinere Tropfen abzugeben. Hierfür wurde die Pico-Tip, die ein Tropfenvolumen von etwa 150 pl abgab, verwendet.

Das Erstellen der Mikroarrays erfolgte immer nach einem bestimmten Schema, das aus Probenaufnahme, Tropfenkontrolle, Tropfenabgabe, Spülen der Spitze und Entfernen überflüssigen Spülwassers bestand (Abb. 6.3).

Bei den meisten Anwendungen wurden die Arrays über Spalten, Reihen und Blöcke definiert. Die Abstände zwischen einzelnen Tropfen (bzw. zwischen Reihen/Spalten) variierten zwischen 320 μm und 600 μm . Für die Erstellung von Standardarrays auf funktionalisierten Glasoberflächen wurde das Transferlistenprogramm „transfer8.npl“ verwendet. Hierbei wurde in einer Text-Datei für jede zu pipettierende Substanz in einer festgelegten Formatierung angegeben, in welcher Position der 384er Mikrotiterplatte die Probe vom Roboter aufgenommen und in welcher Reihe und Spalte auf dem Array diese abzusetzen war. Wurde auf Deckgläser pipettiert (NTA-Arrays und NCL-Arrays), wurde jeweils ein Block (=1 Array) pro Deckglas pipettiert. Bei Arrays auf Objektträgern wurden 16 Arrays pro Träger pipettiert. Da für das Pipettieren auf den goldbeschichteten Mikrocantilevern keine festen Raster möglich waren, wurde eine manuelle Methode zur Festlegung der Abgabepunkte gewählt. Hierbei wurden auf einem Live-Bild über die passend justierte Mikroskopkamera die Punkte markiert an welche die Abgabe erfolgen sollte (Abbildung 4.33). Nun wurde über das Programm „WSP-check.npl“ die Feinjustierung der Pipette ausgeführt und nachfolgend durch Ausführen des Programms „TFL-basic2.npl“ das Peptid pipettiert. Dafür musste ebenfalls wieder eine korrekt formatierte Transferliste erstellt werden.

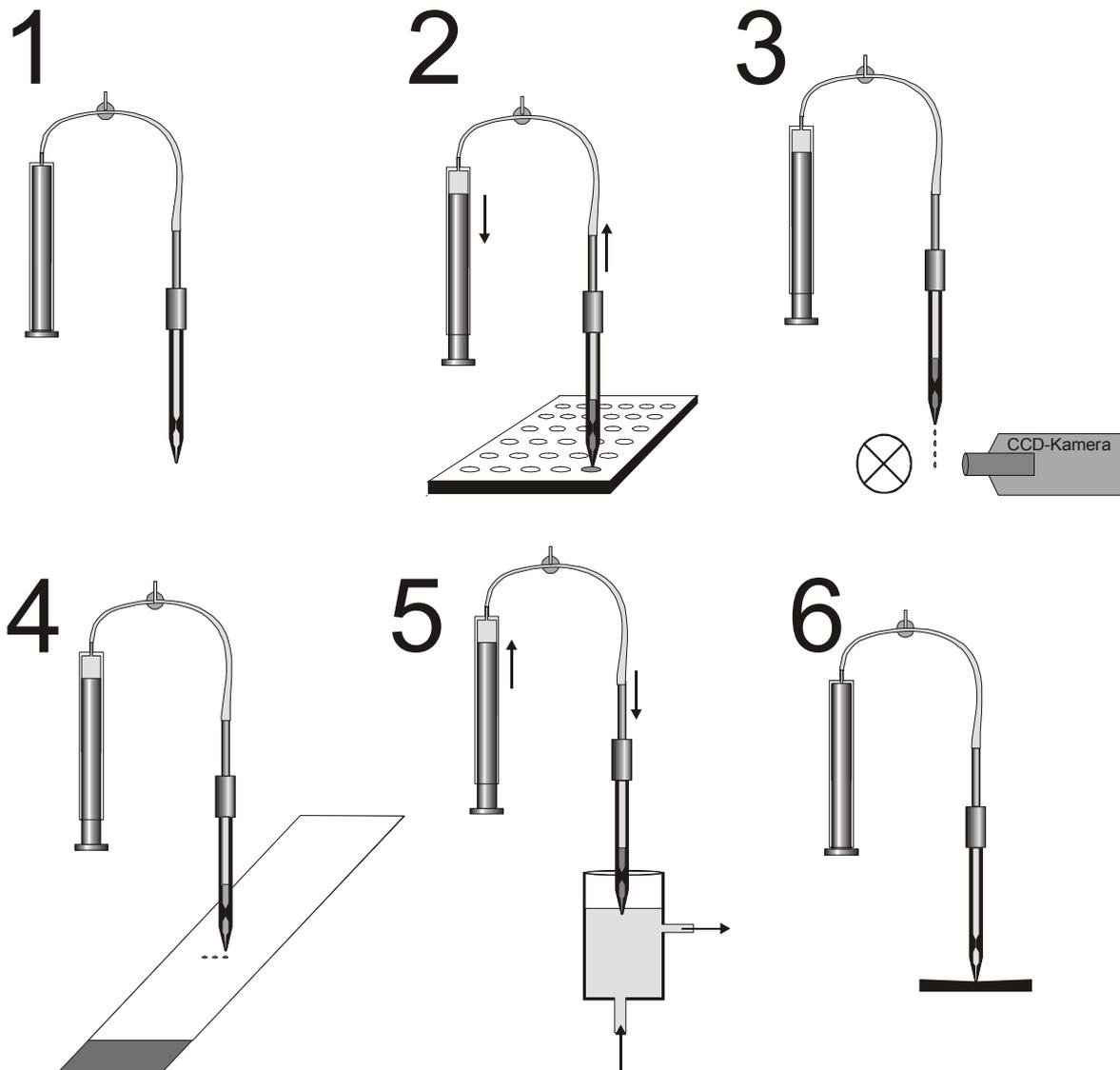


Abbildung 6.3: Arbeitsprinzip des Nanopipettier-Roboters. (1) mit Arbeitsflüssigkeit (Wasser) befüllte Spitze; (2) Probenaufnahme; (3) Tropfenkontrolle an der Stroboskopkamera; (4) Probenabgabe auf einen Objektträger; (5) Reinigen der Spitze mit Arbeitsflüssigkeit von 2 Seiten; (6) Abtupfen überflüssigen Wassers mit einem Flies.

6.6.5 Inkubationen und Waschen der Peptid- und NTA-Arrays

Nach dem Erstellen der Mikroarrays auf Glasoberflächen wurden die gespotteten Oberflächen entsprechend der beabsichtigten Reaktionszeit in der Umhausung auf den Kühlplatten belassen und bei längerer Reaktionszeit in eine mit feuchtem Zellstoff ausgekleidete Inkubationskammer gegeben. Die NTA-Arrays wurden für 1 h nach Beenden des Pipettierens in der befeuchteten Umhausung auf der Kühlplatte belassen, die Arrays auf Thiolesteroberflächen kamen in die beschriebenen Feuchtekammern für 3 h bei RT. Anschließend wurden NTA-Arrays und Peptidarrays getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Peptidarrays zunächst in einem Gefäß mit viel DMF für 1 h gewaschen. Es folgte ein Waschschrift von 1 h mit Aceton, dann ein Waschschrift in HBS-Puffer (pH = 7,3, 16 h). Nun wurden die Arrays mit Wasser abgespült und mit gereinigter Druckluft trocken geblasen. Ein Teil der Peptidarrays auf Thiolesteroberflächen wurde noch mit ACN (0,1% TFA) gewaschen gefolgt von einem Waschgang in Wasser und anschließendem Trockenblasen mit gereinigter Druckluft.

6.6.6 Inkubation und Waschen der Proteinarrays

Die Proteinarrays zur Testung der nativen chemischen Ligation für Kompatibilität mit biologischen Assaysystemen durften nicht eintrocknen, falls die Proteine in ihrer nativen Konformation bleiben sollten. Sie wurden deshalb nach dem Pipettieren in einer Feuchtekammer, die eine gesättigte NaCl-Lösung enthielt, bei 4°C für 3 h inkubiert. Sie wurden dann nach Aufbringen eines PDMS-Klemmrahmens (Abb. 6.4) zunächst mit Waschpuffer (PBS + 0,5% Tween20) geflutet und ausgeklopft. Nachfolgend wurde noch Kammer für Kammer 5 x mit dem gleichen Waschpuffer gewaschen. Proteinmikroarrays wurden für Bindungsexperimente mit Peptiden, die eine entsprechende Erkennungssequenz besaßen, stets bei 4°C feucht gehalten.

