

**Entwicklung neuer  
Hochdurchsatz-Assay-Technologien  
und  
Identifikation eines Ubiquitin-Liganden**

**DISSERTATION**

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

**2006**

vorgelegt von

**Günter Roth**

Tag der mündlichen Prüfung                      19.09.2006

Dekan:	Prof. Dr. Stefan. Laufer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Stevanović
3. Berichterstatter	Prof. Dr. Markus Köhler

**Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von**

**Herrn Prof. Dr. K.-H. Wiesmüller**

in der Zeit von Oktober 2002 bis April 2006 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und bei der EMC microcollections GmbH, Tübingen, durchgeführt.



*„Die Nacht ist zu dunkel,*

*als dass man mit geschlossenen Augen darin herumlaufen könnte.“*

(Fizban, Dragons of Autumn Twilight)

Daher möchte ich all jenen danken, die mir die Augen geöffnet haben oder durch ihre Hilfe ein Licht in der nächtlichen Suche nach Wissen und Weisheit waren.

## Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 VOM GENOM ZUM PROTEOM .....	1
1.2 MIKROARRAYS .....	2
1.3 EKINS THEORIE DER KLEINEN STRUKTUREN .....	5
1.4 FUNKTIONELLER AUFBAU EINES MIKROARRAYS .....	7
1.4.1 Immobilisierungsmedien für Mikroarrays .....	8
1.4.2 Fänger-moleküle .....	9
1.4.3 Übertragungssystem .....	12
1.4.4 Detektionssysteme .....	13
1.5 ZWEI-KOMPONENTEN-ASSAYS .....	15
1.6 UBIQUITIN .....	16
<b>2 ZIELSETZUNG .....</b>	<b>19</b>
2.1 LIPODOTS + STATISTISCHE MIKROARRAYS = LIPODOT-ARRAY .....	19
2.2 DIFFUSIONSASSAY UND 2D-GRADIENTEN .....	20
2.3 NEUE UBIQUITIN-LIGANDEN .....	20
<b>3 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>22</b>
3.1 IMMOBILISIERUNGSTRATEGIEN .....	22
3.1.1 Techniken zur Immobilisierung .....	22
3.1.1.1 Photolithographische Synthese .....	22
3.1.1.2 SPOT-Synthese .....	24
3.1.1.3 Nanoplotting von Mikroarrays .....	25
3.1.1.4 Softlithographisches Printing .....	27
3.1.2 Immobilisierung .....	28
3.1.2.1 Kovalente Immobilisierung .....	28
3.1.2.2 Nicht-kovalente Immobilisierung .....	29
3.2 SIGNALGENERIERUNG .....	30
3.2.1 Aufbau eines Immunoassays .....	30
3.2.2 Fluoreszenz .....	34
3.2.2.1 Fluoreszente Farbstoffe .....	34
3.2.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....	36
3.2.2.3 Quenching und Dequenching .....	38

3.2.2.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) .....	39
3.2.3	Das Evaneszente Feld .....	43
3.2.3.1	Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (RIfS) .....	43
3.2.3.2	Surface-Plasmon-Resonance (SPR) .....	44
3.2.3.3	Fluoreszenz auf einem Zeptosense-Chip .....	46
3.2.4	Mikroskopie .....	47
3.2.4.1	Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops .....	47
3.2.4.2	Aufbau einer konfokalen Optik .....	49
3.3	DIFFUSION .....	50
3.3.1	Die Fick´schen Gesetze .....	50
3.3.2	Endliche und unendliche Quellen .....	51
3.4	PEPTIDSYNTHESE AUF FESTPHASEN .....	53
3.4.1	Grundsätzliches zur Festphasen-Peptidsynthese .....	54
3.4.2	Split & Mix Kollektionen .....	56
3.4.3	Scan-Kollektionen .....	58
3.4.4	Strukturaufklärung .....	59
3.5	PAM <sub>3</sub> CYS-OH UND BIOMIMETIK .....	60
3.5.1	Das Braunsche Lipoprotein .....	60
3.5.2	Pam <sub>3</sub> Cys-OH .....	63
3.6	DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM (UPS) .....	64
3.6.1	Ubiquitin – überall zu finden .....	65
3.6.2	Die biochemische Rolle des Ubiquitins und die E-Familien .....	66
3.6.3	Das 26S Proteasom .....	68
4	MATERIAL UND METHODEN .....	71
4.1	MATERIALIEN .....	71
4.1.1	Geräte und Software .....	71
4.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	72
4.1.3	Puffersysteme und Lösungen .....	73
4.1.4	Zellkultur .....	74
4.2	ALLGEMEINE METHODEN .....	74
4.2.1	Peptidsynthesen .....	74
4.2.1.1	Vorquellen der Beads .....	74
4.2.1.2	Kupplung von Fmoc-Aminosäuren .....	74
4.2.1.3	Kupplung von Pam <sub>3</sub> Cys-OH .....	75
4.2.1.4	Kupplung von Farbstoffen .....	75
4.2.1.5	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe .....	75
4.2.1.6	Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe .....	76

4.2.1.7 Abspaltung der Seitenschutzgruppen auf dem Harz.....	76
4.2.1.8 Abspaltung vom Harz mit UV-Licht.....	76
4.2.1.9 Abspaltung vom Harz mit Säure.....	77
4.2.1.10 Kaiser-Test.....	77
4.2.1.11 Aufreinigung.....	77
4.2.1.12 Analytik der Verbindungen.....	78
4.2.2 Mikroskopie.....	78
4.2.2.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie.....	78
4.2.2.2 Laser-Scanning-Mikroskopie.....	79
4.2.2.3 FCS-Mikroskopie.....	79
4.2.2.4 Auswertung mit Metamorph.....	81
4.2.2.5 Wann ist ein Signal ein Signal?.....	82
4.2.3 Softlithographisches Printing mit PDMS-Stempel.....	84
4.2.3.1 Herstellung des Masters.....	84
4.2.3.2 Herstellung des PDMS-Stempel.....	85
4.2.3.3 Stempeln von Molekülen.....	86
4.2.4 Herstellung von Mikroarrays mit Nanopipettier-Roboter.....	87
4.3 METHODEN IM TEILBEREICH LIPODOT.....	88
4.3.1 Vereinzelung von Beads.....	88
4.3.2 Bead-Monolayer auf der Carrier Plate.....	89
4.3.2.1 Langmuir-Blodgett-Filme.....	89
4.3.2.2 Pulverbeschichtung.....	89
4.3.2.3 Zentrifugal-Pulverbeschichtung.....	90
4.3.2.4 Fixieren und Kämmen.....	92
4.3.2.5 Herstellen einer Carrier Plate.....	93
4.3.3 Modifizierung von Oberflächen.....	93
4.3.3.1 Hydrophobisierung von Aminoslides.....	93
4.3.3.2 Reinigung von Glasoberflächen mit Piranha-Lösung.....	95
4.3.3.3 Reinigung von Glasoberflächen mit Sauerstoffplasma.....	95
4.3.3.4 Gasphasensilanisierung.....	96
4.3.3.5 Flüssigphasensilanisierung.....	96
4.3.4 Kontaktwinkelmessung.....	97
4.3.5 LIPODOT-Transfer von der Carrier Plate zur Assay Plate.....	98
4.3.5.1 Transferapparatur.....	98
4.3.5.2 Standardprotokoll eines LIPODOT-Transfers.....	99
4.3.6 LIPODOT-Ankerverbindung und Aufbau einer Kollektion.....	99
4.3.6.1 LIPODOT-Ankerverbindung.....	100
4.3.6.2 Aufbau der Kollektion.....	102
4.3.7 Durchführung eines LIPODOT-Assays.....	102
4.3.7.1 Detektion.....	104

4.3.7.2 Auswertung .....	104
4.4 METHODEN IM TEILBEREICH DIFFUSIONSVORRICHTUNG .....	105
4.4.1 Einfüllen der Diffusionsmatrizen .....	105
4.4.1.1 Agarose .....	105
4.4.1.2 Gelatine .....	105
4.4.2 Herstellung der Diffusionsvorrichtung .....	105
4.4.3 Erzeugung eines Gradienten .....	108
4.4.4 Nachweis der Zellaktivierung .....	109
4.4.4.1 IL8-ELISA .....	109
4.4.4.2 Siebdruck-ELISA .....	111
4.4.5 Auswertung der Gradienten .....	113
4.4.5.1 Auswertung von Bildern .....	113
4.4.5.2 Auswertung eines Gelgradienten .....	115
4.4.5.3 Auswertung eines Netzgradienten .....	117
4.5 METHODEN IM TEILBEREICH UBIQUITINLIGAND .....	119
4.5.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) .....	119
4.5.2 Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (RfS) .....	119
4.5.2.1 Herstellung der Transducer .....	119
4.5.2.2 Durchführung einer RfS-Messung .....	120
4.5.3 Mikroarrays .....	121
4.5.3.1 Herstellung der Mikroarrays .....	121
4.5.3.2 Anwendung der Mikroarrays .....	121
4.5.4 Isothermale Kalorimetrie (ITC) .....	122
4.5.5 Kernresonanz-Messungen (HSQC-NMR) .....	123
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	124
5.1 LIPODOT-ARRAY UND SMA .....	124
5.1.1 Modellvorstellung des LIPODOT-Transfer .....	125
5.1.1.1 Grundkonzept der Transfertechnik .....	125
5.1.1.2 Umsetzung als LIPODOT-Transfer .....	127
5.1.2 Synthesen .....	129
5.1.2.1 Synthese der Ankerverbindung .....	129
5.1.2.2 Synthese „definierter“ Verbindungen .....	130
5.1.2.3 Dipeptid-Kollektion .....	133
5.1.2.4 $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion .....	135
5.1.3 Oberflächenmodifizierungen .....	136
5.1.3.1 Funktionalisierung von kommerziellen Aminosilides .....	137
5.1.3.2 Erste Silanisierungen .....	138
5.1.3.3 Reinigung von Glasoberflächen mit Piranha-Lösung .....	139
5.1.3.4 Optimierung der Flüssigphasensilanisierung .....	141

5.1.3.5 Lagerbeständigkeit der Oberflächen .....	145
5.1.3.6 Qualitätskontrolle selbst hergestellter hydrophober Glasträger .....	146
5.1.3.7 Qualitätskontrolle der hydrophoben Implen-Slides .....	147
5.1.4 Bead-Monolayer .....	147
5.1.4.1 Langmuir-Blodgett-Filme .....	148
5.1.4.2 Pulverbeschichtung klebstoffbeschichteter Glasträger .....	149
5.1.4.3 Pulverbeschichtung von Tesafilm .....	153
5.1.4.4 Zentrifugal-Pulverbeschichtung .....	155
5.1.5 Carrier Plate Herstellung .....	157
5.1.5.1 Carrier Plates der ersten Generation .....	157
5.1.5.2 Carrier Plates der zweiten Generation .....	160
5.1.5.3 Carrier Plates der dritten Generation .....	162
5.1.5.4 Carrier Plates zur Vermessung der $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektionen .....	165
5.1.6 LIPODOT-Transfer .....	169
5.1.6.1 Erste LIPODOT-Transfers .....	169
5.1.6.2 Monolayer durch LIPODOT-Transfer? .....	170
5.1.6.3 Moleküldichte der LIPODOT-Monolayer .....	173
5.1.6.4 Optimierung des LIPODOT-Transfers .....	179
5.1.6.5 Übertragung aller LIPODOT-Verbindungen? .....	183
5.1.7 Entwicklung der Transferapparaturen .....	184
5.1.7.1 Löschwäge .....	184
5.1.7.2 Rotationsdruckpresse .....	185
5.1.7.3 Hydrostatischer und pneumatischer Transfer .....	187
5.1.8 Allokation .....	189
5.1.8.1 Grundidee der Allokation .....	189
5.1.8.2 Allokation für LIPODOT-Arrays .....	191
5.1.8.3 Allokation einer Beispielprobe .....	192
5.1.9 Erster Bindungsassay mit Streptavidin .....	195
5.1.10 Vergleich von SMA, Softlithographisches Printing und Mikroarrays .....	200
5.1.11 Optimierung des Streptavidin-Bindungsassays .....	202
5.1.11.1 Mögliche Block-Lösungen .....	202
5.1.11.2 Vergleich verschiedener Block-Reagenzien .....	204
5.1.11.3 Optimierung der Konzentration der Blocklösung .....	206
5.1.11.4 Optimierung der Blockdauer .....	209
5.1.12 Weitere Bindungsassays .....	211
5.1.12.1 Bindungsassay mit einer biotinylierten Dipeptid-Kollektion .....	211
5.1.12.2 Bindungsassay mit Antimyc-Antikörper .....	212
5.1.12.3 Ratiometrischer Farbassay .....	212
5.1.12.4 Bindungsassay mit Vancomycin .....	214
5.1.13 Ansätze zur Einzelbead-Analytik .....	217

5.1.13.1 Wiedergewinnung eines Beads .....	217
5.1.13.2 Teil-Dekonvolution durch Ortsinformation .....	219
5.1.14 Eine Carrier Plate – viele Assay Plates .....	219
5.1.15 Bindungsassays mit der $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion .....	222
5.1.16 Abbildungen von Assay Plates und Carrier Plates .....	223
5.1.17 Mikroarrayscanner und LIPODOTs .....	226
5.1.18 Zusammenfassung der LIPODOT-Ergebnisse .....	230
5.2 DIFFUSIONSVORRICHTUNG .....	232
5.2.1 Design der Diffusionsvorrichtung .....	232
5.2.2 Kalibrierung der Fluoreszenz zur Konzentration .....	237
5.2.2.1 Kalibrierung der Konzentrationen einzelner Fluorophore .....	237
5.2.2.2 Parallele Kalibrierung zweier Fluorophore .....	240
5.2.3 Vermessung des 2D-Diffusionsgradienten .....	242
5.2.3.1 Die Art der Quelle? .....	243
5.2.3.2 Bestimmung von Diffusionskonstanten .....	245
5.2.4 Der Siebdruck-ELISA .....	246
5.2.4.1 Zellverteilung .....	247
5.2.4.2 Vergleich des Siebdruck-ELISAs mit einem Standard-ELISA .....	247
5.2.4.3 Der orts aufgelöste Siebdruck-ELISA .....	250
5.2.4.4 Kalibrierung des Siebdruck-ELISAs in der Diffusionsvorrichtung .....	253
5.2.4.5 Durchführung eines Aktivierungsassays mit Pam <sub>3</sub> Cys-SK <sub>4</sub> .....	256
5.2.4.6 Zwei-Komponenten-Assay .....	258
5.2.5 Übertragung eines 2D-Gradienten .....	260
5.2.6 Zusammenfassung der Diffusionsvorrichtung-Ergebnisse .....	262
5.3 UBIQUITIN-LIGANDEN .....	264
5.3.1 Auswahl der Ubiquitin-Liganden .....	264
5.3.2 Synthesen .....	265
5.3.2.1 Erste Synthese von Peptiden .....	265
5.3.2.2 Zweite Synthese von Peptiden .....	266
5.3.2.3 Dritte Synthese von Peptiden .....	267
5.3.3 Fluoreszenz-Korrelations-Messungen (FCS) .....	269
5.3.3.1 FCS-Messungen .....	269
5.3.3.2 Optimierung der FCS-Messung .....	270
5.3.4 Alanin- und X-Scan-Mikroarrays .....	272
5.3.5 Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (RIfS) .....	273
5.3.6 Isothermale Kalorimetrie (ITC) .....	274
5.3.7 Magnetische Kernresonanzmessungen (NMR) .....	276
5.3.8 Ein Blick in die Literatur .....	279
5.3.8.1 Shiftmuster von Polyubiquitin .....	279

5.3.8.2 Untersuchung einer Ubiquitin-bindenden Konsensus-Sequenz.....	280
5.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Ubiquitin-Liganden .....	281
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	283
6.1 LIPODOT .....	283
6.2 DIFFUSIONSVORRICHTUNG.....	284
6.3 UBIQUITINLIGAND.....	284
7 LITERATURVERZEICHNIS .....	286
8 VERÖFFENTLICHUNGEN .....	307
9 DANKSAGUNG.....	309
10 AKADEMISCHE LEHRER.....	313
11 LEBENSLAUF.....	314

## 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.

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ado	8-Amino-3,6-dioxa-oktansäure
AFM	Raster-Kraft-Mikroskopie
Ahx	6-Aminohexansäure
Aloc	Allyloxycarbonyl
Ankerverbindung	chemische Struktur, die eine Pam <sub>3</sub> Cys-SK <sub>4</sub> -Gruppe enthält
AP	Assay Plate, Oberfläche mit LIPODOTs für die Durchführung eines Bindungs-Assays
APTES	Aminopropionyl-triethoxysilan
a.U.	arbitrary unit, beliebige Einheitsgröße
Bead	Polymerkugel mit 10-800 µm Durchmesser auf der chemische Verbindungen durch Festphasensynthese aufgebaut werden
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
CP	Carrier Plate, Trägerplatte mit einer immobilisierten Monolayer aus Beads
D	Dalton, Maßeinheit der molaren Masse, $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N-Ethyl-diisopropylamin
DMF	Dimehtylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
e	Elementarladung, $1,6 \cdot 10^{-19}$ Coulomb
EGFP	enhanced GFP
eq.	Äquivalent
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massen-Spektrometrie
EtOH	Ethanol
VIII	

FCCS	Fluoreszenz Kreuz-Korrelations Spektroskopie
FCS	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie
Fluo	Fluorescein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, Förster-Transfer
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
HMDS	Hexamethyldisilazan
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IL8	Interleukin 8
IR	Infrarot
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
$\lambda$	Wellenlänge in nm
LIPODOT	„Punktförmige“ Beschichtung einer hydrophoben Oberfläche durch ein Verbindung, die eine Pam <sub>3</sub> Cys-Gruppe enthält
M	Molarität in mol/l
mAb	monoklonaler Antikörper
Maldi-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-MS
MeOH	Methanol
Me	Methyl
mol	$6,022 \cdot 10^{23}$ Moleküle
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis in D/e
NMP	N-Methyl-2-Pirrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTA	Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic acid)
pAb	polyklonaler Antikörper
Pam <sub>3</sub> Cys-OH	N <sup>α</sup> -Palmitoyl-S-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-[2RS]-propyl]-(R)-cystein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PDMS	Poly-Dimethoxysilan
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PS	Polystyrol
R <sup>i</sup>	Rest an der i-ten Stelle des Moleküls
rel. int.	Relative Intensität
$\rho$	Dichte in g/cm <sup>3</sup>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
SET	Single-Electron-Transfer
$\sigma$	Oberflächendichte in Moleküle pro Flächeneinheit
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (Solid-Phase Peptide Synthesis)
STM	Raster-Tunnel-Mikroskopie
t	Zeit
Tamra	Tetramethylrhodamin
tBu	tert.-Butyl
tBu-OH	tert. Butanol
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP 1	Zelllinie
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TOF	time-of-flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
V	Volumen
YFP	yellow fluorescent protein
Yurkat T	Zelllinie

# 1 Einleitung

## 1.1 Vom Genom zum Proteom

Zur Jahrtausendwende hin war man voll Euphorie über die nahende Entschlüsselung des menschlichen Genoms, welche im Februar 2001 <sup>[23;24]</sup> ihr vorläufiges Ende fand. Aufgrund systematischer Fehler lag erst 2003 die abgesicherte Sequenz eines menschlichen Genoms vor <sup>[25]</sup>. Für die DNA-Analyse wurde die von Sanger <sup>[26-28]</sup> entwickelte Methode der DNA-Sequenzierung verwendet.

Man wähnte, dass man mit der Kenntnis des Gencodes eines Menschen schon den Schlüssel zu allen Proteinen in der Hand hielt, denn DNA (Genom) selbst wird erst in mRNA (Transkriptom) exprimiert und diese dann in Proteine (Proteom) übersetzt. Damit stellt die DNA den Bauplan der Zellen dar, wohingegen die Proteine die entsprechenden Produkte darstellen. Man hat somit die grundlegende genetische Information zur Chemie des Lebens in der Hand.

Doch schon während der Entschlüsselung des humanen Gencodes stellte sich bei anderen zuvor entschlüsselten Spezies heraus, dass der DNA-Code alleine nicht aussagekräftig genug ist, und auch der mRNA-Level oft keine Aussage über den zukünftigen Proteinlevel zulässt <sup>[29]</sup>. Inzwischen hat sich die Meinung durchgesetzt, dass man erst am frühen Beginn der Entschlüsselung und des Verständnisses der zellulären Regulationsmechanismen ist. Es ist davon auszugehen, dass die reversible Phosphorylierung und die Ubiquitylierung wohl erst den Anfang im komplexen Verständnis der Zell-Regulierungsmechanismen darstellen <sup>[16;30]</sup>.

Nach der Entschlüsselung und bioinformatischen Zuordnung der 2,91 Milliarden Basenpaare des humanen Genoms nimmt man nun an, dass mit 20.000 bis 25.000 Rumpfproteinen zu rechnen ist <sup>[31;32]</sup>. Diese Rumpfproteine unterliegen nach ihrer Synthese einem weitem Spektrum an posttranslationalen Modifikationen <sup>[33]</sup>, die von Verlängerungen und Verkürzungen, über Metall-Komplexbildung, Phosphorylierung, Glykosylierung, Amidierung, Carboxylierung, Sulfonierung, die Entfernung oder das Anlagern von weiteren Nebengruppen reichen. Dazu kommt

die Aggregation zu Gigakomplexen, die über 2 Millionen Dalton Atomgewicht besitzen.

Diese Modifizierungen dienen der Änderung der Aktivität und Spezifität von Proteinen, ebenso wie der Beeinflussung der Bindungskinetiken und Bindungskonstanten. Mathematisch gesehen, stellen alle Proteine zusammen mit ihren Substraten und ihren Modifikationen vernetzt-gekoppelte Differentialgleichungen dar. Diese können mathematisch ein-eindeutig gelöst werden unter der Voraussetzung, dass man für jede Modifikation, jedes Substrat, jedes Protein und jeden Ort der Zelle die exakte Anfangskonzentration und die Kinetikkonstanten kennt. Bereits 25.000 unmodifizierte Rumpfpoteine, die je mit 4 Bindungspartnern interagieren, ergeben schon 400.000 Berechnungskonstanten. Unter Abschätzung aller Kopplungen, Substrate und Modifikationen wird gegenwärtig mit 5-10 Millionen Kopplungskonstanten gerechnet, um eine Zelle „exakt“ simulieren zu können. Zur Bestimmung dieser Konstanten benötigt man um die  $10^{17}$  Datenpunkte. Diese enorme Datenmenge entspricht etwa 400 Milliarden <sup>[34;35]</sup> Mikroarrays von einer einzelnen Zelle <sup>[36;37]</sup>.

Anhand dieser Abschätzung sieht man den Datenberg, den es abzutragen gilt, und dass jegliche Beschleunigung der Datengenerierung, -verwaltung und -zuordnung (Data-mining) dieses Ziel ein bisschen greifbarer macht <sup>[38]</sup>. Glücklicherweise lassen sich aber auch schon aus deutlich kleineren Datenmengen greifbare Ergebnisse und Zusammenhänge entschlüsseln. Jedoch ist die Gesamtdatenmenge noch weit von der Simulation einer kompletten Zelle entfernt. Bei gegenwärtiger Technik wird diese kritische Datenmenge zur Simulation einer Zelle erst Ende dieses Jahrhundert erreicht werden <sup>[36;37]</sup>.

## 1.2 Mikroarrays

Ein Mikroarray ist nach gängiger Definition die regelmäßige Anordnung und Zuordnung von chemischen Verbindungen zum Zwecke der Detektion einer Wechselwirkung oder des Nachweises einer chemischen Zielverbindung. Entsprechend der Zielverbindungen wird das Array benannt.

Heutzutage haben sich vor allem DNA-Mikroarrays <sup>[39;40]</sup> durchgesetzt, die als etablierte Technologie zum Verständnis elementarer Zusammenhänge in der Zelle

gelten, durchgesetzt. Um entsprechend große Datenmengen mit entsprechend kleinen Probenvolumina zu generieren, wurde seit Jahren extrem auf Miniaturisierung in diesem Bereich hingearbeitet. Der Marktführer und Patenhalter der photolithographischen Mikroarray-Herstellung lieferte 2002 minimale Strukturgrößen um 20  $\mu\text{m}$  bei einer maximalen Dichte von 250.000 unterschiedlichen DNA-Sequenzen pro  $\text{cm}^2$  und 25.000 DNA-Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  <sup>[41]</sup>. Diese Glanzleistung wurde bis dato beim humanen 2000k-Chip von Affymetrix auf 10  $\mu\text{m}$  Strukturbreite und insgesamt 2,1 Millionen unterschiedlichen DNA-Sequenzen optimiert. Die Strukturweite konnte dabei auf ca. 400.000 Sequenzen pro  $\text{cm}^2$  und 8  $\mu\text{m}$  Strukturbreite erhöht werden, was 2 Millionen DNA-Stränge jeder einzelnen Sequenz entspricht <sup>[42;43]</sup>.

Alternativ sind auch einige Tausende kurze Oligonukleotide oder cDNA mit einem Nanoplotter meist in kreisförmigen Spots in einer rechteckigen Anordnung mit Spot- zu Spotmittelpunkt von ca. 200  $\mu\text{m}$  angeordnet, was einer Dichte von 2.000 bis 5.000 unterschiedlicher DNA-Sequenzen pro  $\text{cm}^2$  entspricht <sup>[44;45]</sup>.

DNA-Moleküle binden aufgrund der Wasserstoffbrücken aneinander, die sich zwischen den zugeordneten Basenpaaren bilden. Daher wird bei bekannter Sequenz der entsprechend komplementäre DNA-Strang synthetisiert und immobilisiert und so die gesuchte Sequenz nachgewiesen. Die Nachweisgenauigkeit reicht heutzutage problemlos aus, um einzelne ausgetauschte DNA-Basen in einem 50bp langen DNA-Strang nachzuweisen. Die Untersuchung eines Einzel-Basenpaar-Austausches (SNPs) stellt zusammen mit dem mRNA-Profiling, bei dem eine differentielle Expressionsanalyse auf verschiedene Stimuli untersucht wird, die gängigsten Techniken für die Anwendung von DNA-Arrays dar <sup>[46-48]</sup>.

Da in der Zwischenzeit ausreichend „gesunde“ und „kranke“ Gensequenzen bekannt sind, können beide Analysenmethoden verwendet werden, um Gendefekte oder entsprechende Veranlagungen aufzudecken <sup>[37]</sup>.

Die 2-Farb-Methode erlaubt die Untersuchung von zwei Zellzuständen und man erhält daraus die Information über Gene <sup>[49]</sup>, die im Vergleich dieser beiden Zustände up- oder downreguliert wurden, jedoch keine Information über die tatsächliche Proteinmenge oder die Gesamtmenge an mRNA.

Jedoch zeigte sich, dass der Level an mRNA mitunter keine Aussage über die aktuelle oder zukünftige Entwicklung des Proteinpools in der Zelle zulässt <sup>[50]</sup>.

Zudem lässt das Wissen über die DNA-Sequenz und damit der Aminosäuresequenz eines Proteins keine Aussage über die Eigenschaften, die Konzentrationen oder den Aktivierungszustand des entstehenden Proteins zu. Allerdings ließ sich zeigen, dass sich mit Hilfe von Mikroarrays ebenfalls ein Protein-Profilung durchführen lässt, das äquivalent zu bisherigen Proteomanalysen ist <sup>[51;52]</sup>.

Um nun neben der Gesamtheit der Gene (Genom) auch die Gesamtheit der Proteine (Proteom) zu erfassen, war es unumgänglich die „ältere“ und langsamere 2D-Gel-Analyse des Proteoms <sup>[53]</sup> durch hochparallele Mikroarrays abzulösen.

Folglich wurden in den letzten Jahren zahllose Ansätze und Methoden entwickelt, um Protein-Mikroarrays zur Identifizierung, Quantifizierung und Funktionsanalyse von Proteinen, Proteinwechselwirkungen und Aktivierungszustände einzelner Proteine nachzuweisen <sup>[54-57]</sup>.

Im Gegensatz zu DNA oder RNA, die unabhängig von der Kettenlänge und Sequenz stets gleiche physikochemische Eigenschaften haben, besitzen Proteine mannigfaltige Eigenschaften, die sowohl von der Sequenz, der Größe, dem Lösungsmittel und dem Aktivierungszustand des Proteins und der Anwesenheit von Begleitproteinen und Salzen abhängt. Diese strukturelle Vielfalt erschwert die Entwicklung von Protein-Mikroarrays <sup>[58;59]</sup>.

Die Heterogenität der Proteine kommt von der enormen funktionellen und strukturellen Diversität der 22 proteinogenen Aminosäuren und von den posttranslationalen Modifikationen dieser Aminosäuren. Dabei legt primär die Aminosäuresequenz eine bestimmte Konformation fest, aber auch die Flexibilität des Proteins. Sekundär können Begleitproteine oder spezielle enzymatische Reaktionen das Protein aber auch in unvorhersagbare Konformationen „verdrehen“ und in Nebenenergieminima arretieren (z.B. durch kovalente Isopeptidbindungen zwischen einem Säureamid eines Glutamins und einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins). Solcherlei Modifikationen können zwar vorhergesagt werden, aber die Trefferquote ist noch recht niedrig.

Jedoch bestimmen genau diese Konformationen und auch einzelne Aminosäuren und Modifikationen die Interaktionsbereiche von Proteinen. Diese können auf ionische, polare, Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder auch nur auf Energie- und Entropie-Effekten beruhen. Partiiell können sich Proteine auch im Gesamten

umlagern, um über mehrere schwach bindende Wechselwirkungen hochaffine Mega- und Gigakomplexe zu bilden <sup>[60]</sup>.

Die Affinitäten von Protein-Protein-Interaktionen können durch dynamische oder statische posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung oder kovalente Anbindung von Markerproteinen, über einen sehr großen dynamischen Bereich biologisch variiert werden. Diese Dynamik spiegelt die Anpassungsfähigkeit der Zellen an die Umgebung und die sich stets ändernden Umweltbedingungen wieder.

Bis dato stellen sowohl die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine und der Modifizierungen, als auch der Mangel an selektiven und spezifischen Fänger- und Interaktionsmolekülen eine große Limitierung für die Protein-Mikroarrays dar. Daher ist es notwendig, dass ein Protein-Mikroarray an die zu identifizierenden Proteine angepasst wird. Allerdings kann man dabei kein Standard-Protokoll wie im Falle von RNA oder DNA verwenden. Trotzdem bietet die Identifizierung und Quantifizierung von Wechselwirkungspartnern und die Bestimmung von Bindungskonstanten ein sehr wirkungsvolles Mittel, um zelluläre Vorgänge und Zusammenhänge aufzuklären <sup>[54;61]</sup>.

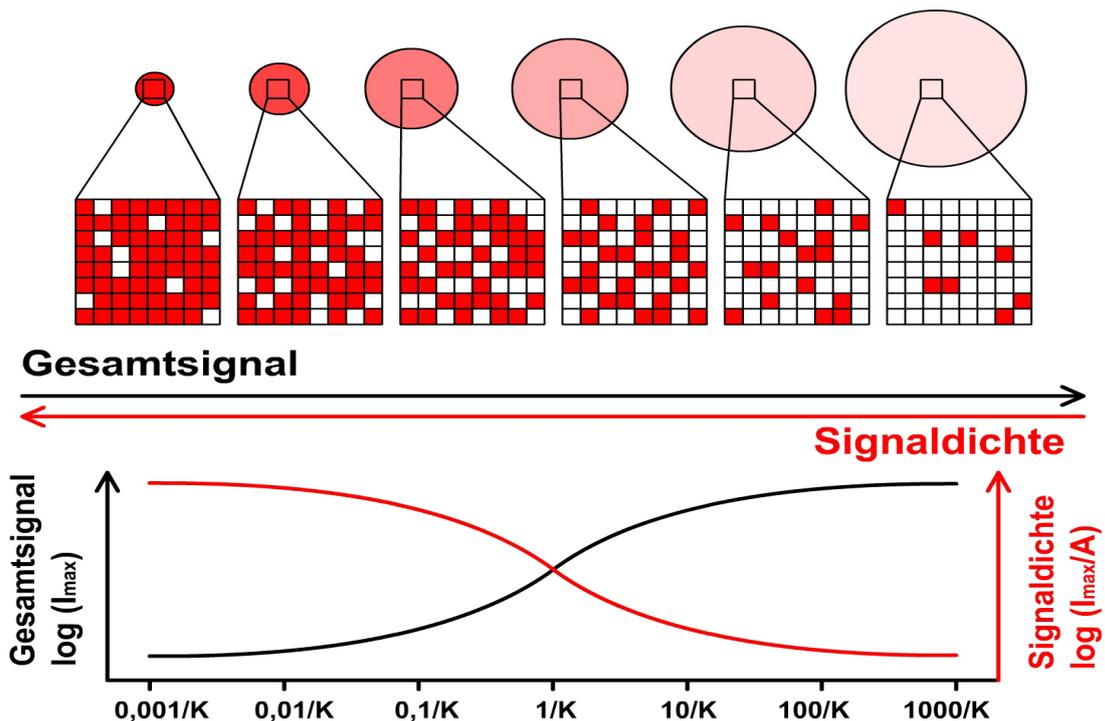
### **1.3 Ekins Theorie der kleinen Strukturen**

Roger P. Ekins, der als der Erfinder des Immunoassays bezeichnet werden kann <sup>[62-68]</sup> postulierte Ende der achtziger Jahre seine „ambient analyte theory“ <sup>[20;67;68]</sup>. Kernpunkt dieser Theorie ist, dass ein Assay, der an einer Oberfläche durchgeführt wird, umso sensitiver wird, je kleiner die Strukturgröße eines einzelnen Messpunktes mit einer bestimmten Sorte an Fängermolekülen wird. Also ein klares Votum für Miniaturisierung.

Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass alle Fängermoleküle auf einer Oberfläche mit einer konstanten Flächendichte immobilisiert werden. Auf unterschiedlich großen Strukturen bedeutet dies, dass eine unterschiedlich große Gesamtmenge an Fängermolekülen vorliegt. Eine kleine Fläche (Mikrospot) enthält deutlich weniger Fängermoleküle als eine entsprechend größere Fläche (Makrospot). Wird nun ein löslicher Ligand/Analyt zugegeben, so bindet er an das Fängermolekül. Auf Grund des Massenwirkungsgesetzes ist die Gesamtmenge an

gebundenem Analyten auf dem Mikrospot kleiner als auf dem Makrospot. Auf den ersten Blick scheint hier der Makrospot von Vorteil zu sein, aber bei genauer Betrachtung trügt der Schein.

Durch die Anlagerung des Analyten verringert sich dessen Konzentration in der Lösung, Makrospots verringern dementsprechend diese Konzentration stärker. Berücksichtigt man nun diese Konzentrationsverringering und die Fläche, so erkennt man, dass ein Mikrospot stets pro Flächeneinheit mehr Analytmoleküle einfängt als ein Makrospot. Da die Signalgenerierung meist über die Flächendichte (Analytmoleküle pro Flächeneinheit) erfolgt, heißt dies, dass ein Mikrospot stets ein stärkeres Signal liefert als ein Makrospot (Abb.1.1). Bei niedrigen Affinitäten und geringen Konzentrationen ist dieser Effekt besonders stark und die Flächendichte eines Mikrospots kann ein Vielfaches eines Makrospots betragen [69;70]



**Abb.1.1: Gesamtsignal und Signaldichte in der „Ambient Analyte Theorie“**

Fänger-moleküle werden auf unterschiedlich große Flächen (Spots) immobilisiert. Bei gegebener Analytkonzentration (vor Inkubation des Arrays) und einer Assoziationskonstante  $K$  des Analyten zum Fänger-molekül nimmt das Gesamtsignal mit der Spotgröße zu, aber die Flächendichte stetig ab. Befinden sich im Makrospot einige  $100/K$  Fänger-moleküle, so werden nahezu alle Analyten abgefangen und das Gesamtsignal steigt nicht weiter, jedoch sinkt die Flächendichte des Analyten stetig. Im umgekehrten Grenzfall erhöht sich die Flächendichte mit kleinerem Spot deutlich und ab ca.  $0,1/K$  Fänger-moleküle erreicht man ca. 90% der maximalen Flächendichte. Daher stellen diese  $0,1/K$  ein Optimum zwischen Signalgenerierung und Kleinheit des Spots dar. Diese Abbildung wurde entsprechend [2;20] modifiziert.

Hinzu kommt, dass sich das Verhältnis zwischen Signal auf dem Spot und Hintergrundsignal durch die Miniaturisierung stetig verbessert. Einzige Limitierungen dieses Effekts sind die räumlichen und zeitlichen Begrenzungen der Mikroarrayherstellung und der Signaldetektion. Der Ideal- und Wunschfall wäre eine zeitlich hochaufgelöste Einzelmoleküldetektion. Hiervon ist man derzeit noch 2.000.000 Moleküle <sup>[41]</sup> entfernt, jedoch mit der Limitierung, dass man nur eine Endpunktsbestimmung besitzt und es sich zudem „nur“ um ein DNA-Array mit vergleichsweise hoher Affinität handelt. Es wurden miniaturisierte Ligandenbindungsassays durchgeführt, mit denen noch femtomolare Mengen nachgewiesen werden konnten <sup>[70]</sup>. Jeder Schritt, der zu kleineren Strukturen oder besserer Signalerfassung führt, sollte also angestrebt werden.

## 1.4 Funktioneller Aufbau eines Mikroarrays

Ein Mikroarray besteht aus drei grundlegenden Bestandteilen.

- Dem **Immobilisierungsmedium**, auf dem die Fängermoleküle immobilisiert werden. Mit der Wahl des Immobilisierungsmediums legt man zumeist auch die verwendbare Chemie fest, mit der die Fängermoleküle auf der Oberfläche fixiert werden.
- Die **Fängermoleküle**, die den Analyten möglichst spezifisch und mit hoher Affinität binden sollen. Sie limitieren ebenfalls die verwendbare Chemie, mit der die Fängermoleküle auf dem Immobilisierungsmedium fixiert werden.
- Das **Detektionssystem**, hierzu zählen sowohl die Moleküle, die für die Signalgenerierung eingesetzt werden, als auch die Apparatur, die dieses Signal erfasst. Sie kann sowohl zur qualitativen, relativen, als auch zur quantitativen Detektion eingesetzt werden.

Zur Herstellung und Durchführung eines Mikroarrays benötigt man noch zwei weitere Komponenten:

- Eine **Übertragungstechnik**, mit der die Fängermoleküle auf das Immobilisierungsmedium übertragen und dort fixiert werden. Sie muss gewährleisten, dass die Fängermoleküle am richtigen Ort auf das Immobilisierungsmedium treffen und Kreuzkontaminationen zwischen verschiedenen Fängermolekülen verhindert werden.

- Den oder die **Analyten**, die man nachweisen möchte. Diese liegen zumeist in einem Gemisch aus verschiedensten Analyten in einer biologischen Probe vor. Die zu analysierenden Proben enthalten eine Reihe von Molekülen, die sich als störend erweisen können, indem sie die Fängermoleküle inaktivieren, unspezifisch an sie binden oder die Signalgenerierung verfälschen.

### 1.4.1 Immobilisierungsmedien für Mikroarrays

Als Immobilisierungsmedium wird meist ein Feststoff, in selteneren Fällen auch eine Flüssigkeit verwendet.

Als Standard haben sich zwei Immobilisierungsmedien durchgesetzt; planare Oberflächen und beadbasierte Träger.

Bei **planaren Trägern** werden meist Glas- oder Kunststoffoberflächen so modifiziert, so dass sie eine entsprechende Chemie zur Immobilisierung der Fängermoleküle aufweisen. Die Fängermoleküle werden zuvor synthetisiert und danach auf den Träger übertragen. Folgende Funktionalisierungen werden häufig verwendet:

- **Amino-, epoxy-, aldehyd- und carboxy-funktionalisierte** sowie **hydrophobe** Oberflächen, die über Silanisierung hergestellt werden. Auf diese Träger können die Fängermoleküle kovalent oder über Absorption gebunden werden. Die Absorption etabliert sich dabei über unspezifische, als auch über spezifische, wie ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen.
- **Hydrogele** und **matrixgestützte** Träger werden mit einem kovalent gebundenen, einigen  $\mu\text{m}$  dicken Polymer überschichtet. Der Polymerfilm nimmt die Fängermoleküle auf. Durch Absorption verbleiben diese im Träger.
- **SPOT-Träger**, sind meist poröse Membranen aus synthetischen Kunststoffen oder Zellulose <sup>[71;72]</sup>. Auf diesen Membranen werden die Fängermoleküle direkt mittels SPOT-Technik synthetisiert und bleiben kovalent angebunden. Bei der SPOT-Technik werden die

Synthesechemikalien auf jeden Spot einzeln aufpipettiert und man erhält so unzählige, unterschiedliche Fänger-moleküle. Die einige hundert  $\mu\text{m}$  durchmessenden Spots sind aufgrund des Herstellungsverfahrens stets rund und am Rand des Spots kann eine vollständige Synthese des Fänger-moleküls nicht gewährleistet werden.

- **Photolithographische Träger** sind solide Glas- oder Kunststoffträger, auf denen mittels Halbleitertechnologie die Fänger-moleküle synthetisiert werden <sup>[73-76]</sup>. Mittels Photolithographie ist es möglich, jede beliebige Strukturform mit einer Genauigkeit unter einem  $\mu\text{m}$  herzustellen. Dieses Verfahren ist jedoch zeitaufwändig und teuer.

Planare Träger werden zumeist mit einem Scanner ausgelesen, der im prinzipiellen Aufbau einem Mikroskop entspricht.

Bei **beadbasierten Trägern** <sup>[77-81]</sup> werden kleine, wenige hundert Mikrometer durchmessende Kügelchen (Beads) verwendet. Diese Beads bestehen meist aus einem Polymer oder einem Polymergemisch. Einige Beads werden auch kunstvoll aus mehreren Schichten Polymer aufgebaut, die jeweils die Eigenschaften der Beads und chemischen Modifikationen definieren. Während dieses Aufbaus können auch verschiedene Mengen und Arten an Fluorophoren copolymerisiert werden, was später als Detektionssystem verwendet wird. Kommerziell erhältlich sind auch Beads, die Barcodes oder magnetische Materialien im Kern enthalten. Beads können entweder für die direkte Synthese der Fänger-moleküle verwendet werden, oder sie werden wie die planaren Träger modifiziert und die Fänger-moleküle darauf immobilisiert.

## 1.4.2 Fänger-moleküle

Als Fänger-molekül kann prinzipiell jedes Molekül verwendet werden. Für eine entsprechende spätere Signalgenerierung ist es jedoch notwendig, dass dieses Fänger-molekül möglichst spezifisch und mit möglichst hoher Affinität an den Analyten bindet. Man teilt die Fänger-moleküle nach ihren chemischen Monomeren ein.

- **DNA** wird zumeist als synthetische Oligomere (12- bis 60-mer) oder in Form von cDNA verwendet <sup>[82]</sup>. Die DNA dient als Fängermoleküle für andere DNA-Stränge oder mRNA und liefert damit wertvolle Information über Gene, Verwandtschaftsverhältnisse und Mutationen <sup>[83]</sup>. Das Desoxyribose-phosphat-Rückgrat der DNA ist stark positiv geladen und kann daher z.B. mit negativ geladenen Proteinen unspezifisch reagieren.
- **Proteine** und **Peptide** bestehen aus Aminosäuren und verfügen durch deren mannigfaltige Eigenschaften über ein riesiges Spektrum an Eigenschaften <sup>[84]</sup>. Daher können sie ebenso vielfältig als Fänger eingesetzt werden <sup>[54;85-88]</sup>. Sie wurden als Fängermoleküle für Proteine <sup>[89;90]</sup>, DNA <sup>[91]</sup>, Lipide <sup>[57]</sup>, Oligosaccharide <sup>[92]</sup>, zur Identifikation von Enzym-Substrat-Interaktionen <sup>[89]</sup>, aber auch für die Feststellung der Wechselwirkung zwischen niedermolekularen Verbindungen und Proteinen <sup>[93;94]</sup> verwendet. Daher bietet die Gruppe der Proteine und Peptide das größte Potential, was auch gleichzeitig die größte Restriktion darstellt. Durch die mannigfaltigen Eigenschaften kann nahezu jegliche Struktur hergestellt werden. Jedoch sorgen diese flexiblen Strukturen auch für viele unspezifische Wechselwirkungen und „anspruchsvolle“ Umgebungsbedingungen für Lagerung und Anwendung von Proteinen. Weniger anspruchsvoll sind dahingegen Peptide, die zumeist synthetisch sind und auch länger und einfacher gelagert werden können und üblicherweise nicht denaturieren.
- **Antikörper** sind biologischen Ursprungs und von Natur aus darauf spezialisiert ein bestimmtes Antigen und damit ein bestimmtes Merkmal eines Liganden zu erkennen. Sie stellen wohl die Fängermoleküle mit höchster Spezifität und Affinität dar <sup>[95;96]</sup>. Allerdings sind sie deutlich aufwändiger zu gewinnen. Man unterscheidet zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Polyklonale Antikörper (pAb) werden aus Blutseren gewonnen, bei denen der meist tierische Spender zuvor mit dem entsprechenden Antigen/Analyten geimpft wurde. Die darauf folgende Immunreaktion erzeugt ein polyklonales Gemisch aus Antikörpern gegen den Analyten. Monoklonale Antikörper (mAb) sind ein wichtiges diagnostisches Werkzeug, auf denen nahezu alle medizinischen Nachweise wie beispielsweise Schwangerschafts- und Drogentests beruhen. Sie

werden in gleichbleibender Qualität meist aus kontinuierlicher Kultivierung von Hybridomzelllinien gewonnen und zeigen gleichbleibende Affinität und Spezifität. Zumeist werden, sofern erhältlich oder vorhanden, monoklonale Antikörper für Mikroarrays eingesetzt <sup>[50;97]</sup>. Da die klassische Erzeugung monoklonaler Hybridome sehr zeitintensiv und aufwändig ist, wurden in den letzten Jahren Methoden zur schnelleren Erzeugung und Identifizierung hochaffiner Antikörper oder antikörperartiger Komplexe entwickelt, wie beispielsweise Affibodies <sup>[98;99]</sup>, Lipocaline <sup>[100]</sup> oder Antikörper-Phagen- oder Ribosomen-Displays <sup>[101-104]</sup>. Bei der Lagerung von Antikörpern kann es schnell zu einer Denaturierung und damit zu einem Verlust an Funktionalität kommen. Jedoch zeigten sie nur geringe unspezifische Wechselwirkungen und sie sind trotz der aufwändigen Gewinnung ein wertvolles Werkzeug in der Analytik.

- **Niedermolekulare Binder** sind kleine Moleküle <sup>[105]</sup> mit einer Molekularmasse von üblicherweise unter 1000 D. Sie werden zumeist auf Bindung mit Proteinen getestet <sup>[94;106]</sup> und haben das Potential, als pharmazeutisch aktive Verbindungen zu wirken, indem sie die Aktivität und Spezifität eines Proteins, Rezeptors oder Enzyms modifizieren. Diese „small molecules“ können mittels kombinatorischer Chemie schnell, mit vielfältigen chemischen Eigenschaften und in größeren Mengen hergestellt werden. Aufgrund ihrer kleinen molekularen Masse werden sie häufig direkt von den Zellen aufgenommen, ohne modifiziert oder verdaut zu werden. Kleine Moleküle (small molecules) sind lagerstabil. Jedoch kann die Immobilisierung zu einer Veränderung der Eigenschaften führen, was zu negativen oder falsch positiven Einstufungen der Wirksamkeit der kleinen Molekülen führen kann <sup>[93;107-110]</sup>.
- **Substrate** sind bereits bekannte oder potentielle Interaktionspartner eines Enzyms. Hierbei werden möglichst substrat-ähnliche Moleküle verwendet und man führt ein so genanntes „Profiling“ durch. Hierdurch erfährt man, welche Verbindungen als Substrate dienen können und wie spezifisch die Enzyme reagieren, sowie welche Substratklassen vom Enzym akzeptiert werden <sup>[89;95;111]</sup>.

### 1.4.3 Übertragungssystem

Das Übertragungssystem soll gewährleisten, dass die Fängermoleküle auf der Oberfläche immobilisiert werden. Generell gibt es zwei grundsätzliche Methoden: In der ersten werden die Fängermoleküle vor Ort synthetisiert und nicht übertragen, in der zweiten dagegen findet die Synthese vorgelagert statt und man muss die Fängermoleküle ortsaufgelöst deponieren.