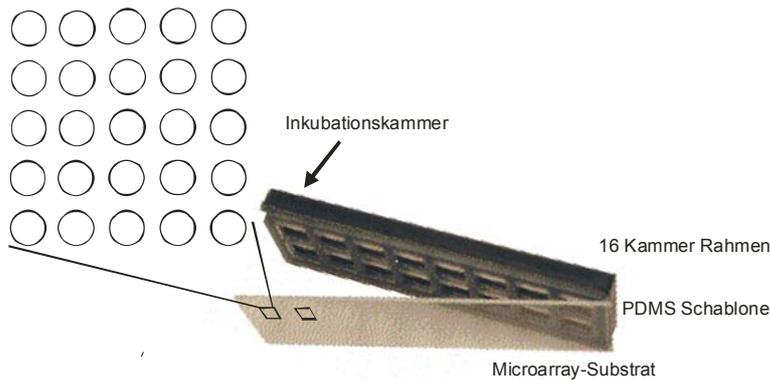


Abbildung 6.4: PDMS-Klemmrahmen mit 16 Inkubationskammern auf Mikroarray Substrat (Objektträger).

6.6.7 Nachweis von Peptiden auf Thiolesteroberflächen

Um die Peptide, die über eine myc-tag-Sequenz verfügten, auf Oberflächen nachzuweisen wurde die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die mit einem Array versehenen Oberflächen zunächst mit 1% TopBlock (Fluka) in HBS-Puffer gegen unspezifische Wechselwirkungen blockiert und nachfolgend 3 x mit HBS-Puffer gewaschen. Primärantikörper wurden in der Konzentration 4 $\mu\text{g/ml}$ in 0,1% BSA/HBS-Puffer (pH = 7,3) für 1 h bei RT, oder für 16 h bei 4°C auf dem Array inkubiert und nachfolgend 3 – 4 x mit 0,1% BSA in HBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der fluoreszent markierte Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:1000 in 0,1% BSA/HBS-Puffer zugegeben. Die Inkubationszeiten waren die gleichen wie bei Primärantikörpern. Nach intensivem Waschen konnten die Arrays getrocknet oder feucht mikroskopiert werden.

6.6.8 Nachweis von SHP-2C und MBP auf Thiolesteroberflächen

Um die beiden Proteine SHP-2C und MBP nachzuweisen wurden alle Kammern zunächst mit 1% TopBlock in HBS für eine Stunde blockiert und nachfolgend 5 x mit HBS (0,5% Tween20) gewaschen. Nun wurde die jeweilige Inkubationskammer des Klemmrahmens mit dem in Abschnitt 6.2 beschriebenen Anti-His₅-Primärantikörper und fluoreszentem Sekundärantikörper wie in Abschnitt 6.6.7 beschrieben inkubiert und konnte nachfolgend

feucht mikroskopiert werden. Um die Arrays mit den Phosphopeptiden zu inkubieren, wurden die Peptide in die entsprechende Konzentration auf ein Volumen von 50 μ l in PBS-Puffer gebracht und für mindestens eine Stunde auf den Arrays inkubiert. Dann wurde der Objektträger mit angeklebtem Inkubationsrahmen in die Mikroskophalterung eingelegt und immer die Kammer die betrachtet werden sollte zuvor 3 x mit PBS (0,5% Tween20) gewaschen.

6.6.9 Titration auf Arrays von NTA-Chelator-Histidin-Komplexen mit Imidazol

Bei Titrationen wurde das Deckglas nach dem Einspannen in die oben beschriebene Halterung zunächst mit je 1ml EDTA (10 mM) für jeweils 10 min gewaschen, um eine mögliche Metallionenkontamination der Chelatoren zu vermindern. Anschließend wurde kurz trocken geblasen, und für 10 min mit einer NiCl_2 -Lösung (10 mM) inkubiert. Nach kurzem Spülen mit Wasser wurde der Array mit 1 ml der wässrigen Ligandlösung für 30 min inkubiert und immer wieder gut durchmischt. Nach dem Einspannen in eine Aufnahme für die Deckglashalterung, und deren exaktem Ausrichten orthogonal zum Strahlengang des Mikroskops anhand von Kontrollspots links und rechts des eigentlichen Messarrays wurde ein Startbild des Arrays aufgenommen. Anschließend wurde eine kleine Menge einer Imidazol-Lösung (0,5 M) zugegeben und die Lösung durch Pipettieren immer mehrfach durchmischt. Nach etwa 4,5 min wurde erneut eine Aufnahme des Arrays gemacht, die Konzentration an Imidazol abermals erhöht und gut durchmischt. Dieser Vorgang wurde nun so oft wiederholt, bis die Helligkeit der Spots nicht weiter abnahm oder keine Spots mehr zu erkennen waren.

6.6.10 Auswertung der Aufnahmen der Titrationen von Arrays

Die Arrays wurden mit dem Programm Array-Pro Analyzer von Media Cybernetics Inc. (Silver Spring, Maryland, USA, Version 4.5.1.48) vermessen. Hierbei wurden immer die unbearbeiteten Originalbilder verwendet. Mit Array-Pro Analyzer wurde für jeden Spot zusätzlich ein lokaler Hintergrund in Form eines Ringes um den Spot ausgewertet und die mittlere Intensität dieses Rings von dem nicht normalisierten Spotsignal subtrahiert, um eventuelle ungleichmäßige Ausleuchtungen besser auszugleichen zu können. Da die

108

Arrays so angelegt waren, dass jeder Spot doppelt vorhanden war wurden gleiche Spots gruppiert und der Mittelwert über alle Pixel aus beiden Spots ausgewertet. Die Größe der vermessenen Spotflächen wurde variabel an die Spotgröße angepasst.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel XP (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim), sowie mit Microcal Origin 6.1. Mit Microcal Origin 6.1 (OriginLab Corporation, MA, USA) wurden auch die Dissoziationskurven angepasst und daraus die EC_{50} -Werte bestimmt.

6.7 Beschichtung von Mikrocantilevern für die Biosensorik

6.7.1 Herstellung von Cantileverarrays

Die Herstellung der unbeschichteten Cantilever wurde von Herrn Dipl. Phys. Andreas Heeren (Institut für angewandte Physik, Universität Tübingen) durchgeführt. Silizium-Wafer für die Cantileverherstellung wurden aus 3-Zoll Si-Wafer (100 Orientierung, Wacker, Burghausen) herausgeschnitten. Das PECVD-Verfahren (Abb. 6.6) zum Aufbau der Siliziumnitridschicht wurde in einem Oxford Plasmalab 80 plus (Oxford Instruments, Bristol, UK) durchgeführt. Reaktionsgase waren Monosilan (SiH_4), Ammoniak (NH_3) und Distickstoffdioxid (N_2O). Die Reaktionszeit wurde so eingestellt, dass eine 300 nm dicke Siliziumnitridschicht erzeugt wurde.

Die Lithographie wurde mit einem optischen Belichter (Karl Süss, München) bei 436 nm durchgeführt. Auf die Siliziumnitridschicht des Si-Wafers wurde zuvor ein Photolack (ma-P 215s, micro resist technology, Berlin) durch Spincoating aufgebracht. Dabei wurde zunächst bei 2000 U / min 5 s angeschleudert und anschließend weitere 40 s bei 5000 U / min geschleudert, um eine Lackdicke von ca. 1,6 μm zu erhalten. Danach wurde der mit Photolack beschichtete Wafer auf einer Heizplatte 3 min bei 90 °C erhitzt und anschließend mit Hilfe einer Chrommaske 20 s kontaktbelichtet. Die Entwicklung erfolgte mit einem alkalisch anorganischen Entwickler (ma-D 371, micro resist technology) über 60 s. Anschließendes Waschen mit deionisiertem Wasser, gefolgt von 3 min Erhitzen bei 120 °C führte zum Ausbacken der unbelichteten Lackschicht.

Reaktives Ionenätzen der Siliziumnitridschicht erfolgte wieder im Oxford Plasmalab 80plus. Als Prozessgas wurde eine Mischung aus Trifluormethan (CHF_3) und Sauerstoff verwendet. Die Prozessdauer betrug 10 min bei einer Ätzrate von ca. 120 nm / min.

Die Bedampfung mit Chrom und Gold erfolgte in einer Aufdampfanlage (Balzers Verschleißschutz, Bingen) über Elektronenstrahl-Verdampfung bzw. Widerstandsheizung. Eine 3 nm Chromschicht wurde zuerst über Elektronenstrahl-Verdampfung aufgebracht und anschließend erfolgte die Bedampfung mit Gold (30 nm) über eine Widerstandsheizung.

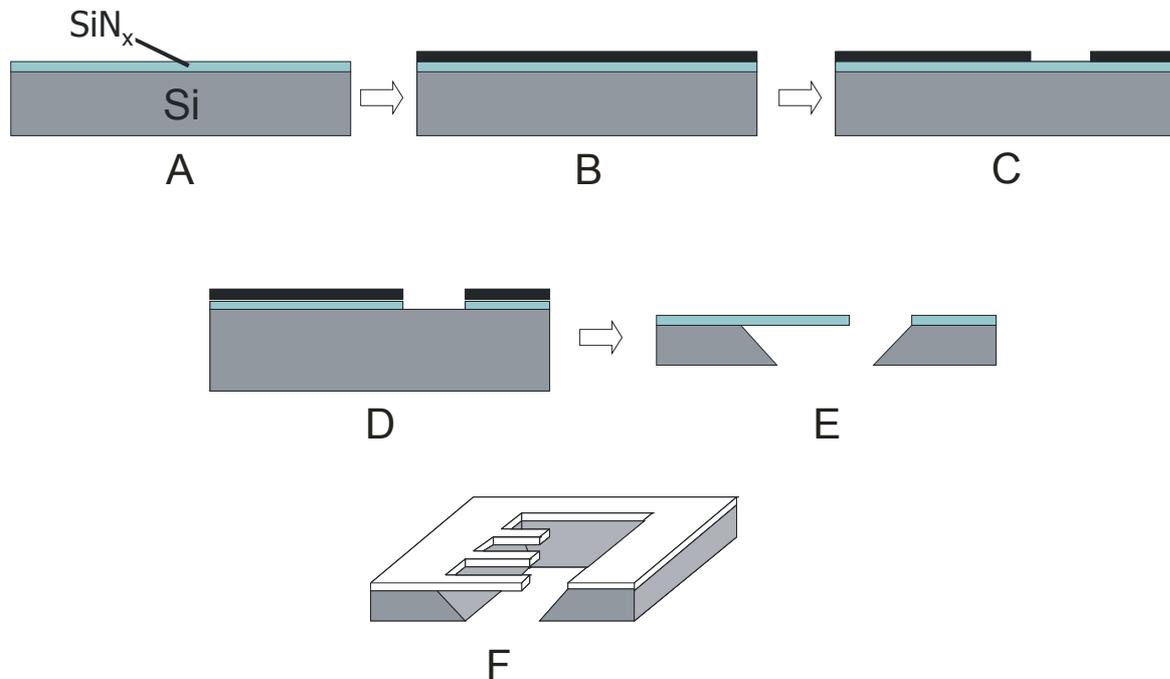


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung der Cantileverherstellung. (A) Siliziumnitridschicht auf Si-Wafer durch PECVD. (B) Abdecken der SiN_x-Schicht durch Fotolack. (C) Herstellen der Cantileverstruktur durch optische Lithografie. (D) Übertragen der Cantileverstruktur auf die SiN_x-Schicht durch reaktives Ionenätzen. (E) Freiätzen der SiN_x-Cantilever durch nasschemisches Ätzen. (F) Unbedampfter (goldfreier) Array nach Ende der obigen Prozedur.^[68]

6.7.2 Funktionalisierung einzelner Cantilever

Frisch mit Gold bedampfte Cantileverarrays wurden sofort auf eine gekühlte Platte des Nanopipettier-Roboters verbracht. Anschließend wurde die Luftfeuchtigkeit in der Umhausung des Roboters auf die Nähe des Taupunkts auf den Goldoberflächen erhöht. Das Peptid OM-P18, das in einer Konzentration der Stammlösung von 5 mM in DMF vorlag, wurde mit NH₄Ac-Puffer (10 mM, pH = 7,3) auf 500 μM verdünnt und in eine Mikrotiterplatte gegeben. Nun wurden die Arrays wie in den Abschnitten 6.65 und 4.5 beschrieben so erstellt, dass immer nur jeder zweite Cantilever beschichtet wurde.

Nachfolgend wurden die Cantileverarrays in einer feuchten Inkubationskammer für 16 h inkubiert und anschließend mit DMF, Aceton, Wasser (jeweils 1 h) und HBS (16 h) gewaschen. Nun wurden die Arrays vorsichtig in Ethanol gespült und auf einer warmen Heizplatte (~ 37 °C) getrocknet. Dabei sollten sich die durch das Lösungsmittel evtl. an den Seiten hängenden Cantilever wieder aufrichten. War dies nicht der Fall, wurde die Ethanolspülung wiederholt.

6.7.3 Nachweis der Anbindung des Antikörpers über Fluoreszenz

Nach 16 h Inkubationszeit des Peptids auf der Goldoberfläche wurde der Array getrocknet und mit verschiedenen Lösungsmitteln in der Reihenfolge DMF-Aceton-Acetonitril-PBS-H₂O-EtOH für jeweils 3 h gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Cantileverarray mit Top-Block (1%) blockiert und der gesamte Array einer Immunfluoreszenzfärbung, wie in Abschnitt 6.6.7 beschrieben unterzogen. Dabei wurde der mit Alexa546 fluoreszent markierte Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG, Dianova) verwendet. Anschließend wurde der Array mit einem aufrechten Epifluoreszenzmikroskop untersucht.

6.8 Molecular Modeling

6.8.1 Hardware und Software

Die Berechnung der Systemenergien und die Visualisierungen der Strukturen aus Oligohistidinen und NTA-Molekülen wurden auf einer SGI Octane Workstation (Silicon Graphics, Mountain View, USA) ausgeführt. Die verwendete Modeling-Software war InsightII (Accelrys Inc., San Diego, USA). Die genutzten Module waren Biopolymer, Sketcher und Discover. Mit Hilfe von InsightII konnten die Moleküle manipuliert und visualisiert werden. Das Biopolymer- und das Sketcher-Modul wurden für das Erstellen der NTA-Moleküle und der Oligohistidine verwendet. Mit Accelrys Discover und Accelrys Discover3 erfolgten die molekulardynamischen Berechnungen zu den Konformationen und Energien auf der Grundlage der Newtonschen Gesetze. Bis auf die Arbeiten, die mit Hilfe des Discover3 Moduls durchgeführt wurden, konnten alle Arbeitsschritte auf einer graphisch basierten Oberfläche erfolgen. Für die Berechnung der Konformationen musste die Festlegung der Geometrien der NTA-Ni²⁺-Histidin-Komplexe durch eine Textdatei in

vorgegebener Formatierung erfolgen (siehe Anhang). Zuerst wurden Hexahistidin und Dekahistidin mit dem Builder-Modul erstellt und minimiert. Nachfolgend wurde aus der Cambridge-Datenbank eine Röntgenstruktur eines Ni^{2+} -NTA-Komplexes im PDB-Format^[145] in InsightII importiert. Die zusätzlichen Atome und Moleküle, die in dieser Struktur enthalten waren, wurden gelöscht. Nachfolgend wurde der erhaltene Komplex parametrisiert (automatisch). Da dies für Ni^{2+} -Ionen nicht automatisch möglich war, wurde für dieses Atom im ESFF-Kraftfeld eine oktaedrische Koordination bei gleichzeitiger zweifach positiver Ladung für Nickel ausgewählt. Negative Ladungen wurden für die Sauerstoffatome an den NTA-Gruppen eingestellt. Dann wurde der NTA-Komplex am α -Kohlenstoff einer Acetatgruppe mit einem Kohlenstoffgerüst verbunden, so dass ein Mono- Ni^{2+} -NTA-Komplex entstand. Da die Atome des NTA-Komplexes bei einer Minimierung als auch bei einer Molekulardynamik ihre Position zueinander stark veränderten, wurden die Bindungspartner durch Vorgabe von Bindungslängen und -winkeln mit hohen Kraftkonstanten miteinander verankert (siehe Anhang). Parallel dazu wurde Ni^{2+} und Hexahistidin minimiert, wobei keine Beschränkungen bezüglich Bindungslängen, -winkel, etc. notwendig waren (Kontrolle der Parametrisierung, vergleiche Abschnitt 4.4). Nach Platzierung eines Ni^{2+} -Ions (Parametrisierung wie oben) knapp 3 Å entfernt von einem Imidazolring eines Histidins wurde durch Minimierung eine Chelatbildung ohne Einsatz von Beschränkungen automatisch erreicht. Nachfolgend wurde Histidin am Ni^{2+} -NTA-Chelatkomplex platziert. Bei Minimierungen waren hier Beschränkungen notwendig um einen vernünftigen Bindungsabstand bei gleichzeitiger oktaedrischer Koordination des Nickels zu erhalten.