- Bei einem **SPOT-Array** werden die Fängermoleküle an dem Ort synthetisiert, an dem sie später auch für die Bindungsmessung eingesetzt werden. Meist handelt es sich dabei um polymere Moleküle, die durch sich wiederholende Aufbauzyklen Stück für Stück verlängert werden. Die entsprechenden Chemikalien werden dabei mit einem Printing- bzw. Plotter-System, das einem Drucker entspricht, an Ort und Stelle deponiert. Die erhaltenen Spots sind zwischen 300  $\mu\text{m}$  und 1 mm groß, wodurch man bis zu 500 Spots pro  $\text{cm}^2$  erreicht <sup>[71;72]</sup>.
- Bei der Festphasen-Synthese <sup>[112;113]</sup> werden die Fängermoleküle auf Polymerkugeln (Beads mit einigen hundert  $\mu\text{m}$  Durchmesser) synthetisiert. Diese Beads werden für die Synthese mit der jeweiligen Reaktionslösung überschichtet. Nach dem Reaktionsschritt wird die Lösung durch Abfiltrieren entfernt. Durch Vermischen der Beads aus verschiedenen Reaktionsgefäßen mit unterschiedlichen Reaktionsschritten ist es möglich, dass auf jedem Bead eine einzige Sorte an Fängermolekülen synthetisiert wird. Üblicherweise werden diese Fängermoleküle dann abgespalten und aufgereinigt. Bei einem **Bead-Array** <sup>[114]</sup> werden die Beads gleich mit dem Analyten inkubiert und auf Bindung untersucht. Man ist bei diesem System nur durch die Zahl der Beads begrenzt und unterliegt so gesehen keiner Flächenlimitierung wie bei anderen Arrays.
- Bei **geplotteten Mikroarrays** werden die Fängermoleküle <sup>[45;115]</sup> mittels eines Nanopipettier-Roboters bzw. eines Nanoplotters auf die Oberfläche „abgesetzt“. Hierfür sind die Fängermoleküle zuvor synthetisiert worden und befinden sich in einer Lösung, die vom Nanopipettier-Roboter entnommen und auf die Oberfläche abgegeben wird. Die erhaltenen Strukturgrößen liegen im Bereich um 100 bis 200  $\mu\text{m}$  und man erhält so bis zu 2.000 verschiedene Fängermolekül-Spots pro  $\text{cm}^2$ .

- **Lithographische Mikroarrays** <sup>[116-118]</sup> werden durch optisch spaltbare Schutzgruppen zugänglich. Die Fängermoleküle werden Schritt für Schritt vor Ort auf der Oberfläche aufgebaut. Die lithographischen Schritte sind zwar bis in den Submikrometerbereich strukturgenau, aber ebenfalls zeit- und kostenaufwändig. Auch bei diesem Arraytyp werden die Fängermoleküle als Polymere zyklisch aufgebaut. Ein Schritt dabei ist jeweils von lithographischer Natur, der die Struktur aufbaut. Man erreicht heute minimal 2 µm Strukturbreite und kommerzielle DNA-Chips besitzen eine Dichte von über 500.000 unterschiedlichen Sequenzen pro cm<sup>2</sup>.

Die Herstellung oder die Deponierung der Verbindungen vor Ort ist sehr zeitaufwändig und nimmt mindestens linear mit der Zahl der verwendeten Verbindungen zu. Eine Reduktion dieser limitierenden „Herstellungszeit“ wird derzeit angestrebt.

#### 1.4.4 Detektionssysteme

Als Detektionssystem kann jede physikalische Messgröße verwendet werden, die sich während der Bindung ändert oder die Eigenschaften des Systems selbst beeinflusst. Generell sind dies elektrische, optische, magnetische oder thermale Änderungen. Im Bereich der optischen Änderungen sind die meisten Methoden zu finden. Einige Methoden nutzen dabei auch die Kombination verschiedener Eigenschaftsänderungen.

- **Farbmarkierung** entsteht durch die Anbindung eines gefärbten Moleküls an den Analyten oder Änderung der optischen Eigenschaften durch Anlagerung des Analyten an das Fängermolekül. Die entsprechende Farbänderung wird optisch nachgewiesen und ist proportional zur Menge an gebundenem Analyten.
- **Fluoreszenz** ist eine Farbmarkierungstechnik <sup>[119]</sup>, bei der ein angebundener Farbstoff mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und eine rot-verschobene Wellenlänge abgegeben wird. Diese Methode ist die am häufigsten eingesetzte Methode und kann parallel mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt werden. Man kann weiterhin eine Verstärkung (Enhancing) oder Auslöschung (Quenching) der Fluoreszenz

durch räumliche Nähe zwischen Fängermolekül und Analyt erzielen. Weiterhin kann man durch räumlicher Nähe, so eine Farbverschiebung oder auch eine Energieübertragung von einem Fluorophor zum anderen erzeugen (FRET) <sup>[120-125]</sup>.

- Der **Immunsorbent Assay** <sup>[126]</sup> wird in mehrere Untergruppen eingeteilt. Generell weist man die Anbindung des Analyten durch eine weitere Anbindung eines zweiten Fängermoleküls nach. Dieses bindet den Analyten an einer anderen Stelle als das erste Fängermolekül, das auf der Oberfläche immobilisiert wurde. Meist ist dieses zweite Fängermolekül ein Antikörper, durch den die Detektion ermöglicht. Ist dieser Antikörper radioaktiv markiert, so spricht man von einem radioaktiven Immunoassay (RIA). Enthält er einen Metallkomplex oder -partikel, dann handelt es sich um einen metallographischen Immunoassay (MIA). Heutzutage wird hauptsächlich der „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) verwendet. Für diese Durchführung wird an den detektierenden zweiten Antikörper ein Enzym angehängt, das durch die Umsetzung seines Substrats, meist zu einem Farbstoff, eine Verstärkung des Signals erzeugt. Hierdurch stellt der Immunoassay eine Verstärkung anderer Methoden dar.
- Das **Evaneszente Feld** <sup>[127;128]</sup> ist eine quantenmechanische, elektrooptische Eigenschaft einer Oberfläche oder eines Phasenübergangs. Dieses Feld befindet sich in nächster Nähe zur Oberfläche (wenige  $\mu\text{m}$ ) und die Signalgenerierung nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche ab. Lagert sich ein Analyt an diese Oberfläche an, so wird sich auch das Evaneszente Feld ändern. Mehrere Methoden um diese Feldeigenschaft auszumessen, werden heute verwendet. Hierzu zählen die von Biacore kommerzialisierte Surface Plasmon Resonanz (SPR) bei der die Winkeländerung von reflektiertem polarisiertem Licht an der Phasengrenze vermessen wird. Bei der Reflektometrischen Interferenz Spektroskopie (RIfS) <sup>[129]</sup> verschieben sich Interferenzmaxima und -minima durch Anlagerung. Weitere Methoden in diesem Bereich sind unter anderem die „Abgeschwächte Totalreflexion Fourier Transformation Infrarot Spektroskopie“ (ATR-FTIR) <sup>[130]</sup> und Lichtfaser-Spektroskopie <sup>[131-134]</sup>.

- Die Erfassung **elektrische Eigenschaften**, wie beispielsweise die Leitfähigkeit, <sup>[135;136]</sup> in einer Mikrofluidik-Kammern oder auf Mikrochips, finden aber kaum Einsatz, da viele Biomoleküle nicht elektrisch leitend sind. Häufiger wird diese Eigenschaft zur Ermittlung des pH-Wertes verwendet.
- **Wärmetönung** ist das Freiwerden oder Verbrauchen von Wärme während der Bindung <sup>[136;137]</sup>. Diese Methode findet meist zur Bestimmung von Bindungskonstanten ihre Anwendung. Jede Zugabe des Analyten erzeugt oder verbraucht eine gewisse Menge an Wärme. Durch wiederholte Zugabe des Analyten verändert sich diese Wärmemenge, da aufgrund des chemischen Gleichgewichts nicht mehr alle Analyten reagieren, und erlaubt so einen Rückschluss über die Bindung.
- **Räumliche Ausdehnung** kann beispielweise mit Raster-Kraftmikroskopie (AFM), Raster-Tunnelmikroskopie (STM) oder Elektronenmikroskopie (SEM) vermessen werden.

Es stehen heutzutage noch viele weitere Methoden zur Verfügung, diese beruhen aber zumeist auf den oben genannten Prinzipien oder sind davon abgeleitet.

Hiervon abzuheben sind biologische „Detektionssysteme“. Meist wird hierbei die Wirkung eines Moleküls durch Auslesen einer Färbung (beispielsweise induziertes GFP), durch Detektion der Überlebensrate von Zellen oder durch den Nachweis von Molekülen, die Zellen auf ein Signal hin absondern, überprüft. Hierbei verwendet man die Zellen sozusagen als Mittler für die Detektion und erstellt eine biologische Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Die eigentliche Detektion erfolgt jedoch nach den oben genannten Prinzipien.

## 1.5 Zwei-Komponenten-Assays

Zu Beginn des Kapitels wurden Ein-Komponenten-Assays beschrieben, bei denen man die direkte molekulare Wechselwirkung über Mikroarrays feststellen und so Wirkstoffe identifizieren kann. Besitzt man nun die Kenntnis über die Wirkung zweier verschiedener Verbindungen, so kann man nicht vorhersagen, wie sie gemeinsam wirken und welche gegenseitige Wechselwirkung sie verursachen. Hierfür sind weitere biologische Tests notwendig.

Bei einem Zwei-Komponenten-Assay handelt es sich um das gleichzeitige Austesten und/oder Titrieren von zwei biologisch aktiven Komponenten auf kombinierte Wirkung <sup>[138;139]</sup>. Hierbei will man feststellen, ob durch die Kombination zweier verschiedener Wirkstoffe eine verstärkende, abschwächende oder veränderte Wirkung auftritt. Gleichzeitig kann man feststellen, ob ein Wirkungsminimum oder -maximum existiert. Dies ist auch für die pharmazeutische Industrie von Interesse sein, um Nebenwirkungen und Kreuzreaktionen verschiedener Medikamente festzustellen oder die optimale Mischung eines Kombinationswirkstoffes festzulegen.

In einem biologischen Test benötigt man für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung eines Wirkstoffs zwischen 7 und 10 Messpunkte. Für die Kombination mit einem weiteren Wirkstoff benötigt man dementsprechend schon 49 bis 100 Messpunkte.

Pro Messpunkt werden für einen biologischen Test mindestens 3 Pipettierschritte (Vorlage der Zellen, Zugabe des ersten Wirkstoffes, Zugabe des zweiten Wirkstoffes) benötigt. Damit benötigt man bis zu 300 Pipettierschritte, um von 2 Wirkstoffen die Konzentrations-Wirkungsbeziehung festzustellen. Will man nun beispielsweise 50.000 Wirkstoffe in Kombination miteinander testen, so würde man schon 2,5 Milliarden Tests benötigen, was einer knappen Billiarde Pipettierschritte entsprechen würde. Bisher setzt man bei der „Lösung“ dieses Problems auf Automatisierung mittels Roboter und Miniaturisierung mittels Mikrotiterplatten. So konnte bisher der Verbrauch an Materialien und Wirkstoffen, aber nicht an Prozessschritten, verringert werden.

Es ist daher dringend notwendig diese enorme Zahl der Manipulationsschritte zu minimieren.

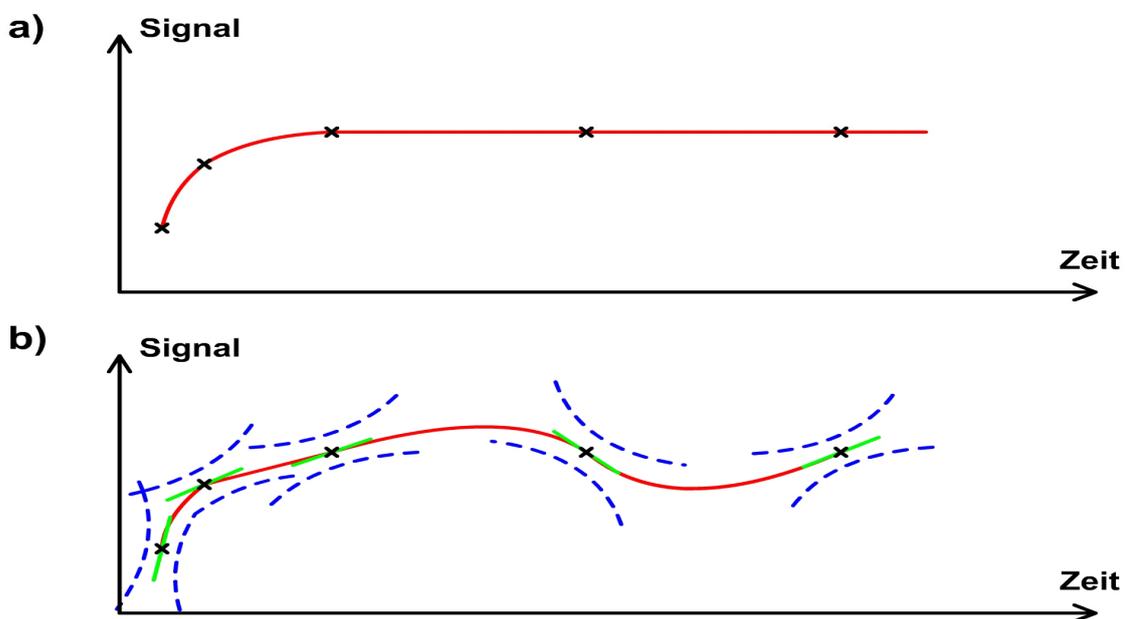
## 1.6 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines, 8,6 kD schweres Protein <sup>[140]</sup>, das in allen Eukaryonten zu finden ist. Es spielt eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von Zellregulierungszyklen und der Proteinhomöostase (genauere Ausführung siehe Kapitel 3.6).

Durch die kovalente Anbindung von Ubiquitin an ein Protein wird dieses Protein zum Abbau im 26S Proteasom markiert. Wird das Ubiquitin, durch weitere

Anbindung von Ubiquitin zu einem Polyubiquitin erweitert, dann wird das markierte Protein abgebaut. Der Abbau dient sowohl dem Recycling von Aminosäuren als auch dem Entsorgen „alter“ Proteine und es dient auch zur Beladung der MHC-I-Moleküle, um eine Immunerkennung zu gewährleisten. Die Menge an ubiquitinylierten Proteinen ist also ein Maß für den zukünftigen Abbau dieser Proteine <sup>[16;17]</sup>.

Zusammen mit den Ergebnissen von mRNA-Arrays, die ein Maßstab für den Aufbau von Proteinen sind, und der Proteomanalyse, die ein Maßstab für den Proteinbestand ist, ist die Kenntnis des Ubiquitinylierungsgrades, der ein Maßstab für den Abbau darstellt, kann man letztendlich eine Prognose der Entwicklung des Proteinpools aufstellen. Mathematisch ausgedrückt, stellt eine Proteomanalyse den Funktionswert  $c(t)$  dar. Die mRNA-Analyse liefert die relative Erhöhung  $+\Delta c(t)$  und die Analyse des Ubiquitins die relative Verringerung  $-\Delta c(t)$ . Somit erhält man die relative Änderung  $\Delta c(t)$ , die der Steigung entspricht (Abb.1.2). Aus derselben Information kann so eine wesentlich bessere Prognose über die zukünftige Proteinmengen erhalten werden.



**Abb.1.2: Kenntnis nomineller Änderungsgrößen und Vorhersage des Kurvenverlaufs**

Durch die Kenntnis des Nominalwertes (a) einer Funktion  $c(t)$  besitzt man nur einige Punkte, die man zu einer Kurve verbinden kann. Man geht dabei aber das unkalkulierbare Risiko ein, das Verhalten der Kurve falsch zu interpretieren.

Bei zusätzlicher Kenntnis der relativen Änderung (b) eines Nominalwertes erhält man über die Änderung  $\Delta c(t)$  sowohl die Steigungen (grün) als auch eine Abschätzung (unterbrochenes blau) über die Zuverlässigkeit der Kurve. Somit kann man mit denselben Messwerten (a) einen deutlich anderen Kurvenverlauf (b) erhalten.

Bisher war es nicht möglich, Antikörper mit hoher Affinität gegen Ubiquitin zu erzeugen. Dies ist durch seine Funktionalität im Proteinabbau bedingt. Sollte eine Zelle Antikörper gegen Ubiquitin produzieren, so wird dies unweigerlich ihre Proteinhomöostase stören und zum Absterben der Zelle selbst führen. Bisherige Antikörper gegen Ubiquitin wurden mittels Phage-Display erzeugt und besitzen eine recht geringe Affinität im mittleren mikromolaren Bereich. Aufgrund der niederen Affinität ist es mit den bisherigen gelabelten Antikörpern nicht möglich, Ubiquitin hinreichend quantitativ zu detektieren und damit Informationen über den Ubiquitinylierungsstatus des Proteinpools zu erhalten.