Als Methode zur Erzeugung verschiedener Konformationen des Oligohistidins und der sich daraus ergebenden Energien der Komplexe wurde ein Annealing-Verfahren gewählt. Dabei wurde das System, in dem sich die Moleküle befanden, virtuell sehr schnell auf eine hohe Temperatur erhitzt und anschließend langsam wieder abgekühlt. Der Vorgang wurde viele Male wiederholt und jedes Mal die Energie des Systems abgespeichert. Die Methode diente dazu, um lokale Energieminima zu überwinden und nicht immer wieder die gleiche energetisch günstige Konformation innerhalb zweier Energiemaxima einzunehmen. Die Molekulardynamik-Parameter wurden zusammen mit den geometrischen Beschränkungen in einer Skriptdatei erstellt und von Discover3 direkt eingelesen. Eine solche Eingabedatei ist im Anhang dargestellt. Zunächst wurde dabei immer eine kurze Annealingsequenz verwendet, um mögliche Fehler in der Skriptdatei an der dabei entstandenen Struktur zu

erkennen, da der nachfolgende große Annealingschritt sehr viel Zeit in Anspruch nahm, so dass nach Möglichkeit keine unnötige Rechenzeit verbraucht wurde.

Alle Energieminimierungen der oben genannten Strukturen sowie die molekulardynamischen Untersuchungen wurden mit dem ESFF-Kraftfeld (Extensible Systematic ForceField) innerhalb des Discover3-Moduls in InsightII durchgeführt.

7 Anhang

Eingabedatei für Discover3

Nachfolgend aufgeführt ist ein Beispiel für eine BTC1-Eingabedatei für Discover3 in InsightII. Enthalten sind die Parameter für das Simulated Annealing, die Minimierung und die initialen Bedingungen. Die geometrischen Restriktionen wurden für jedes durchgeführte Simulated Annealing entsprechend den gewünschten Geometrien geändert, d.h. die Ni²⁺-NTA-Komplexe wurden mit den jeweils gewünschten Histidinen verbunden. Die Festlegung der Bindungslängen und -winkel der Restriktionen ist beispielhaft wie folgt:

```
1#Stage Name: 2 restraint
2 restraint create "2__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C4"
3 restraint function "2__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
4 restraint target "2__restraint" "1.48"
```

Zeile 1: Dient der besseren Orientierung bei der Festlegung eines Programmblocks (z.B. Minimierung, Restriktion, Molekulardynamik).

Zeile 2: Gibt zum einen an, dass eine Bindungslänge (distance) festgelegt werden soll und definiert die beteiligten Atome (InsightII-Nummerierung).

Zeile3: Definiert welche Funktion auf die Restriktion angewendet werden soll (quadratic), und wie groß die Kraftkonstante sein soll, bei Auslenkung in die eine oder andere Richtung.

Zeile4: Gibt den Wert für die Bindungslänge an (1,48).

```
#BIOSYM btcl 3
#
# Input File For Discover Generated By Insight 2000
# Date: Mon Apr 19 15:12:18 2004
# User Name: ta
# Host Name: modeler
# Host Type: iris
#
# System Name: NTA210HIS_7
```

```
#
#Stage Name: 1 begin
begin
#
set esffCalculateCharges 0
#
#Zunächst Restraints im NTA"01B" und NTA"1"
#
#NTA"01B"
#
#Stage Name: 2 restraint
restraint create "2__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C4"
restraint function "2__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "2__restraint" "1.48"
#
#Stage Name: 3 restraint
restraint create "3__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C2"
restraint function "3__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "3__restraint" "1.48"
#
#Stage Name: 4 restraint
restraint create "4__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C"
restraint function "4__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "4__restraint" "1.47"
#
#Stage Name: 5 restraint
restraint create "5__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C4" "NTA210HIS_7:01B:C5"
restraint function "5__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "5__restraint" "1.53"
#
#Stage Name: 6 restraint
restraint create "6__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C2" "NTA210HIS_7:01B:C3"
restraint function "6__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "6__restraint" "1.52"
#
#Stage Name: 7 restraint
restraint create "7__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C" "NTA210HIS_7:01B:C1"
restraint function "7__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "7__restraint" "1.52"
#
#Stage Name: 8 restraint
```

```
restraint create "8__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C5" "NTA210HIS_7:01B:O7"
restraint function "8__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "8__restraint" "1.24"
#
#Stage Name: 9 restraint
restraint create "9__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C3" "NTA210HIS_7:01B:O5"
restraint function "9__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "9__restraint" "1.25"
#
#Stage Name: 10 restraint
restraint create "10__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C1" "NTA210HIS_7:01B:O3"
restraint function "10__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "10__restraint" "1.25"
#
#Stage Name: 11 restraint
restraint create "11__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C5" "NTA210HIS_7:01B:O6"
restraint function "11__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "11__restraint" "1.27"
#
#Stage Name: 12 restraint
restraint create "12__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C1" "NTA210HIS_7:01B:O2"
restraint function "12__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "12__restraint" "1.27"
#
#Stage Name: 13 restraint
restraint create "13__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:C3" "NTA210HIS_7:01B:O4"
restraint function "13__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "13__restraint" "1.26"
#
#Stage Name: 14 restraint
restraint create "14__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:O6" "NTA210HIS_7:01B:NI"
restraint function "14__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "14__restraint" "2.06"
#
#Stage Name: 15 restraint
restraint create "15__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:O4" "NTA210HIS_7:01B:NI"
restraint function "15__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "15__restraint" "2.03"
#Stage Name: 16 restraint
restraint create "16__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:O2" "NTA210HIS_7:01B:NI"
restraint function "16__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
```

```
restraint target "16__restraint" "2.08"
#
#Stage Name: 17 restraint
restraint create "17__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C2" "NTA210HIS_7:01B:N"
"NTA210HIS_7:01B:C4" "NTA210HIS_7:01B:C5"
restraint function "17__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "17__restraint" "-77.40"
#
#Stage Name: 18 restraint
restraint create "18__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C3" "NTA210HIS_7:01B:C2"
"NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C4"
restraint function "18__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "18__restraint" "118.27"
#
#Stage Name: 19 restraint
restraint create "19__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C1" "NTA210HIS_7:01B:C"
"NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C2"
restraint function "19__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "19__restraint" "91.73"
#
#Stage Name: 20 restraint
restraint create "20__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C4"
"NTA210HIS_7:01B:C5" "NTA210HIS_7:01B:O7"
restraint function "20__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "20__restraint" "155.81"
#
#Stage Name: 21 restraint
restraint create "21__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C2"
"NTA210HIS_7:01B:C3" "NTA210HIS_7:01B:O5"
restraint function "21__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "21__restraint" "178.57"
#
#Stage Name: 22 restraint
restraint create "22__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:N" "NTA210HIS_7:01B:C"
"NTA210HIS_7:01B:C1" "NTA210HIS_7:01B:O3"
restraint function "22__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "22__restraint" "-169.94"
#
#Stage Name: 23 restraint
restraint create "23__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C4" "NTA210HIS_7:01B:C5"
"NTA210HIS_7:01B:O6" "NTA210HIS_7:01B:NI"
```

```
restraint function "23__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "23__restraint" "-2.81"
#
#Stage Name: 24 restraint
restraint create "24__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C2" "NTA210HIS_7:01B:C3"
"NTA210HIS_7:01B:O4" "NTA210HIS_7:01B:NI"
restraint function "24__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "24__restraint" "-3.66"
#
#Stage Name: 25 restraint
restraint create "25__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C" "NTA210HIS_7:01B:C1"
"NTA210HIS_7:01B:O2" "NTA210HIS_7:01B:NI"
restraint function "25__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "25__restraint" "6.39"
#
#Stage Name: 26 restraint
restraint create "26__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C5" "NTA210HIS_7:01B:O6"
"NTA210HIS_7:01B:NI" "NTA210HIS_7:01B:O4"
restraint function "26__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "26__restraint" "104.53"
#
#Stage Name: 27 restraint
restraint create "27__restraint" torsion "NTA210HIS_7:01B:C1" "NTA210HIS_7:01B:O2"
"NTA210HIS_7:01B:NI" "NTA210HIS_7:01B:O4"
restraint function "27__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "27__restraint" "-101.34"
#
#
#NTA"1B" bzw. "1C"
#
#
#Stage Name: 28 restraint
restraint create "28__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C15"
restraint function "28__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "28__restraint" "1.48"
#
#Stage Name: 29 restraint
restraint create "29__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C13"
restraint function "29__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "29__restraint" "1.48"
#
```

```
#Stage Name: 30 restraint
restraint create "30__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C11"
restraint function "30__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "30__restraint" "1.47"
#
#Stage Name: 31 restraint
restraint create "31__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C15" "NTA210HIS_7:1C:C16"
restraint function "31__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "31__restraint" "1.53"
#
#Stage Name: 32 restraint
restraint create "32__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C13" "NTA210HIS_7:1C:C14"
restraint function "32__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "32__restraint" "1.52"
#
#Stage Name: 33 restraint
restraint create "33__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C11" "NTA210HIS_7:1C:C12"
restraint function "33__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "33__restraint" "1.52"
#
#Stage Name: 34 restraint
restraint create "34__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C16" "NTA210HIS_7:1C:O9"
restraint function "34__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "34__restraint" "1.24"
#
#Stage Name: 35 restraint
restraint create "35__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C14" "NTA210HIS_7:1C:O7"
restraint function "35__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "35__restraint" "1.25"
#
#Stage Name: 36 restraint
restraint create "36__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C12" "NTA210HIS_7:1C:O5"
restraint function "36__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "36__restraint" "1.25"
#
#Stage Name: 37 restraint
restraint create "37__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C16" "NTA210HIS_7:1C:O8"
restraint function "37__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "37__restraint" "1.27"
#
#Stage Name: 38 restraint
```

```
restraint create "38__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C12" "NTA210HIS_7:1C:O4"
restraint function "38__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "38__restraint" "1.27"
#
#Stage Name: 39 restraint
restraint create "39__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:C14" "NTA210HIS_7:1C:O6"
restraint function "39__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "39__restraint" "1.26"
#
#Stage Name: 40 restraint
restraint create "40__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:O8" "NTA210HIS_7:1B:NI1"
restraint function "40__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "40__restraint" "2.06"
#
#Stage Name: 41 restraint
restraint create "41__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:O6" "NTA210HIS_7:1B:NI1"
restraint function "41__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "41__restraint" "2.03"
#
#Stage Name: 42 restraint
restraint create "42__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:O4" "NTA210HIS_7:1B:NI1"
restraint function "42__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "42__restraint" "2.08"
#
#Stage Name: 43 restraint
restraint create "43__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C13" "NTA210HIS_7:1C:N10"
"NTA210HIS_7:1C:C15" "NTA210HIS_7:1C:C16"
restraint function "43__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "43__restraint" "-77.40"
#
#Stage Name: 44 restraint
restraint create "44__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C14" "NTA210HIS_7:1C:C13"
"NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C15"
restraint function "44__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "44__restraint" "118.27"
#
#Stage Name: 45 restraint
restraint create "45__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C12" "NTA210HIS_7:1C:C11"
"NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C13"
restraint function "45__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "45__restraint" "91.73"
```

```
#
#Stage Name: 46 restraint
restraint create "46__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C15"
"NTA210HIS_7:1C:C16" "NTA210HIS_7:1C:O9"
restraint function "46__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "46__restraint" "155.81"
#
#Stage Name: 47 restraint
restraint create "47__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C13"
"NTA210HIS_7:1C:C14" "NTA210HIS_7:1C:O7"
restraint function "47__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "47__restraint" "178.57"
#
#Stage Name: 48 restraint
restraint create "48__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:N10" "NTA210HIS_7:1C:C11"
"NTA210HIS_7:1C:C12" "NTA210HIS_7:1C:O5"
restraint function "48__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "48__restraint" "-169.94"
#
#Stage Name: 49 restraint
restraint create "49__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C15" "NTA210HIS_7:1C:C16"
"NTA210HIS_7:1C:O8" "NTA210HIS_7:1B:NI1"
restraint function "49__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "49__restraint" "-2.81"
#
#Stage Name: 50 restraint
restraint create "50__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C13" "NTA210HIS_7:1C:C14"
"NTA210HIS_7:1C:O6" "NTA210HIS_7:1B:NI1"
restraint function "50__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "50__restraint" "-3.66"
#
#Stage Name: 51 restraint
restraint create "51__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C11" "NTA210HIS_7:1C:C12"
"NTA210HIS_7:1C:O4" "NTA210HIS_7:1B:NI1"
restraint function "51__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "51__restraint" "6.39"
#
#Stage Name: 52 restraint
restraint create "52__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C16" "NTA210HIS_7:1C:O8"
"NTA210HIS_7:1B:NI1" "NTA210HIS_7:1C:O6"
restraint function "52__restraint" cosine "10000.0" "1"
```

```

restraint target "52__restraint" "104.53"
#
#Stage Name: 53 restraint
restraint create "53__restraint" torsion "NTA210HIS_7:1C:C12" "NTA210HIS_7:1C:O4"
"NTA210HIS_7:1B:NI1" "NTA210HIS_7:1C:O6"
restraint function "53__restraint" cosine "10000.0" "1"
restraint target "53__restraint" "-101.34"
#
#
#Restraints zwischen DekaHis und NTA"01B" und NTA"1B"
#
#
#NTA"01B"
#
#Stage Name: 54 restraint
restraint create "54__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:NI" "NTA210HIS_7:2:ND1"
restraint function "54__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "54__restraint" "2.04"
#
#Stage Name: 55 restraint
restraint create "55__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:O2" "NTA210HIS_7:2:ND1"
restraint function "55__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "55__restraint" "2.96"
#
#Stage Name: 56 restraint
restraint create "56__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:O6" "NTA210HIS_7:2:ND1"
restraint function "56__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "56__restraint" "3.13"
#
#Stage Name: 57 restraint
restraint create "57__restraint" distance "NTA210HIS_7:01B:O4" "NTA210HIS_7:2:ND1"
restraint function "57__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"
restraint target "57__restraint" "2.97"
#
#
#NTA"1B"
#
#
#Stage Name: 58 restraint
restraint create "58__restraint" distance "NTA210HIS_7:1B:NI1" "NTA210HIS_7:9:ND1"
restraint function "58__restraint" quadratic "10000.0" "10000.0"