Man weiß heute, dass Ubiquitin in allen Lebewesen die Regulierung des Proteinabbaus und der Proteinhomöostase steuert und daher bei der Entwicklung vieler degenerativer Krankheiten wie bestimmten Formen von Alzheimer, Parkinson oder dem Huntington-Syndrom eine entscheidende Rolle spielt. Eine Beteiligung von Ubiquitin wird bei nahezu allen Krankheiten, bei denen die Proteinhomöostase aus den Fugen gerät, angenommen <sup>[141-148]</sup>. Weiterhin spielt Ubiquitin eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse I, da nur ubiquitinylierte Proteine durch das Proteasom abgebaut werden <sup>[149-155]</sup>.

Daher sind hochaffine Binder für Ubiquitin, sowohl für die Diagnostik als auch für die Forschung von hohem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse. Ein hohes Potential für die Entwicklung solcher Ubiquitinbinder bieten sowohl die Untersuchung von kombinatorischen Verbindungskollektionen als auch das rationale Design von Strukturanaloga zu natürlichen Bindern und zu den Interaktionspartnern von Ubiquitin.

## 2 Zielsetzung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollen drei unterschiedliche Verfahren zur Detektion und Auffindung molekularer Interaktionen untersucht werden.

### 2.1 LIPODOTs + Statistische Mikroarrays = LIPODOT-Array

Die organische Synthese von Verbindungen an fester Phase oder polymeren Trägern ermöglicht in kurzer Zeit die Synthese Millionen unterschiedlichster Verbindungen. Jedoch erforderte bisher z.B. die Herstellung von Mikroarrays aus diesen Verbindungen erheblich mehr Zeit als die Synthese der Verbindungen. Zur Übertragung von einer Million Verbindungen mittels eines Nanopipettier-Roboter, der über einen 96-Pinhead Druckkopf verfügt, benötigt man bei einer utopisch kurzen Übertragungszeit von 96 übertragenen Verbindungen pro Sekunde noch knapp 3 Stunden pro Mikroarray. Dabei müsste eine Mikrotiterplatte pro Sekunde transferiert werden, was bei den handelsüblichen Abständen zwischen den Lagerplatten für die Verbindungen und den zu pipettierenden Mikroarrays bedeuten würde, dass die Roboterarme mit über 30 km/h hantieren müssten und man innerhalb von drei Stunden über zehntausend 96-Well-Mikrotiter Platten (über 500 kg!) transportieren müsste.

Üblicherweise beträgt die kommerzielle Herstellungszeit dieser Arrays einige Wochen. Bisher wurden Arrays mit mehr als 1.000.000 Verbindungen nur mit DNA hergestellt. Es gilt bei allen bisherigen Verfahren, dass die Übertragungszeit mindestens linear mit der Zahl der zu übertragenden Verbindungen wächst. Deswegen wird hier die Entwicklung einer Methode beschrieben, die in ihrem Zeitbedarf unabhängig von der Zahl der zu übertragenden Verbindungen ist. Zudem soll es damit möglich sein, innerhalb kürzester Zeit mehrere Kopien eines Arrays herzustellen.

Die Übertragung soll unabhängig von der chemischen Natur der Verbindungen sein und möglichst kleine Strukturgrößen und damit möglichst hohe Packungsdichten erlauben. Es wird die Übertragung von einer Million unterschiedlicher Verbindungen angestrebt. Zudem soll ein Verankerungssystem zur Anbindung der übertragenen Verbindungen entwickelt werden, das mit dem

Übertragungsprinzip vereinbar ist und das eine möglichst geringe Wechselwirkung mit biologischen Proben zeigt.

Insgesamt soll eine Technik verfügbar sein, die es ermöglicht eine beliebige Anzahl von auf Trägerharzen synthetisierten Verbindungen in kürzester Zeit auf eine assaytaugliche Oberfläche zu übertragen, also ein Array zu erzeugen, und dort molekulare Interaktionen mit einem gegebenen Liganden Assay zu untersuchen. Dabei kann es sich sowohl um Bindungs-, Kompetitions- oder Substratmessungen handeln.

## **2.2 Diffusionsassay und 2D-Gradienten**

Im Rahmen dieser weiteren Aufgabenstellung ist auch ein Assay für Kombinationswirkstoffe entwickelt worden, der mit möglichst wenigen Arbeits- und Pipettierschritten dieselbe oder eine höhere Informationsmenge im Vergleich zu einer Mikrotiterplatte generiert.

In diesem Zusammenhang soll die zeitgleiche Wirkung zweier Moleküle auf Zellen in einem Zwei-Komponenten-Assay in Form eines zellulären Interleukin-8-ELISAs untersucht werden. Der Assay und die Apparaturen sollen zellkompatibel sein. Weiterhin sollen Standard-Techniken aus der Immunologie und Zellkultur integrierbar und/oder parallel anwendbar sein. Dieser Zwei-Komponenten-Assay soll kalibrierbar und mit Standard-Techniken wie Mikroskopie auslesbar sein. Insgesamt ist eine Vergleichbarkeit zu bisher bestehenden Techniken zu gewährleisten, jedoch mit dem klaren Vorteil, dass die benötigten Prozessierungsschritte deutlich reduziert sind.

## **2.3 Neue Ubiquitin-Liganden**

Eine weitere Aufgabenstellung ist die Suche nach neuen Ubiquitin-Liganden. Eine kleine Kollektion an Peptiden wird anhand von Kristallstrukturen Ubiquitin-interagierender Proteine abgeleitet.

Dieses Verfahren, bei dem nur eine kleine Anzahl an Verbindungen erzeugt wird, ergänzt die geplanten Array-Entwicklungen, die über eine große Zahl an Verbindungen eine molekulare Interaktion nachweisen will. Im Gegensatz zum

Array sind hier jedoch „bindende“ Strukturen bekannt, die als Grundlage für die Entwicklung neuer Binder dienen.

Von den abgeleiteten Peptiden sollen Ubiquitinbinder identifiziert und wenn möglich auf hohe Affinität optimiert werden. Als Idealfall wird die Herstellung eines Affinitätsharzes angestrebt.

### **3 Allgemeine Grundlagen**

Im Folgenden sollen die technischen, chemischen und biochemischen Grundlagen vermittelt werden, die entweder zum tieferen Verständnis des Hintergrundes beitragen, später Verwendung finden oder den gegenwärtigen Stand der Technik aufzeigen.

#### **3.1 Immobilisierungsstrategien**

Zur Generierung von Mikroarrays für hochparallele molekulare Interaktionsmessungen ist es unumgänglich einen Interaktionspartner auf der Oberfläche zu immobilisieren.

Für die Immobilisierung gibt es zwei grund- und gegensätzliche Strategien. Entweder werden die Liganden als Vor-Ort-Synthese direkt auf der Oberfläche synthetisiert, wie bei der Photolithographischen Synthese oder der SPOT-Synthese, und sind damit schon direkt immobilisiert oder sie werden nach der Synthese auf die Oberfläche transferiert (Nanoplotting, Softlithographisches Printing etc.) und dort immobilisiert. Für diese nachträgliche Immobilisierung gibt es sehr viele verschiedene Methoden.

Biologische Extrakte oder einzelne Proteine können bisher noch nicht orts aufgelöst parallel synthetisiert werden und müssen daher nach der Aufreinigung auf die Oberfläche übertragen und immobilisiert werden.

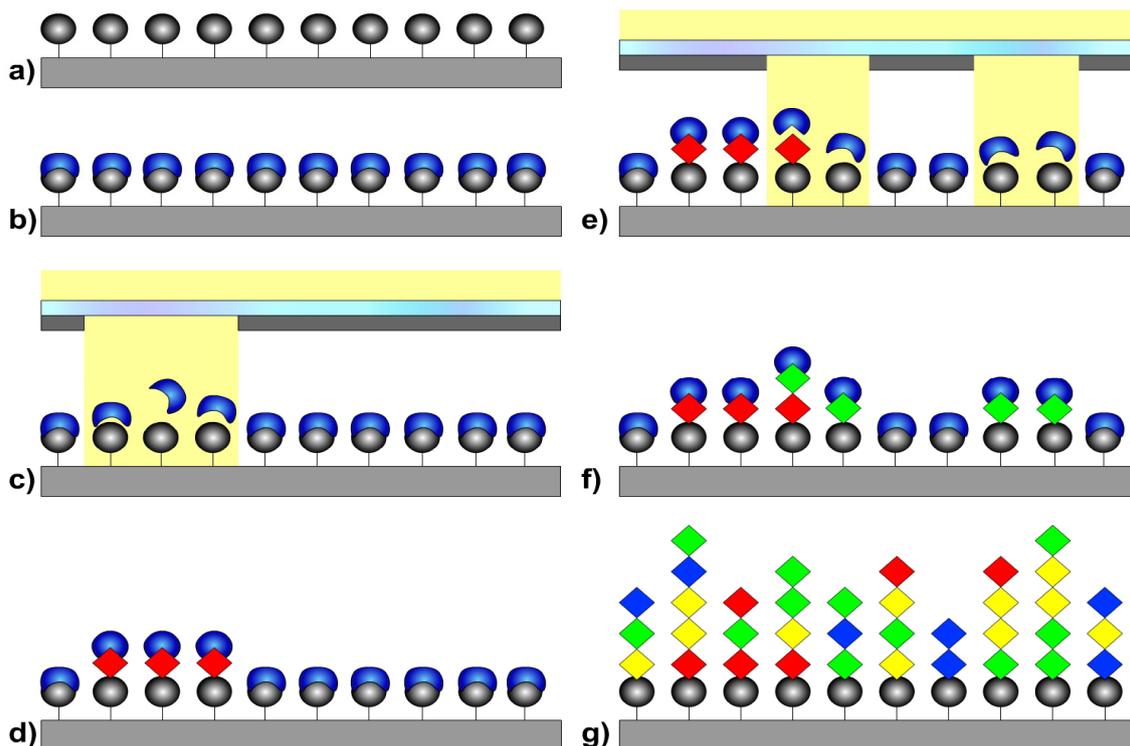
##### **3.1.1 Techniken zur Immobilisierung**

###### **3.1.1.1 Photolithographische Synthese**

Eine der ersten Vor-Ort-Synthesen ist die von Affymetrix patentierte Synthese <sup>[116]</sup> von DNA mittels Photolithographie. Andere Synthesen, bei denen meist lineare Moleküle aufgebaut werden, wurden mit dieser Technik in der Zwischenzeit ebenfalls etabliert.

Unabhängig von den Bausteinen ist die Synthesestrategie stets identisch (Abb.3.1). Auf einen planaren Träger wird eine Grundfunktionalität wie eine Amino- oder Carboxygruppe aufgebracht (Abb.3.1a). Diese wird durch eine

lichtspaltbare (photolytische) Schutzgruppe zunächst blockiert (Abb.3.1b). In einem photolithographischen Prozess, der ursprünglich aus der Halbleiterphysik stammt, werden einzelne Strukturen belichtet und dadurch die Schutzgruppe dort abgespalten (Abb.3.1c). In einem folgenden Kupplungsschritt wird ein Baustein an die freigesetzten funktionellen Gruppen kovalent gebunden (Abb.3.1d). Der Baustein enthält dieselbe photolytische Schutzgruppe, die auch zur Inaktivierung der Oberfläche eingesetzt wurde. Wieder wird in einem photolithographischen Prozess die Oberfläche belichtet, dadurch die Schutzgruppe abgespalten (Abb.3.1e) und erneut ein Baustein angebunden (Abb.3.1f). Dieser Zyklus wird stetig mit jeweils unterschiedlichen Belichtungsmasken wiederholt. So entsteht in jeder Belichtungszone ein anderer Oligomer (Abb.3.1g). Heute liegt die Effizienz eines Belichtungs-Kupplungszyklus bei 99,6% für DNA und ermöglicht so auf einem DNA-Array Oligomere bis zu 60 Basenpaaren mit einer Reinheit von 80%. Mit der Länge und der Anzahl der erzeugten Polymere wächst auch der Zeitbedarf für die Herstellung der DNA-Arrays.



**Abb.3.1: Durchführung einer photolithographischen Synthese**

Ein planarer Träger (a) verfügt über eine funktionelle Gruppe. Diese wird durch eine photolytische Schutzgruppe inaktiviert (b). Im eigentlichen photolithografischen Schritt werden einzelne Bereiche belichtet (gelber Strahl) und dort die Schutzgruppe abgespalten (c). Ein Baustein wird angekuppelt (d), der ebenfalls über die photolytische Gruppe verfügt. Durch zyklisches Belichten unterschiedlicher Zonen der Oberfläche (e) und erneuter Kupplung eines Bausteins (f) entstehen in den einzelnen Zonen Oligomere mit unterschiedlichem Aufbau und unterschiedlicher Länge (g).

Auf diese Weise können Strukturen von minimal 10 µm Kantenlänge erzeugt werden. Allerdings ist diese Methode mit einem hohen technischen Aufwand verbunden, der nahezu an die Herstellung eines Mikrochips heranreicht. Zur Herstellung eines DNA-Chips mit 60mer Oligomeren sind mindestens 240 photolithographische Masken für die Belichtungsschritte notwendig. Man könnte aber auf diese Art und Weise  $1,33 \cdot 10^{36}$  unterschiedliche Sequenzen erzeugen. Für einen Pentium 5 Chip benötigte man etwa 200 Masken.

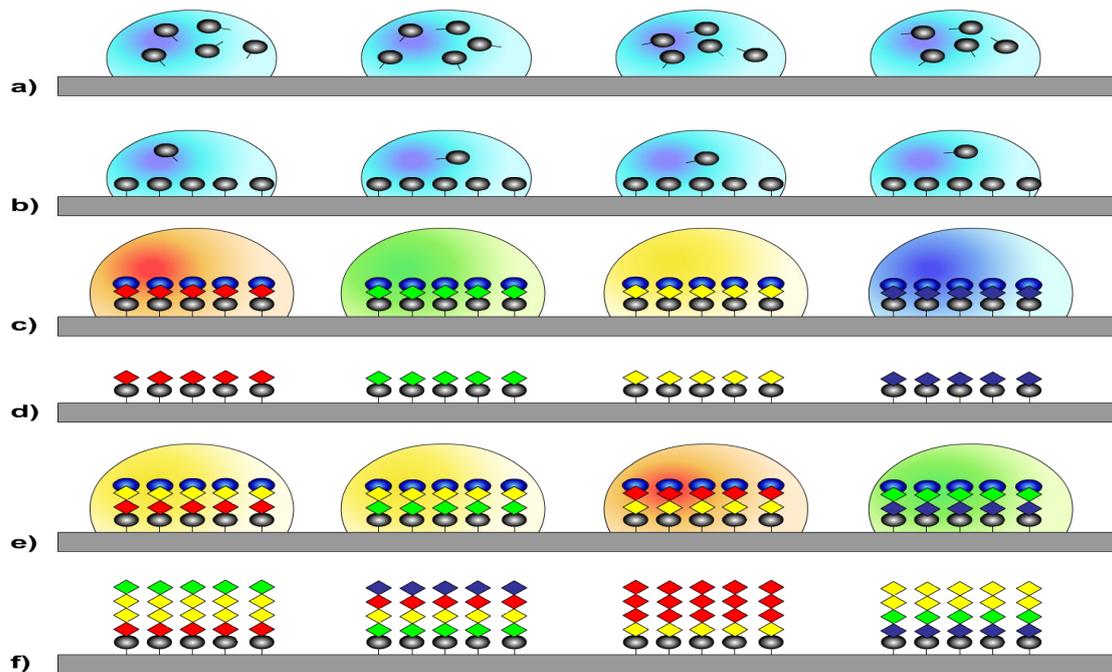
Theoretisch könnte man mit 240 Masken ein Peptidarray mit  $4,10 \cdot 10^{15}$  Dodecapeptiden herstellen. Jedoch unterbindet die chemische Diversität der Aminosäuren mit zunehmender Peptidlänge einerseits eine ausreichende Kupplungseffizienz und andererseits die Effizienz einer lichtinitiierten Abspaltung einer Schutzgruppe. Hierdurch werden „Fehlsequenzen“ mit zunehmender Peptidlänge wahrscheinlicher und es entsteht nicht das gewünschte Produkt. Somit bleibt die Photolithographische Synthese der Herstellung von DNA-Arrays vorbehalten.

### 3.1.1.2 SPOT-Synthese

Die von Ronald Franken entwickelte SPOT-Synthese ist eine Festphasensynthese <sup>[71;72]</sup>, die eine Membran als Festphase verwendet, auf der parallel unterschiedliche Interaktionspartner aufgebaut werden können. Mittels eines Pipettier-Roboters werden verschiedene Chemikalien auf verschiedene Punkte (SPOTs) der Membran aufpipettiert (Abb.3.2a). Durch einfaches Waschen der Membran werden diese Chemikalien wieder entfernt. Beim **Kupplungsschritt** bindet man Moleküle auf den einzelnen SPOTs, wie beispielsweise unterschiedliche Aminosäuren, an. Diese Moleküle besitzen genau eine reaktive Gruppe. Die restlichen reaktiven Gruppen sind durch Schutzgruppen inaktiviert. So kann jedes Molekül genau ein Mal mit der Membran reagieren und weitere Reaktionen werden unterbunden (Abb.3.2b). Im **Entschützungsschritt** wird eine der Schutzgruppen entfernt, wodurch von neuem eine reaktive Gruppe verfügbar wird, auf die nun erneut ein weiteres Molekül gekuppelt werden kann.