```

```
restraint target "58__restraint" "2.10"
#
#Stage Name: 59 restraint
restraint create "59__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:O8" "NTA210HIS_7:9:ND1"
restraint function "59__restraint" quadratic "100.0" "1000.0"
restraint target "59__restraint" "3.13"
#
#Stage Name: 60 restraint
restraint create "60__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:O4" "NTA210HIS_7:9:ND1"
restraint function "60__restraint" quadratic "100.0" "1000.0"
restraint target "60__restraint" "2.96"
#
#Stage Name: 61 restraint
restraint create "61__restraint" distance "NTA210HIS_7:1C:O6" "NTA210HIS_7:9:ND1"
restraint function "61__restraint" quadratic "100.0" "1000.0"
restraint target "61__restraint" "2.97"
#
#Stage Name: 62 nonbonds
forcefield nonbond \
  -separate_coulomb \
  vdw \
    summation_method = atom_based \
    cutoff = 9.5 spline_width = 1.0 buffer_width = 0.5 \
  coulomb \
    -distance_dependent_dielectric \
    dielectric_value = 1.0
#
#
#Stage Name: 63 minimize
set esffUseQuadratic 1
minimize iteration_limit = 10
set esffUseQuadratic 0
#
minimize \
  iteration_limit = 3000 movement_limit = 0.200 \
  sd \
    convergence = 100.0 line_search_precision = 0.100 \
    iteration_limit = 5000 \
  cg \
    convergence = 10.0 method = polak \
    line_search_precision = 0.100 \
```

```

cg \
  convergence = 0.01 method = polak \
  line_search_precision = 0.500 \
newton \
  convergence = 0.001 method = bfgs \
  line_search_precision = 0.900 max_atoms = 200 \
final_convergence = 0.001
#
writeFile coordinate filename = .cor
#
#Stage Name: 64 dynamics
#
#
# --- initialization
#
#
$temp = 1000
#
dynamics \
time = 5000 timestep = 1.0 \
initial_temperature = $temp +boltzmann \
ensemble = nvt \
temperature_control_method = velocity_scaling \
integration_method = Velocity_verlet \
temperature_window = 10 \
temperature = $temp \
deviation = 5000
#
#
# --- dynamic loop
#
$frame = 1
while {$frame < 300} {
dynamics \
time = 3000 timestep = 1.0 -boltzmann \
ensemble = nvt \
temperature_control_method = velocity_scaling \
integration_method = Velocity_verlet \
temperature = $temp temperature_window = 10 \
deviation = 5000
#

```

```
#
# --- cooling
#
#
$temp = 1000
while {$temp > 250} {
dynamics \
time = 3000 timestep = 1.0 -boltzmann \
ensemble = nvt \
temperature_control_method = velocity_scaling \
integration_method = Velocity_verlet \
temperature = $temp temperature_window = 10 \
deviation = 5000
$temp = $temp-50
}
#
#
# ---minimization
#
#
minimize \
method = steepest \
iteration_limit = 100 movement_limit = 0.200 \
sd \
convergence = 10.0 line_search_precision = 0.100 \
iteration_limit = 5000 \
method = conjugate \
cg \
convergence = 10.0 method = polak \
line_search_precision = 0.100 \
cg \
convergence = 0.001 method = polak \
line_search_precision = 0.500 \
final_convergence = 0.001 \
execute command = {print output +energy_summary}
#
#
# ---record results
#
#
writeFile archive frame = $frame
```

```
#  
echo This is the actual frame-number: $frame  
#  
$frame = $frame+1  
#  
#  
# ---reheating the ensemble to 1000K  
#  
$temp = 1000  
#  
dynamics \  
time = 5000 timestep = 1.0 \  
temperature = $temp +boltzmann \  
ensemble = nvt \  
temperature_control_method = velocity_scaling \  
integration_method = Velocity_verlet \  
temperature_window = 10 \  
deviation = 5000  
}  
#  
# ---End
```

8 Literatur

- [1] Keusgen, M.; *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 433-444.
- [2] Niemeyer, C. M.; Blohm, D.; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039-3043.
- [3] Niemeyer, C. M.; Blohm, D.; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **1999**, *38*, 2865-2869.
- [4] Reimer, U.; Reineke, U.; Schneider-Mergener, J.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 315-320.
- [5] Fodor, S. P.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D.; *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [6] Pease, A. C.; Solas, D.; Sullivan, E. J.; Cronin, M. T.; Holmes, C. P.; Fodor, S. P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5022-5026.
- [7] Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O.; *Science* **1995**, *270*, 467-470.
- [8] Chen, G. Y. J.; Uttamchandani, M.; Lue, R. Y. P.; Lesaichere, M. L.; Yao, S. Q.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 705-724.
- [9] MacBeath, G.; Schreiber, S. L.; *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.
- [10] Templin, M. F.; Stoll, D.; Bachmann, J.; Joos, T. O.; *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, *7*, 223-229.
- [11] Tomizaki, K.-Y.; Usui, K.; Mihara, H.; *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1-18.
- [12] Kodadek, T.; *Chem. Biol.* **2001**, *2001*, 105-115.
- [13] Lee, B. H.; Nagamune, T.; *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **2004**, *9*, 69-75.
- [14] Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M.; *Science* **2001**, *293*, 2101-2105.

- [15] Haab, B. B.; Dunham, M. J.; Brown, P. O.; *Genome Biol.* **2001**, *2*, research0004.1-research0004.13.
- [16] MacBeath, G.; Koehler, A. N.; Schreiber, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967-7968.
- [17] Jung, G.; *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*; Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.
- [18] Jung, G.; *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook*; Wiley-VCH: Weinheim, **1996**.
- [19] Stoevesandt, O.; Elbs, M.; Köhler, K.; Lellouch, A. C.; Fischer, R.; André, T.; Brock, R.; *Proteomics* **2005**, *5*, 2010-2017.
- [20] Wolf, S., *Analyse molekularer Wechselwirkungen in der T-Zell-Signaltransduktion mit synthetischen Peptiden*, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **2005**.
- [21] Mehrvar, M.; Abdi, M.; *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 1113-1126.
- [22] Homola, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 528-539.
- [23] Tipple, C. A.; Lavrik, N. V.; Culha, M.; Headrick, J.; Datskos, P.; Sepaniak, M. J.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3118-3126.
- [24] Janshoff, A.; Steinem, C.; *Methods Mol. Biol.* **2005**, *305*, 47-64.
- [25] Albers, J.; Grunwald, T.; Nebling, E.; Piechotta, G.; Hintsche, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 521-527.
- [26] Raiteri, R.; Grattarola, M.; Butt, H. J.; Skladal, P.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *79*, 115-126.
- [27] Thundat, T.; Oden, P. I.; Warmack, R. J.; *Microscale Thermophys. Eng.* **1997**, *1*, 185-199.
- [28] Kröger, K.; Bauer, J.; Fleckenstein, B.; Rademann, J.; Jung, G.; Gauglitz, G.; *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 937-944.

- [29] Birkert, O.; Tünnemann, R.; Jung, G.; Gauglitz, G.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 834-840.
- [30] Haake, H. M.; Tünnemann, R.; Brecht, A.; Austel, V.; Jung, G.; Gauglitz, G.; *Anal. Biochem.* **2002**, *300*, 107-112.
- [31] Tünnemann, R.; Mehlmann, M.; Süßmuth, R. D.; Bühler, B.; Pelzer, S.; Wohlleben, W.; Fiedler, H. P.; Wiesmüller, K.-H.; Gauglitz, G.; Jung, G.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4313-4318.
- [32] Birkert, O.; Haake, H. M.; Schutz, A.; Mack, J.; Brecht, A.; Jung, G.; Gauglitz, G.; *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 200-208.
- [33] Haake, H. M.; Schutz, A.; Gauglitz, G.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 576-585.
- [34] Hänel, C.; Gauglitz, G.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, *372*, 91-100.
- [35] Leipert, D.; Rathgeb, F.; Herold, M.; Mack, J.; Gauglitz, G.; Jung, G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392*, 213-221.
- [36] Leipert, D.; Heiduschka, P.; Mack, J.; Egelhaaf, H. J.; Oelkrug, D.; Jung, G.; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **1998**, *37*, 2338-2340.
- [37] Leipert, D.; Nopper, D.; Bauser, M.; Gauglitz, G.; Jung, G.; *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3503-3505.
- [38] Edwards, P. R.; Gill, A.; Pollard-Knight, D. V.; Hoare, M.; Buckle, P. E.; Lowe, P. A.; Leatherbarrow, R. J.; *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 210-217.
- [39] Rich, R. L.; Day, Y. S.; Morton, T. A.; Myszka, D. G.; *Anal. Biochem.* **2001**, *296*, 197-207.
- [40] Kienle, S.; Lingler, S.; Kraas, W.; Offenhäusser, A.; Knoll, W.; Jung, G.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 779-786.
- [41] Palmer, F.; Stingel, C.; Tünnemann, R.; Mack, H. G.; Jung, G.; Hoffmann, V.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2004**, *60*, 1739-1750.

- [42] Palmer, F.; Stingel, C.; Tünnemann, R.; Mack, H. G.; Jung, G.; Hoffmann, V.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 825-834.
- [43] Palmer, F.; Tünnemann, R.; Leipert, D.; Stingel, C.; Jung, G.; Hoffmann, V.; *J. Mol. Struct.* **2005**, *563*, 153-157.
- [44] Giacomelli, C. E.; Bremer, M. G. E. G.; Norde, W.; *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *220*, 13-23.
- [45] Rigler, P.; Ulrich, W. P.; Hoffmann, P.; Mayer, M.; Vogel, H.; *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 268-275.
- [46] Zeptosens, A.; <http://www.zeptosens.com>; 2006.
- [47] Pawlak, M.; Schick, E.; Bopp, M. A.; Schneider, M. J.; Oroszlan, P.; Ehrat, M.; *Proteomics* **2002**, *2*, 383-393.
- [48] Schmidt, T.; Hinterdorfer, P.; Schindler, H.; *Microsc. Res. Tech.* **1999**, *44*, 339-346.
- [49] Raab, A.; Han, W. H.; Badt, D.; Smith-Gill, S. J.; Lindsay, S. M.; Schindler, H.; Hinterdorfer, P.; *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 902-905.
- [50] Leipert, D.; Nopper, D.; Bauser, M.; Gauglitz, G.; Jung, G.; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **1998**, *37*, 3308-3311.
- [51] Leipert, D.; Heiduschka, P.; Mack, J.; Egelhaaf, H. J.; Oelkrug, D.; Jung, G.; *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2471-2474.
- [52] Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5161-5168.
- [53] Nelson, B. P.; Grimsrud, T. E.; Liles, M. R.; Goodman, R. M.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **2001**, *72*, 1-7.
- [54] Corn, R. M.; Wegner, G. J.; Lee, H. J.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5161-5168.
- [55] Greta J. Wegner, H. J. L. G. M. a. R. M. C.; Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Marriott, G.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4740-4746.
- [56] Epstein, J. R.; Biran, I.; Walt, D. R.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 3-36.