Mit dieser Methode kann man in einem einzigen Kupplungsschritt parallel auf unterschiedlichen SPOTs unterschiedliche Moleküle anbinden. Dies ist bei der photolithographischen Technik (3.1.1.1) nicht möglich. Aber auch hier erhöht sich

die Herstellungszeit mit der Anzahl der SPOTs und der Länge der erzeugten Polymere. Da die Tropfen auf den SPOTs der Membran zerfließen, ist die minimale Größe der SPOTs auf etwa einen Millimeter limitiert. Zudem ist der Rand des aufgesetzten Tropfens nicht exakt definiert und es entstehen dort immer Fehlsequenzen und Inhomogenitäten. Durch Hydrophobisierung der Oberflächen außerhalb der SPOTs können diese Inhomogenitäten am Rand verringert werden.



**Abb.3.2: Durchführung einer SPOT-Synthese**

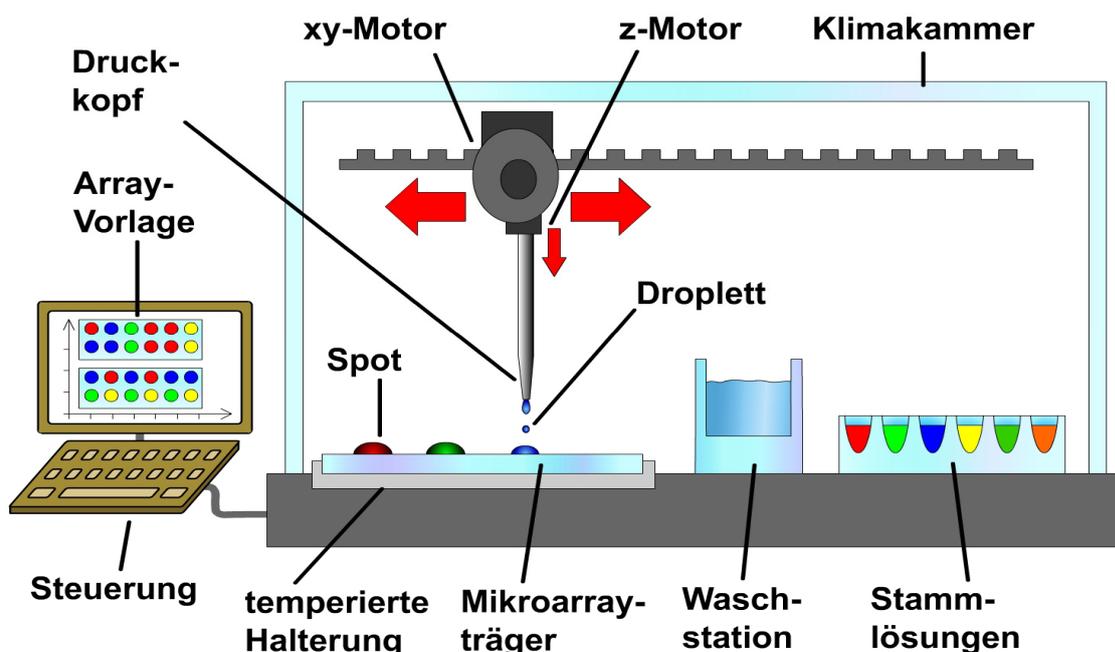
Auf eine Membran werden auf einzelne Tropfen Chemikalien pipettiert (a). Hierdurch werden in kreisrunden Bereichen (SPOTs) reaktive Gruppen geschaffen (b). Durch erneutes Pipettieren bindet man einen Baustein in einem Kupplungsschritt an (c), wäscht die Membran und im Entschützungsschritt spaltet man dann eine Schutzgruppe ab (d). Hierdurch kann ein weiterer Baustein gekuppelt werden (e). Durch wiederholtes Kuppeln und Entschützen kann pro SPOT ein unterschiedliches Polymer aufgebaut werden (f).

Die Spotsynthese wurde unter anderem zur direkten Identifizierung von charakteristischen Protein-Oberflächenstrukturen (Epitopen) eingesetzt <sup>[72]</sup>.

### 3.1.1.3 Nanoplotting von Mikroarrays

Nanoplotting oder Nanopipettieren ist der Prozess des Absetzens winzigster Tropfen auf einer Oberfläche. Die meisten Mikroarrays <sup>[45;156]</sup> werden heute mit dieser Technik hergestellt. Prinzipiell funktioniert diese Technik genauso wie ein handelsüblicher Farbdrucker. Die zu untersuchenden Moleküle werden, wie die Farbe des Druckers, in einer Stammlösung vorgelegt, mit der Pipettiervorrichtung

des Nanopipettier-Roboters (Abb.3.3) aufgesogen und auf die Oberfläche abgesetzt. Dieses Absetzen durch den Druckkopf kann kontaktfrei zur Oberfläche (Printing oder Pipettieren) über piezoelektrische Druckdüsen oder durch mikromechanisches „Berühren“ der Oberfläche (Plotting) durchgeführt werden. Entsprechende Elektronik und Mechanik gewährleistet ein homogenes und orts aufgelöstes Übertragen der Tröpfchen auf die Oberfläche. Die so erzeugten Spots haben je nach Oberfläche und abgesetztem Tropfenvolumen einen Durchmesser von 50 bis 800  $\mu\text{m}$  und können für jede Art von löslich übertragbaren Molekülen angewendet werden. Zur Immobilisierung der abgesetzten Moleküle auf der Oberfläche werden viele unterschiedliche Methoden angewendet (Kapitel 3.1.2). Die Herstellungszeit ist hier unabhängig von der Länge der evtl. verwendeten polymeren Moleküle, aber wächst mit der Anzahl der übertragenen Verbindungen.



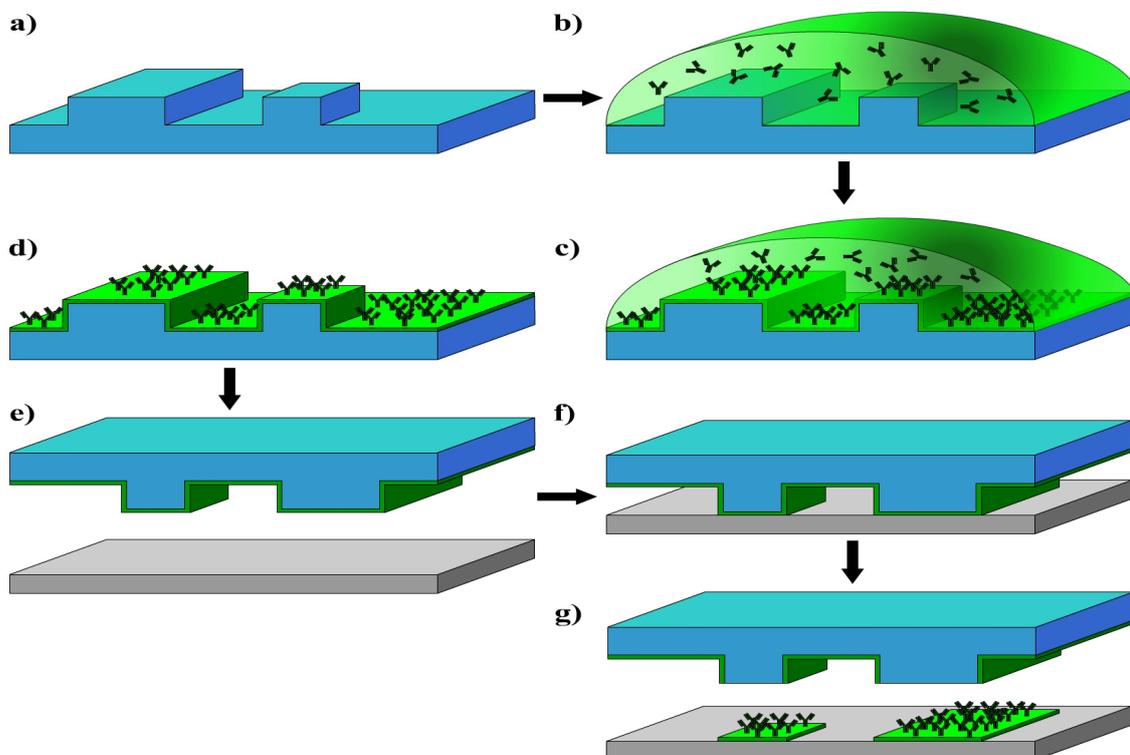
**Abb.3.3: Schematischer Aufbau eines Nanopipettier-Roboters**

Die Stammlösungen mit den zu untersuchenden Molekülen werden jeweils einzeln aufgesogen und mit dem Druckkopf auf der Oberfläche abgesetzt. Um den Materialverbrauch zu minimieren, können sequentiell mehrere Spots auf mehreren Mikroarrays abgesetzt werden. Eine Klimakammer sorgt für eine kontrollierte Umgebung. Nach dem Pipettierprozess wird der Druckkopf automatisch gereinigt und die nächste Stammlösung aufgenommen.

Nahezu alle Mikroarrays werden mit Mikropipettier-Robotern hergestellt. Zu den am häufigsten verwendeten Mikroarrays zählen hierbei insbesondere die Antikörper-Arrays, die Peptid-Arrays und Arrays aus kleinen hochdiversen Molekülen.

### 3.1.1.4 Softlithographisches Printing

Diese Technik (Abb.3.4) ist ein „einfacher“ Stempelprozess <sup>[157]</sup> wird ein PDMS-Stempel benötigt. Dieses Material verfügt über die unübertroffene Eigenschaft, über hydrophobe Wechselwirkungen Moleküle aus Lösungen an seiner Oberfläche zu einer Monolayer anzulagern. Mit einem Gasstrahl wird dann das Lösungsmittel entfernt und es bleibt nur die molekulare Monolayer zurück. Durch diesen Phasentransfer kann diese Monolayer wie bei einem Stempel auf eine planare Oberfläche übertragen werden. Es können sowohl Strukturen von nur 50 nm bis hin zu einigen Millimetern erzeugt werden, was diese Technik im Hinblick auf die Strukturierung einzigartig macht. Allerdings kann pro Stempelprozess nur eine Verbindung übertragen werden.



**Abb.3.4: Durchführen des Softlithographischen Printings**

Das Relief des Stempels (a) wird mit einer Lösung überspritzt, die das zu transferierende Molekül (hier ein Antikörper) enthält (b). Diese lagert sich über hydrophobe Wechselwirkungen auf dem Stempel zu einer Monolayer an (c). Das Lösungsmittel wird entfernt (d) und der Stempel auf der Oberfläche abgesetzt (e+f). Das Relief hinterlässt wie ein Stempel eine strukturierte molekulare Monolayer auf der Oberfläche (g).

Das Softlithographische Printing wurde hauptsächlich zur mikrostrukturierten Übertragung von molekularen Monolayern eingesetzt und findet zunehmend Anwendung in der Zellbiologie, da Zellen solche Strukturen über molekulare Interaktionen erkennen.

### 3.1.2 Immobilisierung

Die Immobilisierung kann entweder kovalent oder nicht-kovalent erfolgen. Kovalente Immobilisierungen sind in der Regel langzeitstabiler, aber auch entsprechend aufwändiger. Unabhängig von der Art der Immobilisierung sollte die Immobilisierungsstrategie stets selektiv auf das zu verankernde Molekül sein und daher eine spezifische Wechselwirkung nutzen.

#### 3.1.2.1 Kovalente Immobilisierung

In diesem Bereich können nahezu alle selektiven chemischen Reaktionen zwischen zwei funktionellen Gruppen verwendet werden.

- Die **Maleimido**-Gruppe reagiert selektiv mit Thiolen, kann aber auch, insbesondere unter alkalischen Bedingungen mit Aminogruppen reagieren .
- Eine ebenfalls häufig eingesetzte Chemie sind **NHS-Ester**. Hierbei reagiert eine N-Hydroxy-Succinimidylester-Gruppe mit einer Aminogruppe <sup>[158]</sup>.
- **Thiole** werden fast ausschließlich für die Anbindung auf Goldoberflächen eingesetzt <sup>[159-161]</sup>.
- Mit **klassischer Peptidchemie** können Aminogruppen und Carboxygruppen miteinander verbunden werden <sup>[162-164]</sup>.
- Die **Staudingerligation** oder **native chemische Ligation** dient ebenfalls der Verknüpfung einer Carboxygruppe mit einer Aminogruppe <sup>[115;165]</sup>. Allerdings befindet sich die Aminogruppe dabei stets in der Nähe einer Thiolgruppe, da diese für einen Isopeptid-Übergangszustand benötigt wird. Beispielsweise kann ein Peptid mit einem N-terminalen Cystein so auf eine Carboxy-funktionalisierte Oberfläche angebunden werden .
- Etwas unspezifischer sind dahingegen **Epoxy**-Gruppen, die sowohl mit Carboxy-, Thiol- als auch Aminogruppen reagieren können <sup>[166;167]</sup>.
- Besonders ausgefallen sind Polymerisations-Immobilisierungen <sup>[168-170]</sup>. Hierbei wird beispielsweise durch einen elektrischen Strom oder einen Temperaturgradienten eine orts aufgelöste Polymerisierung und damit Immobilisierung des Analyten erreicht.

Neben diesen häufig verwendeten chemischen Reaktionen finden unter anderem aber auch Nitroverbindungen, Säurehalogenide, Silane, Aldehyde, Sulfone und photoreaktive Gruppen ihre jeweilige Spezialanwendung für die kovalente Immobilisierung von Molekülen auf Oberflächen.

### 3.1.2.2 Nicht-kovalente Immobilisierung

Diese Form der Immobilisierung findet mehr im Bereich der Biologie ihre Anwendung und findet unter chemisch milden Bedingungen statt. Die Spezifität ist zumeist extrem hoch, da es sich oft um ein Bindungspaar handelt.

- Der Klassiker ist die **Avidin-Biotin**-Bindung. Die Bindungskonstante liegt bei  $10^{-15}$  M und ist eine der stärksten bekannten Bindungsreaktionen <sup>[171;172]</sup>. Viele Biomoleküle sind daher mit Biotin gelabelt.
- Die **Antigen-Antikörper**-Bindung ist ebenfalls eine sehr spezifische Interaktion, die eine extrem starke Bindung und eine sehr spezifische Erkennung ermöglicht. Allerdings muss für jedes Antigen ein entsprechender Antikörper hergestellt werden. Bestimmte Peptidsequenzen und Moleküle haben sich hierbei als Standardantigene etabliert und man labelt diese an viele Biomoleküle wie beispielsweise Strep-Tag <sup>[173-178]</sup>, myc-Tag <sup>[179;180]</sup>, GST-Tag <sup>[181]</sup> und verankert diese als Mikroarray auf Oberflächen, die mit den Antikörpern vorbeschichtet wurden.
- **Protein-Protein**-Interaktionen werden ebenfalls für spezifische Bindungen verwendet. Hauptsächlich bedient man sich dabei Protein A oder Protein G, welche spezifisch mit der F<sub>c</sub>-Region von Antikörpern reagieren <sup>[182-185]</sup>.
- Das **His-Tag** bildet mit Ni<sup>2+</sup> und NTA-Gruppen einen stabilen Komplex und ist der prominenteste Vertreter der **Metall-Chelate** <sup>[57;158;186-188]</sup>. Es kann jedoch auch mit Antikörpern gebunden werden.

Deutlich unspezifischer ist die nicht-kovalente Bindung über einfache Wechselwirkungen, da sehr viele Moleküle so verankert werden können.

- Durch **Adsorption** lagern sich nahezu alle Moleküle an freie Oberflächen an. Die Anlagerung wird entweder über ionische oder hydrophobe

Wechselwirkungen stabilisiert. Üblicher Weise verwendet man bei der Mikroarrayherstellung hierzu Amino- oder Carboxy-funktionalisierte Oberflächen, die Adsorption über ionische Wechselwirkungen ermöglichen [158;189].

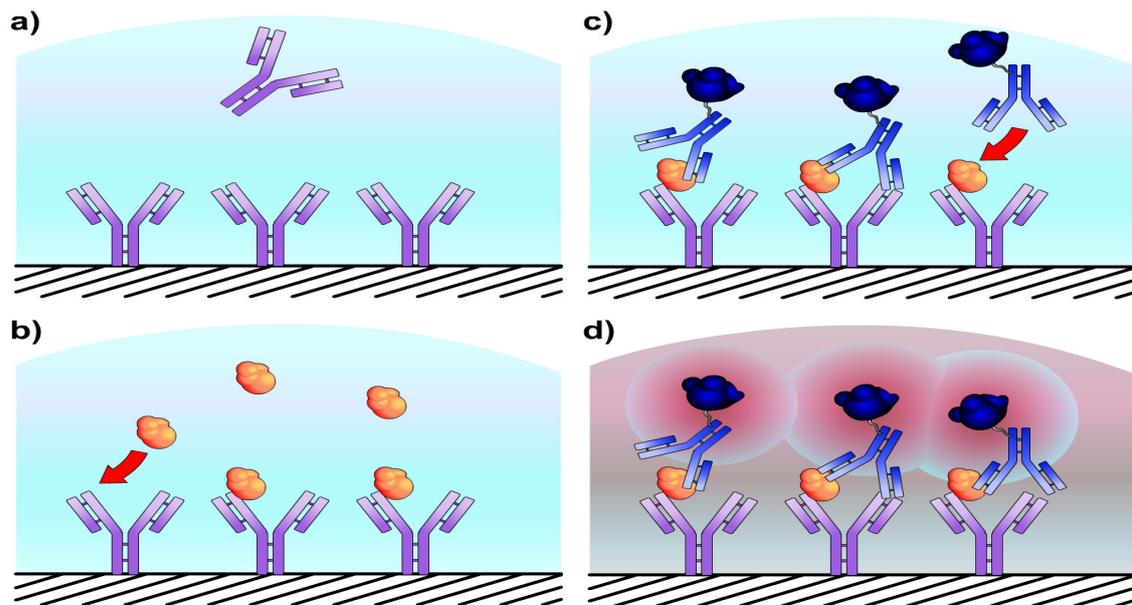
- **Hydrophobe Wechselwirkungen** sind ein Spezialfall der Adsorption. Hierbei lagern sich Moleküle mit ihren hydrophoben Bereichen an die ebenfalls hydrophobe Oberfläche an und werden über Van-der-Waals-Kräfte an die Oberfläche adsorbiert. Diese Wechselwirkung stabilisiert unter anderen Zellmembranen und kann auf Oberflächen molekulare Monolayer erzeugen. Im Bereich der Mikroarrays finden hydrophobe Oberflächen jedoch kaum Anwendung.

## 3.2 Signalgenerierung

Zum Nachweis einer molekularen Interaktion wird stets ein Signal generiert. Je nach Art der Interaktion wird die Signalgenerierungsmethode ausgewählt. Zumeist verwendet man ein hochauflösendes optisches Signal; allen voran steht die Verwendung von Fluorophoren und Farbstoffen.

### 3.2.1 Aufbau eines Immunoassays

Immunoassays sind zumeist quantitative Techniken, die auf der spezifischen molekularen Interaktion zwischen einem Antigen (Analyt) und einem Antikörper beruhen. Die ersten Immunoassays wurden von R.P. Ekins Ende der Sechziger Jahre mit radioaktiv markiertem Thyroxin und entsprechenden Antikörpern, die auf einer Festphase immobilisiert waren, durchgeführt. Dies war der Beginn einer rasanten Entwicklung, deren Verbesserung und Verfeinerung noch heute anhält und auch im Bereich der Mikroarrays ihre Anwendung findet. Als klassischer Immunoassay kann der „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bezeichnet werden, da nach diesem Aufbauschema (Abb.3.5) heute nahezu alle medizinischen Analysen durchgeführt werden [14].



**Abb.3.5: Enzym-linked Immunosorbent Assay**

Auf ein Trägermaterial wird ein Antikörper immobilisiert (a). Durch Zugabe der Analytlösung bindet das entsprechende Antigen an den Antikörper (b). Nach ausgiebigem Waschen wird ein weiterer mit einem Enzym markierter Antikörper zugegeben, der den Analyten an einer weiteren antigenen Stelle bindet (c). Das Enzym setzt ein Substrat zu einem Farbstoff um (d) und liefert ein quantifizierbares Signal [14;15]

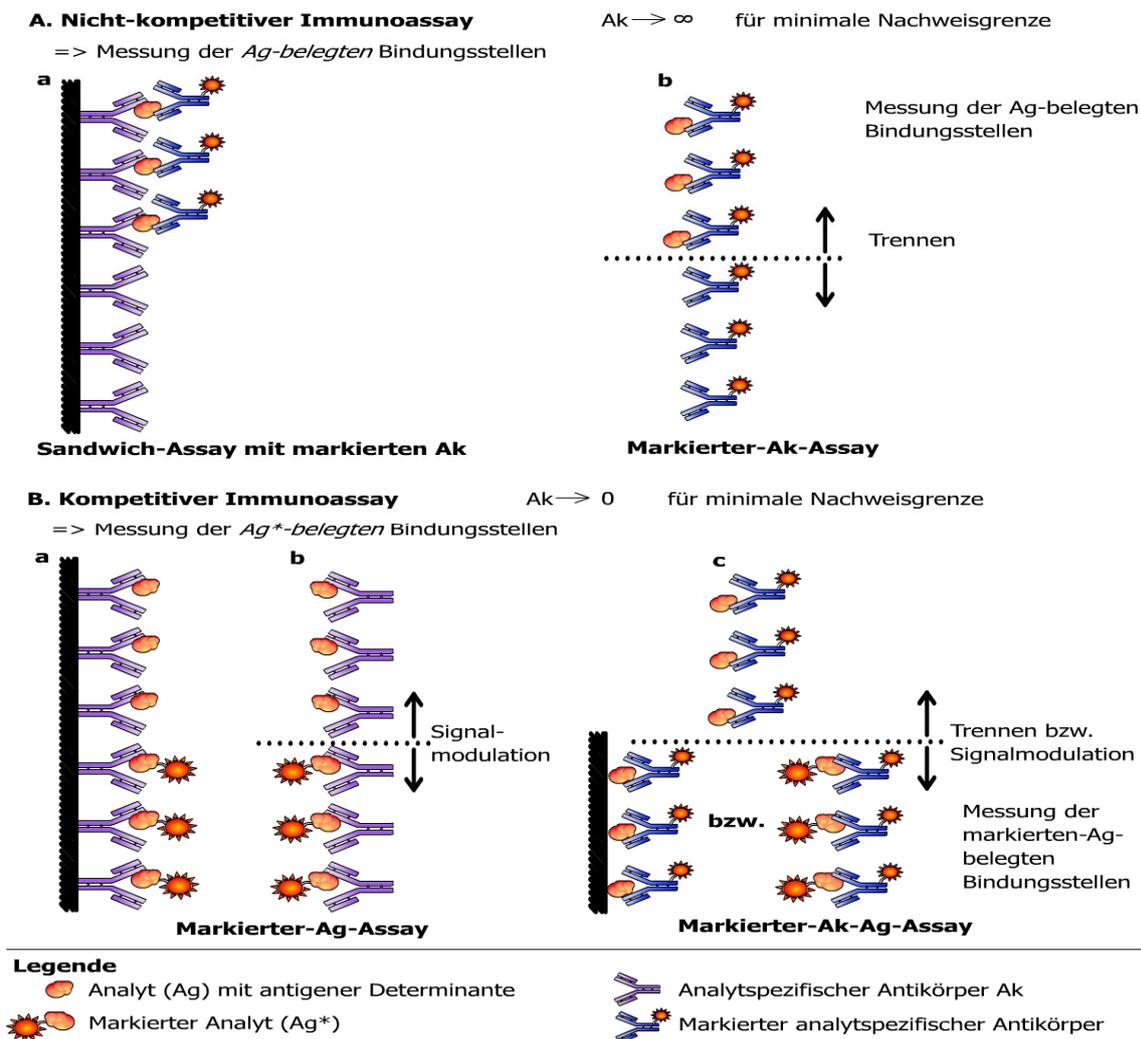
Immunoassays werden in zwei Gruppen, entsprechend der Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion, unterteilt. Hierbei kann die Signalgenerierung markierungsfrei erfolgen oder man verwendet markierende Moleküle, die das Signal erst generieren.

Markierungsfreie Verfahren sind zumeist an ein komplexeres Sensorsystem gekoppelt. Hierunter fallen Techniken wie Surface-Plasmon-Resonance (SPR) oder Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (RIfS). Man immobilisiert einen Interaktionspartner auf der Oberfläche, die dann mit einer Phase in Kontakt gebracht wird, die den zweiten Interaktionspartner enthält. Diese Verfahren werden häufig für kinetische oder thermodynamische Charakterisierungen der Wechselwirkung eingesetzt.

Verfahren, bei denen markierte Interaktionspartner verwendet werden, haben den Vorteil einer deutlich geringeren Nachweisgrenze, zum Nachteil der Markierung selbst. Zum einen ändert sich die Bindungscharakteristik oder eine Bindung bleibt ganz aus und zum anderen muss die Markierung, meist unter recht hohem chemischem Aufwand, an einen der Interaktionspartner angebracht werden. Die „markierten“ Immunoassays werden häufig für quantitative und parallele Analysen eingesetzt. Die häufigsten Markierungen sind Fluorophore (Fluoroimmunoassay)

und Enzyme (Enzymimmunoassay), die ihrerseits ein Substrat in einen zumeist fluoreszenten Farbstoff umsetzen. In selteneren Fällen werden aber auch Metallkomplexbildner, NMR-Sonden oder metallische Nanopartikel eingesetzt.

Weiterhin wird zwischen homogenen und heterogenen, sowie kompetitiven und nicht-kompetitiven Assays unterschieden (Abb.3.6). Beim homogenen Assay findet die Messung in einer Phase, beim heterogenen Assay in zwei Phasen oder an einer Phasengrenze statt. Bei einem nicht-kompetitiven Assay wird der Analyt direkt vermessen und bei einem kompetitiven Assay wird eine definierte Menge an markierten Analyt oder markierten Antikörper hinzugegeben.



**Abb.3.6: Grundlegende Aufbaumöglichkeiten eines Immunoassays**

Beim nicht-kompetitiven Immunoassay (A) wird der Analyt direkt vermessen, wohingegen beim kompetitiven Immunoassay (B) eine bekannte Menge an markierten Analyten zugegeben wird. Heterogene Immunoassays (a) benötigen stets zwei Phasen und weisen im Allgemeinen eine höhere Sensitivität als einphasige homogene Immunoassays (b) auf. Bei einer Doppelmarkierung (Bc), bei der sowohl Antigen als auch Antikörper markiert sind und in definierter Menge kompetitiv eingesetzt werden, verbindet man die Sensitivität des heterogenen Immunoassays mit der Miniaturisierbarkeit und der kurzen Reaktionsdauer des homogenen Immunoassays<sup>[4]</sup>.

Je nach analytischer Fragestellung, apparativem Aufwand oder gewünschter Sensitivität (Tab.3.1) sollte ein entsprechend angepasster Assayaufbau gewählt werden <sup>[4;15]</sup>. Trotz der höheren Sensitivität der radioaktiven Markierung, welche auch in den ersten Immunoassays eingesetzt wurde <sup>[15;190]</sup>, werden heute hauptsächlich Enzyme als Marker eingesetzt.

Die beiden bekanntesten und häufigsten eingesetzten Enzyme sind die Meerrettich-Peroxidase (Horseredish-Peroxidase HRP) und die Alkalische Phosphatase (AP). Für beide Enzyme gibt es eine große Auswahl an Substraten, die zumeist in fluoreszente oder absorptive Farbstoffe umgesetzt werden.

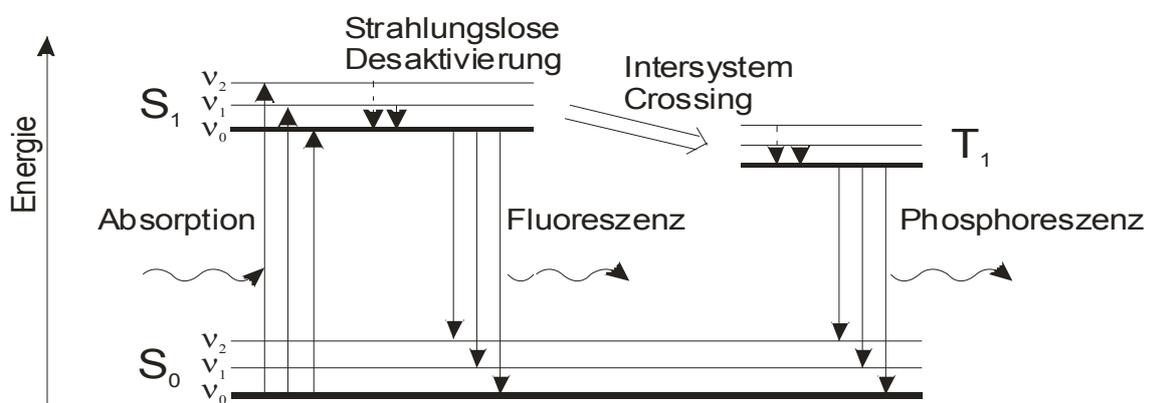
**Tab.3.1: Gängige Immunoassays und deren Nachweisgrenzen <sup>[4]</sup>**

<b>Art des Markers</b>	<b>Bezeichnung des Immunoassays</b>	<b>Design<sup>1</sup></b>	<b>Nachweisgrenze</b>
Enzym	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Aa	10 <sup>-13</sup> M
	Affinitätsvermittelter Immunoenzymmetrischer Assay (ACMIA)	Ab	10 <sup>-10</sup> M
	Enzymimmunoassay (EIA)	Ba, Bc	10 <sup>-11</sup> M
	Enzym-Präzipitations-Assay (EPA)	Aa	10 <sup>-11</sup> M
	Enzymvermittelter Immunoassay (EVIA)	Bb	10 <sup>-13</sup> M
Fluorophor	Immunofluorimetrischer-Assay (IFMA)	Aa	10 <sup>-13</sup> M
	Dissoziationsverstärkter-Lanthanoid-Fluoreszenz-Assay (DELFI A)	Aa	10 <sup>-13</sup> M
	Fluoroimmunoassay (FIA)	Ba, Bc	10 <sup>-10</sup> M
	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA)	Bb	10 <sup>-13</sup> M
	Fluoreszenz-Modulations-Immunoassay (FMIA)	Bb	10 <sup>-10</sup> M
	Fluoreszenz-Verstärkungs-Immunoassay (FEIA)	Bb	10 <sup>-10</sup> M
	Fluoreszenz-Quenching-Immunoassay (FQIA)	Bb	10 <sup>-10</sup> M
	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie Immunoassay (FCS-IA)	Bb	10 <sup>-11</sup> M
	Resonanz-Energie-Transfer Immunoassay (RETIA)	Bc	10 <sup>-10</sup> M
	Zeitaufgelöster RETIA (HTRF <sup>®</sup> , LANCE <sup>™</sup> ...)	Bc	10 <sup>-10</sup> M
Radioaktiv	Radioimmunoassay (RIA)	Ba	10 <sup>-12</sup> M
	Immunoradiometrischer Assay (IRMA)	Aa	10 <sup>-14</sup> M
	Scintillation-Proximity-Assay (SPA)	Bc	10 <sup>-14</sup> M

<sup>1</sup> Die Angaben beziehen sich auf die Einteilung nach Abb.3.6.

### 3.2.2 Fluoreszenz

Die Lichtemission von Molekülen oder von Festkörpern wird als Luminiszenz bezeichnet <sup>[2]</sup>. Dabei befindet sich das Molekül zuvor in einem elektronisch angeregten Zustand und durch die Abstrahlung von Licht in einen niederenergetischeren Zustand. Beim Vorgang der Fluoreszenz wird das Isospin beibehalten und die Quantenmechanik erlaubt einen schnellen Übergang und damit eine schnelle Abstrahlung (Halbwertszeiten von üblicherweise  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  s). Bei Phosphoreszenz wird der Übergang durch eine Isospinänderung gehemmt, wodurch sich die Abstrahlung extrem verzögert (Halbwertszeiten von Sekundenbruchteilen bis einige Stunden). Der Zusammenhang zwischen Energieabsorption und Lichtemission von Fluoreszenz und Phosphoreszenz wird im Jabłoński-Termschema (Abb.3.7) veranschaulicht. Dabei ist die Lage der Energieniveaus charakteristisch für jede Verbindung und bedingt damit ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum, über welches die Verbindung identifiziert und auch quantifiziert werden kann.