- [57] Duveneck, G. L.; Abel, A. P.; Bopp, M. A.; Kresbach, G. M.; Ehrat, M.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 49-61.
- [58] Duveneck, G. L.; Bopp, M. A.; Ehrat, M.; Balet, L. P.; Haiml, M.; Keller, U.; Marowsky, G.; Soria, S.; *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 503-510.
- [59] Lakowicz, J. R.; *Principles of fluorescence spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum Publication: New York, **1999**.
- [60] Jablonski, A.; *Z. Phys.* **1935**, *94*, 38-46.
- [61] Stokes, G. G.; *Phil. Trans. R. Soc. London* **1852**, *142*, 463-562.
- [62] Gore, M. G.; *Spectrophotometry and spectrofluorimetry : a practical approach*; Oxford University Press: Oxford, **2000**.
- [63] Förster, T.; *Naturwissenschaften* **1946**, 166-175.
- [64] Mader, O.; Reiner, K.; Egelhaaf, H. J.; Fischer, R.; Brock, R.; *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 70-78.
- [65] Haugland, R. P.; *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*; Molecular Probes: Eugene, **2002**.
- [66] Fischer, R.; Mader, O.; Jung, G.; Brock, R.; *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653-660.
- [67] Slavik, J.; *Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications*; Wolfbeis, O. S., ed. Springer: Berlin, Heidelberg, **1993**.
- [68] Mader, O., *Untersuchung von Peptid-Protein-Wechselwirkungen mit fluoreszenzbasierten und markierungsfreien Detektionsmethoden sowie Struktureigenschaften-Analyse von Pentamethin-Indocyaninfarbstoffen*, Dissertation, Universität Tübingen, **2004**.
- [69] Hoogerhout, P.; Stittelaar, K. J.; Brugghe, H. F.; Timmermans, J. A.; ten Hove, G. J.; Jiskoot, W.; Hoekman, J. H.; Roholl, P. J.; *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 436-443.
- [70] Dettin, M.; Scarinci, C.; Zanotto, C.; Cabrelle, A.; De Rossi, A.; Di Bello, C.; *J. Pept. Res.* **1998**, *51*, 110-115.

- [71] Kodadek, T.; *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 295-300.
- [72] Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M.; *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 220-222.
- [73] Gentle, I. E.; De Souza, D. P.; Baca, M.; *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 658-663.
- [74] Erlanson, D. A.; Chytil, M.; Verdine, G. L.; *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 981-991.
- [75] Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705-6710.
- [76] Jung, G.; Beck-Sickinger, A. G.; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **1992**, *31*, 367-383.
- [77] Jung, G.; Beck-Sickinger, A. G.; *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375-391.
- [78] Weber, P. J.; Bader, J. E.; Folkers, G.; Beck-Sickinger, A. G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 597-600.
- [79] Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906-918.
- [80] Kapitzka, H. G.; *Mikroskopieren von Anfang an*; Oberkochem: **1994**.
- [81] Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M.; *Science* **2001**, *293*, 2101-2105.
- [82] Kawahashi, Y.; Doi, N.; Takashima, H.; Tsuda, C.; Oishi, Y.; Oyama, R.; Yonezawa, M.; Miyamoto-Sato, E.; Yanagawa, H.; *Proteomics* **2003**, *3*, 1236-1243.
- [83] Lesaichere, M. L.; Lue, R. Y. P.; Chen, G. Y. J.; Zhu, Q.; Yao, S. Q.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8768-8769.
- [84] Rowe, C. A.; Tender, L. M.; Feldstein, M. J.; Golden, J. P.; Scruggs, S. B.; MacCraith, B. D.; Cras, J. J.; Ligler, F. S.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3846-3852.
- [85] Quinn, J.; Patel, P.; Fitzpatrick, B.; Manning, B.; Dillon, P.; Daly, S.; O'Kennedy, R.; Alcocer, M.; Lee, H.; Morgan, M.; Lang, K.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 587-595.

- [86] Oh, B. K.; Kim, Y. K.; Lee, W.; Bae, Y. M.; Lee, W. H.; Choi, J. W.; *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 605-611.
- [87] Winssinger, N.; Ficarro, S.; Schultz, P. G.; Harris, J. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139-11144.
- [88] Harris, J.; Mason, D. E.; Li, J.; Burdick, K. W.; Backes, B. J.; Chen, T.; Shipway, A.; Van Heeke, G.; Gough, L.; Ghaemmaghami, A.; Shakib, F.; Debaene, F.; Winssinger, N.; *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1361-1372.
- [89] Winssinger, N.; Damoiseaux, R.; Tully, D. C.; Geierstanger, B. H.; Burdick, K.; Harris, J. L.; *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351-1360.
- [90] Winssinger, N.; Harris, J. L.; Backes, B. J.; Schultz, P. G.; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3254-3258.
- [91] Lovrinovic, M.; Seidel, R.; Wacker, R.; Schröder, H.; Seitz, O.; Engelhard, M.; Goody, R. S.; Niemeyer, C. M.; *Chem. Commun.* **2003**, 822-823.
- [92] Winssinger, N.; Harris, J.; Backes, B. J.; Schultz, P. G.; *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 3152-3155.
- [93] Lesaicherre, M. L.; Uttamchandani, M.; Chen, G. Y. J.; Yao, S. Q.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2079-2083.
- [94] Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schroder, H.; Soulere, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H.; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2003**, *42*, 5830-5834.
- [95] Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schröder, H.; Soulere, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H.; *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, 6010-6014.
- [96] Houseman, B. T.; Huh, J. H.; Kron, S. J.; Mrksich, M.; *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270-274.
- [97] Harada, Y.; Kuroda, M.; Ishida, A.; *Langmuir* **2000**, *16*, 708-715.
- [98] Brogan, K. L.; Schoenfisch, M. H.; *Langmuir* **2005**, *21*, 3054-3060.
- [99] Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M.; *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.

- [100] Kim, B. H.; Mader, O.; Weimar, U.; Brock, R.; Kern, D. P.; *J. Vac. Sci. Technol. , B* **2003**, *21*, 1472-1475.
- [101] Hoff, A.; André, T.; Schäffer, T. E.; Jung, G.; Wiesmüller, K.-H.; Brock, R.; *ChemBioChem* **2002**, *2002*, 1183-1191.
- [102] Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 739-745.
- [103] Mateo, C.; Torres, R.; Fernandez-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; Lopez-Gallego, F.; Abian, O.; Palomo, J. M.; Betancor, L.; Pessela, B. C. C.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 772-777.
- [104] Kusnezow, W.; Jacob, A.; Walijew, A.; Diehl, F.; Hoheisel, J. D.; *Proteomics* **2003**, *3*, 254-264.
- [105] Angenendt, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 97-104.
- [106] Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J.; *Biospektrum* **1998**, *4*, 30-34.
- [107] Weiser, A. A.; Or-Guil, M.; Tapia, V.; Leichsenring, A.; Schuchhardt, J.; Frommel, C.; Volkmer-Engert, R.; *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 300-311.
- [108] Kumar, P.; Whitesides, G. M.; *App. Phys. Lett.* **1993**, *63*, 2002-2004.
- [109] Kumar, P.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M.; *Langmuir* **1994**, *10*, 1498-1511.
- [110] Brown, P.; <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>; 2006.
- [111] Hardiman, G.; <http://microarrays.ucsd.edu/biogem/resources/gmsspotter.php>; 2006.
- [112] Halliwell, C. M.; Cass, A. E. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *121*, 7967-7968.
- [113] Lenigk, R.; Carles, M.; Ip, N. Y.; Sucher, N. J.; *Langmuir* **2001**, *17*, 2497-2501.
- [114] Krasnoslobodtsev, A. V.; Smirnov, S. N.; *Langmuir* **2002**, *18*, 3181-3184.
- [115] Piehler, J.; Brecht, A.; Valiokas, R.; Liedberg, B.; Gauglitz, G.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 473-481.

- [116] Elbs, M.; Brock, R.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4793-4800.
- [117] Elbs, M., *Mikroarrays zur Messung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit konfokaler Fluoreszenzdetektion*, Dissertation, Universität Tübingen, **2004**.
- [118] Oh, J. S.; Cho, S. J.; Kim, C. O.; Park, J. W.; *Langmuir* **2002**, *18*, 1764-1769.
- [119] Kallury, K. M. R.; Krull, U. J.; Thompson, M.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 169-172.
- [120] Zhao, H.; Beysens, D.; *Langmuir* **1995**, *11*, 627-634.
- [121] Duburcq, X.; Olivier, C.; Desmet, R.; Halasa, M.; Carion, O.; Grandidier, B.; Heim, T.; Stiévenard, D.; Auriault, C.; Melnyk, O.; *Bioconjugate Chem.* **2004**.
- [122] Zhang, Z. W.; Zhu, W. G.; Kodadek, T.; *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 71-74.
- [123] Plueddemann, E. P.; *Silane coupling agents*; Plenum Press: New York, **1991**.
- [124] Gauthier, S.; Aimé, J. P.; Bouhacina, T.; Attias, A. J.; Desbat, B.; *Langmuir* **1996**, *12*, 5126-5137.
- [125] Osaki, T.; Zimmermann, R.; Kratzmuller, T.; Schweiss, R.; Werner, C.; *Langmuir* **2004**, *20*, 524-527.
- [126] Stevens, M. J.; *Langmuir* **1999**, *15*, 2773-2778.
- [127] Fadeev, A. Y.; McCarthy, T. J.; *Langmuir* **2000**, *16*, 7268-7274.
- [128] Dugas, V.; Broutin, J.; Souteyrand, E.; *Langmuir* **2005**, *21*, 9130-9136.
- [129] Hochuli, E.; Pieszecki, S.; *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **1992**, *4*, 68-72.
- [130] Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G.; *Nature* **1975**, *258*, 598-599.
- [131] Ueda, E. K.; Gout, P. W.; Morganti, L.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 1-23.
- [132] Hart, C.; Schulenberg, B.; Diwu, Z.; Leung, W. Y.; Patton, W. F.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 599-610.
- [133] Lata, S.; Piehler, J.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1096-1105.

- [134] Schmitt, L.; Ludwig, M.; Gaub, H. E.; Tampe, R.; *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3275-3285.
- [135] Thess, A.; Hutschenreiter, S.; Hofmann, M.; Tampe, R.; Baumeister, W.; Guckenberger, R.; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36321-36328.
- [136] Radler, U.; Mack, J.; Persike, N.; Jung, G.; Tampe, R.; *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3144-3152.
- [137] Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampe, R.; Piehler, J.; Tampe, R.; Piehler, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205-10215.
- [138] Sigal, G. B.; Bamdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. M.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 490-497.
- [139] Schmid, E. L.; Keller, T. A.; Dienes, Z.; Vogel, H.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1979-1985.
- [140] Kato, K.; Sato, H.; Iwata, H.; *Langmuir* **2005**, *21*, 7071-7075.
- [141] Rigler, P.; Ulrich, W. P.; Hoffmann, P.; Mayer, M.; Vogel, H.; *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 268-275.
- [142] Dorn, I. T.; Neumaier, K. R.; Tampe, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2753-2763.
- [143] Petersson, K.; Hakansson, M.; Nilsson, H.; Forsberg, G.; Svensson, L. A.; Liljas, A.; Walse, B.; *EMBO J.* **2001**, *20*, 3306-3312.
- [144] Sarkar, B.; *Prog. Food Nutr. Sci.* **1987**, *11*, 363-400.
- [145] Salam, M. A.; Aoki, K.; *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *311*, 15-24.
- [146] Polyakova, I. N.; Poznyak, A. L.; Sergienko, V. S.; *Cryst. Rep.* **2005**, *45*, 762-770.
- [147] Choi, K.-Y.; Choi, S. N.; Hong, C. P.; *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *40*, 67-71.
- [148] Leach, A. R.; *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education Ltd.: Harlow, England, **2001**.
- [149] Biosym Technologies; *InsightII & Discover User Guide*; Biosym Technologies: San Diego, **1993**.

- [150] Case, D. A.; Cheatham III, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz Jr, K. M.; Onufirev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.; *J. Computat. Chem.* **2005**, *26*, 1668-1688.
- [151] Ponder, J. W.; Case, D. A.; *Adv. Prot. Chem.* **2003**, *66*, 27-85.
- [152] Liu, H.-L.; Ho, Y.; Hsu, C.-M.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2003**, *21*, 31-41.
- [153] Barlow, S.; Rohl, A. L.; Shi, S.; Freeman, C. M.; O'Hare, D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7578-7592.
- [154] Nowak, W.; Wojtczak, V.; Cody, V.; *Internet J. Chem.* **1999**, *2*, Article 12.
- [155] Ayers, B.; Blaschke, U. K.; Camarero, J. A.; Cotton, G. J.; Holford, M.; Muir, T. W.; *Biopolymers* **1999**, *51*, 343-354.
- [156] Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H.; *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [157] Schnolzer, M.; Kent, S. B.; *Science* **1992**, *256*, 221-225.
- [158] Baca, M.; Kent, S. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11638-11642.
- [159] Girish, A.; Sun, H.; Yeo, D. S. Y.; Chen, G. Y. J.; Chua, T. K.; Yao, S. Q.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2447-2451.
- [160] Hagleitner, C.; Hierlemann, A.; Lange, D.; Kummer, A.; Kerness, N.; Brand, O.; Baltes, H.; *Nature* **2001**, *414*, 293-296.
- [161] Kim, B. H.; Prins, F. E.; Kern, D. P.; Raible, S.; Weimar, U.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *78*, 12-18.
- [162] Battiston, F. M.; Ramseyer, J.-P.; Lang, H. P.; Baller, M. K.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K.; Meyer, E.; Guntherodt, H.-J.; *Sens. Actuators, B* **2001**, *77*, 122-131.
- [163] Lang, H. P.; Hegner, M.; Gerber, C.; *Materials Today* **2005**, *8*, 30-36.
- [164] Dutta, P.; Tipple, C. A.; Lavrik, N. V.; Datskos, P. G.; Hofstetter, H.; Hofstetter, O.; Sepaniak, M. J.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2342-2348.

- [165] Baller, M. K.; Lang, H. P.; Fritz, J.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K.; Drechsler, U.; Rothuizen, H.; Despont, M.; Vettiger, P.; Battiston, F. M.; *Ultramicroscopy* **2000**, *82*, 1-9.
- [166] Moulin, A. M.; O'Shea, S. J.; Badley, R. A.; Doyle, P.; Welland, M. E.; *Langmuir* **1999**, *15*, 8776-8779.
- [167] Fritz, J.; Baller, M. K.; Lang, H. P.; Rothuizen, H.; Vettiger, P.; Meyer, E.; Guntherodt, H.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K.; *Science* **2000**, *288*, 316-318.
- [168] Hansen, K. M.; Ji, H. F.; Wu, G. H.; Datar, R.; Cote, R.; Majumdar, A.; Thundat, T.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1567-1571.
- [169] Bietsch, A.; Zhang, J. Y.; Hegner, M.; Lang, H. P.; Gerber, C.; *Nanotechnology* **2004**, *15*, 873-880.
- [170] McKendry, R.; Zhang, J. Y.; Arntz, Y.; Strunz, T.; Hegner, M.; Lang, H. P.; Baller, M. K.; Certa, U.; Meyer, E.; Guntherodt, H. J.; Gerber, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9783-9788.
- [171] Wu, G.; Datar, R. H.; Hansen, K. M.; Thundat, T.; Cote, R. J.; Majumdar, A.; *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 856-860.
- [172] Arntz, Y.; Seelig, J. D.; Lang, H. P.; Zhang, J.; Hunziker, P.; Ramseyer, J. P.; Meyer, E.; Hegner, M.; Gerber, C.; *Nanotechnology* **2003**, *14*, 86-90.
- [173] Pei, J. H.; Tian, F.; Thundat, T.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 292-297.
- [174] Luzinov, I.; Julthongpiput, D.; Liebmann-Vinson, A.; Cregger, T.; Foster, M. D.; Tsukruk, V. V.; *Langmuir* **2000**, *16*, 504-516.
- [175] Tsukruk, V. V.; Luzinov, I.; Julthongpiput, D.; *Langmuir* **1999**, *15*, 3029-3032.
- [176] Hummel, W., *Entwicklung von Peptid-Mikroarrays zur parallelen Analyse der aktivierungsabhängigen Änderung molekularer Wechselwirkungen*, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **2004**.
- [177] Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 509-515.

- [178] Piehler, J.; *Pers. Mitteilung*, **2005**.
- [179] Camarero, J. A.; Kwon, Y.; Coleman, M. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14730-14731.
- [180] Piehler, J.; Brecht, A.; Valiokas, R.; Liedberg, B.; Gauglitz, G.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 473-481.
- [181] De Souza, D.; Fabri, L. J.; Nash, A.; Hilton, D. J.; Nicola, N. A.; Baca, M.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 9229-9236.
- [182] Nicoll, G.; Ni, J.; Liu, D.; Klenerman, P.; Munday, J.; Dubock, S.; Mattei, M. G.; Crocker, P. R.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34089-34095.
- [183] Baca, M.; *Pers. Mitteilung*, **2004**.
- [184] Fields, G. B.; Noble, R. L.; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [185] Houghten, R. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135.
- [186] Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J.; *J. Peptide Res.* **2001**, *57*, 250-256.
- [187] Coulson, D. R.; *Inorg. Syntheses* **1971**, *13*, 121-124.
- [188] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. J.; *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [189] Stetsenko, D. A.; Gait, M. J.; *J. Org. Chem.* **2002**, *65*, 4900-4908.
- [190] Evan, G. I.; Lewis, G. K.; Ramsay, G.; Bishop, J. M.; *Mol. Cell Biol.* **1985**, *5*, 3610-3616.
- [191] Hilpert, K.; Hansen, G.; Wessner, H.; Kuttner, G.; Welfle, K.; Seifert, M.; Hohne, W.; *Protein Eng* **2001**, *14*, 803-806.

Meine Akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M.E. Maier, H.-P. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, V. Schurig, E. Schweda, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, H.-D. Wiemhöfer, K.-P. Zeller, C. Ziegler.