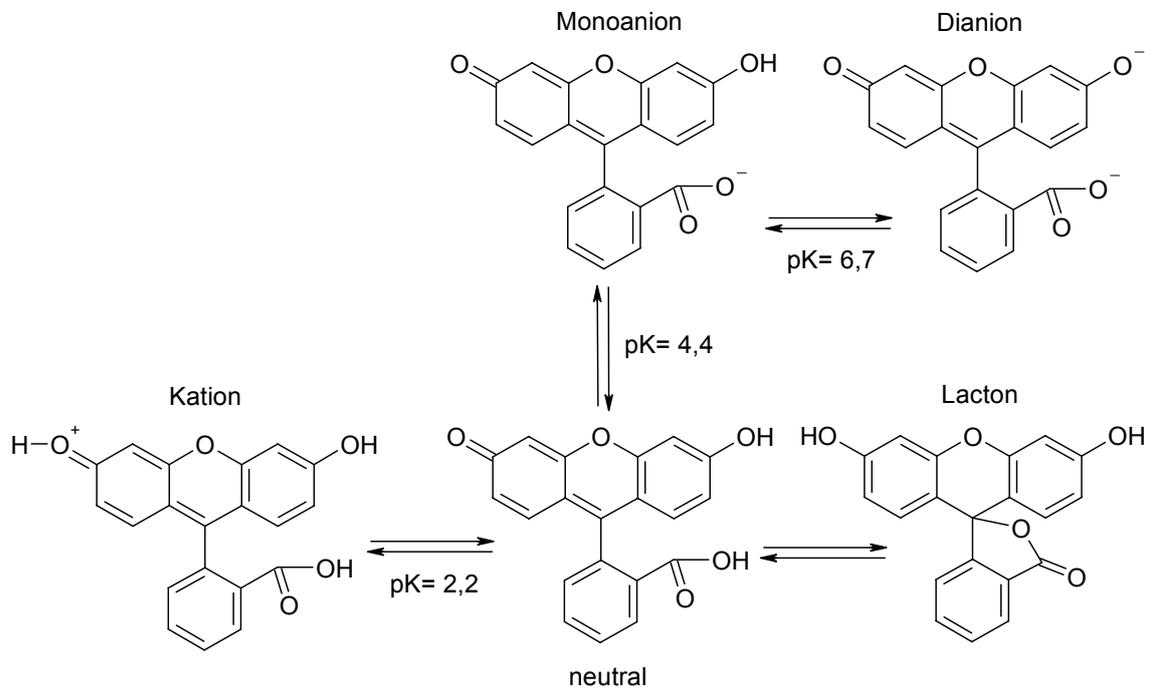
**Abb.3.7: Jabłoński-Termschema** <sup>[2]</sup>

Ein Lichtquant regt das Molekül vom  $S_0$ - in den  $S_1$ -Zustand an (Absorption). Innerhalb von  $10^{-13} - 10^{-11}$  s findet über verschiedene Schwingungsniveaus  $v_i$  eine erste strahlungslose Desaktivierung statt. Dabei kann ein Zustandswechsel (Intersystem Crossing) zum  $T_1$ -Zustand stattfinden. Relaxiert das Molekül unter Lichtemission in den  $S_1$ -Zustand, spricht man je nach Zustandsübergang von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz.

#### 3.2.2.1 Fluoreszente Farbstoffe

Prinzipiell kann jedes Molekül zur Fluoreszenz angeregt werden. Es gibt einige Farbstoffe (Fluorophore), die eine besonders starke Fluoreszenz zeigen und über

besondere Eigenschaften verfügen. Zwischenzeitlich ist es möglich, einzelne Fluorophormoleküle über längere Zeit zu untersuchen <sup>[4;191-193]</sup>. Diese Eigenschaften sollen am Beispiel von Fluorescein (Abb.3.8) verdeutlicht werden.

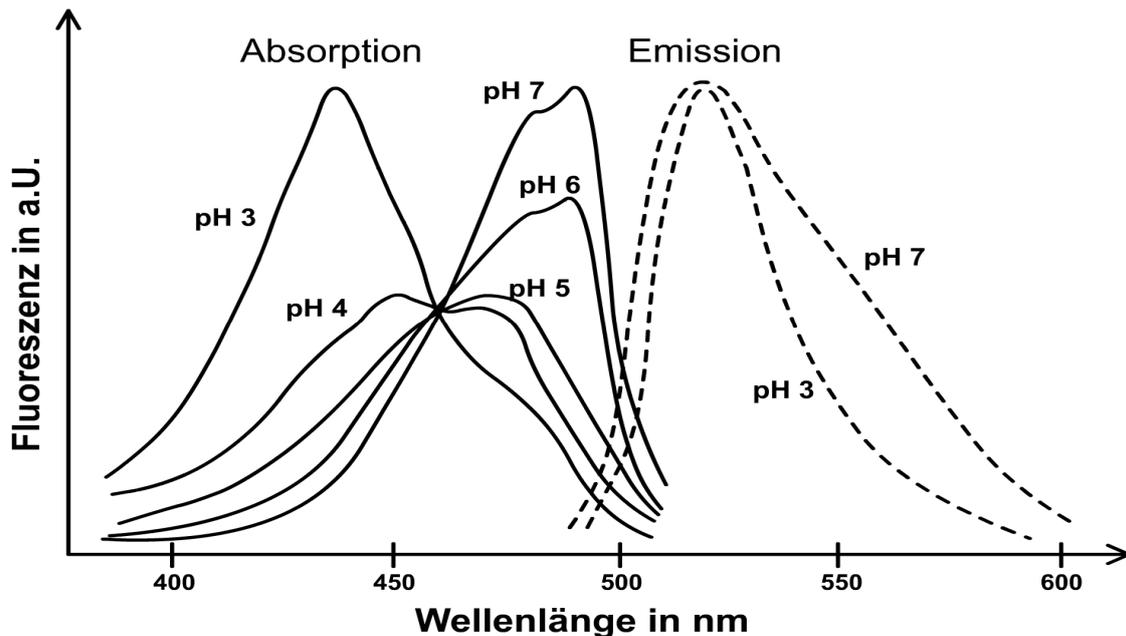


**Abb.3.8: Struktur und Protonierungsreaktion von Fluorescein**

Neben der Lactonbildung besitzt Fluorescein ein recht komplexes Protonierungsgleichgewicht. Das Dianion und das Lacton sind nur schwache Fluorophore <sup>[4]</sup>.

- Das **Absorptions-** und **Emissionsspektrum** (Abb.3.9) sind für den Farbstoff charakteristisch und zeigen die Wellenlängen der optimalen Absorption und der maximalen Emission an. Bei Fluorescein sind dies 492 nm (Absorption) und 520 nm (Emission). Durch geeignete Auswahl des Farbstoffes und damit der Spektren können mehrere Fluorophore parallel angeregt, aber getrennt vermessen werden.
- Die **Quantenausbeute** ist das Verhältnis zwischen Anzahl der emittierten Fluoreszenzquanten und Anzahl aller absorbierten Anregungsquanten. Sie ist oft stark von der chemischen Umgebung des Fluorophors abhängig. Im Fall von Fluorescein ist dies eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert und beträgt im alkalischen bis zu 90%.
- Die **Fluoreszenzlebensdauer** bezeichnet die Halbwertszeit für den Übergang vom angeregten in den Grundzustand unter Abgabe von Fluoreszenzlicht. Dieser Wert kann sich ebenfalls durch die chemische Umgebung ändern und kann durch zeitaufgelöste Fluoreszenztechniken erfasst werden. Sie beträgt für Fluorescein  $4,3 \cdot 10^{-8}$  s <sup>[194]</sup>.

- Für die Messung ist die **Stabilität** eines Fluorophors von hoher Wichtigkeit. Sie beschreibt, wie stabil ein Fluorophor gegen Zerstörung oder Inaktivierung durch die Absorption eines Lichtquants ist <sup>[195]</sup>. Ohne Fluoreszenz ist der Fluorophor für die Messung wertlos. Leider ist die Stabilität bei Fluorescein recht gering. Es wird trotzdem häufig eingesetzt, da es im Vergleich zu vielen anderen Fluorophoren in hoher Reinheit und zudem sehr günstig erhältlich ist.



**Abb.3.9: Absorptions- und Emissionsspektren von Fluorescein**

Die Absorption von Fluorescein ändert sich sehr deutlich in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Emission bleibt nahezu unverändert. Üblicherweise wird es mit 450-480 nm angeregt und bei 510-550 nm detektiert <sup>[11]</sup>.

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlichster Fluorophore, die sich aus kleinen meist aromatischen Molekülen (Fluorescein, Rhodamin, Dansyl...), größeren Proteinen (GFP, YFP, CFP...), Metallionen (Lanthanide wie  $\text{Eu}^{3+}$ ), Metallionenkomplexen (Phycocyanine mit Lanthaniden) oder neuerdings aus mesoskopischen Partikeln (Quantumdots, Lightrods) ableiten und variieren lassen. Insbesondere bei kleinen Molekülen kann schon eine Seitengruppe das komplette Spektrum deutlich verändern.

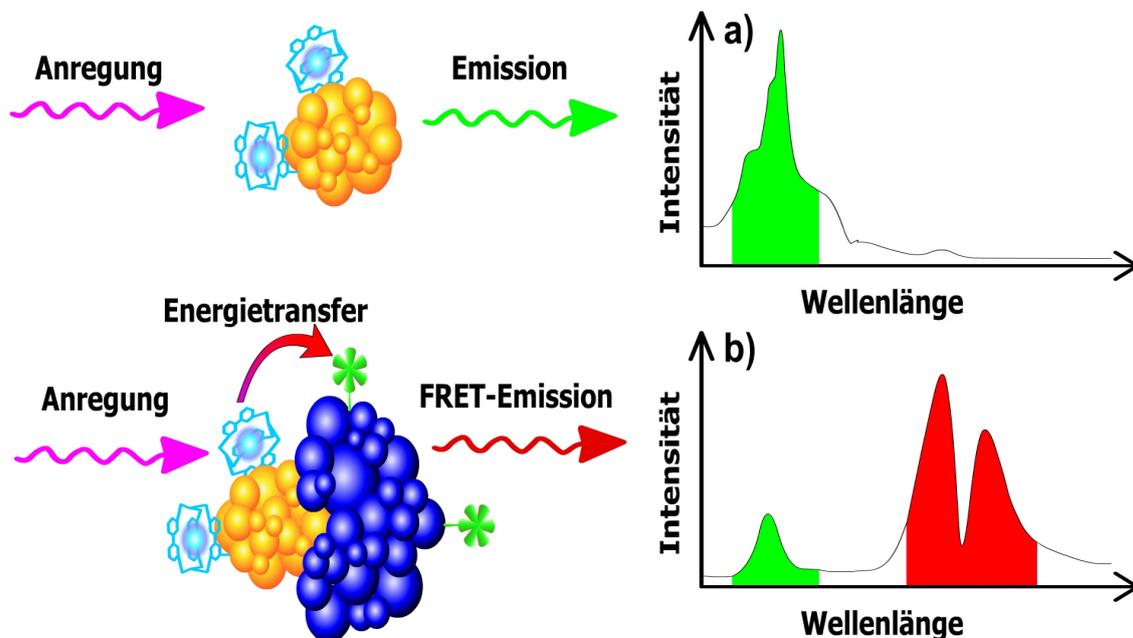
### 3.2.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer kann zwischen zwei Molekülen stattfinden. Dabei wird die absorbierte Energie von einem Molekül (Donor) auf ein Zweites (Akzeptor) transferiert <sup>[123;124;196]</sup>. So kann der Akzeptor über den Donor

zur Fluoreszenz angeregt werden (Abb.3.10), obwohl die Anregungs-wellenlänge den Akzeptor nicht anregt. Die Effizienz dieses Energietransfers hängt von der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und von dem räumlichen Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab. Idealerweise sollte das Emissionsspektrum des Donors identisch zum Absorptionsspektrum des Akzeptors sein. Da der Energietransfer über eine Multipolfeldkopplung abläuft, klingt die Effizienz ab. Die Abklingkonstante der Transfereffizienz wird dabei durch den Försterradius  $R_o$  definiert, der durch die Geometrie und optischen Eigenschaften der beteiligten Moleküle festgelegt wird [123]

$$E_{FRET} = \frac{E_{\max}}{1 + (R/R_o)^6}$$

Entspricht der Abstand zwischen Akzeptor und Donor dem Försterradius, so wird 50% des maximalen FRET-Signals erzeugt. Somit kann bei einer Einzelmolekül-Spektroskopie ein FRET-Signal als molekulares Metermaß verwendet werden [120;197]. In Gegenwart des Akzeptors wird das Emissionsspektrum des Donors stetig schwächer, da mit zunehmender Nähe immer mehr Energie auf den Akzeptor transferiert wird und immer weniger Energie in Form von Licht durch den Donor abgegeben werden kann [198].



**Abb.3.10: Entstehung des FRET-Signals**

Wenn keine Bindung stattfindet, ist nur das Spektrum des Donors zu sehen (a). Findet eine Bindung statt, so erscheint das Spektrum des Akzeptors stärker und das des Donors schwächer (b).

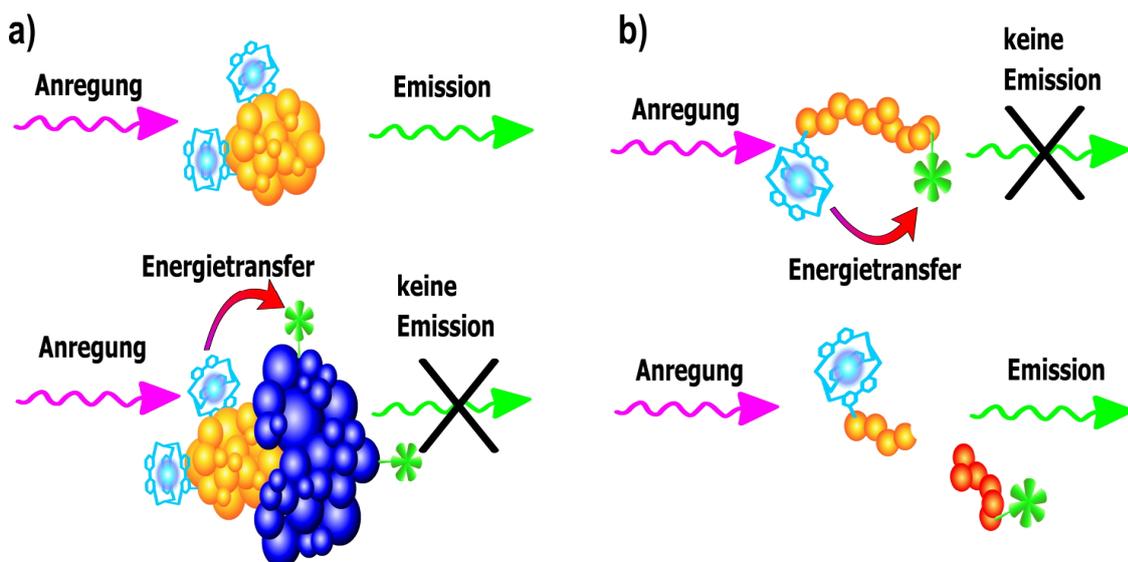
In der Zwischenzeit wird die FRET-Technik häufig zur Bestimmung mittlerer Molekülabstände <sup>[120;197]</sup> in Immunoassays <sup>[199]</sup> und zur Aufklärung von Proteinfaltung und Molekulardynamik <sup>[200]</sup> eingesetzt.

### 3.2.2.3 Quenching und Dequenching

Fluoreszenzlöschung (Quenching) ist ein Effekt, der dem Fluoreszenz-Resonanz-Transfer entspricht. Man benötigt ebenfalls zwei Moleküle, die allerdings im Gegensatz zum FRET nicht unbedingt unterschiedlicher Natur sein müssen. Ebenfalls im Gegensatz zum FRET tritt keinerlei Fluoreszenz auf. Der Donor absorbiert zwar das Lichtquant und transferiert seine Energie auf den Akzeptor. Dieser strahlt dann aber kein Fluoreszenzlicht ab, sondern gibt die Energie strahlungslos an das umgebende Medium ab. Befinden sich also Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe, dann erlischt die Fluoreszenz des Donors.

Findet also eine Bindung zwischen zwei markierten Molekülen statt, so wird durch das Quenching das Fluoreszenzsignal entsprechend verringert (Abb.3.11a).

Beim Dequenching bindet man an ein Molekül zwei Fluorophore, die zusammen ein Quenchingpaar bilden. Wird nun, beispielsweise durch einen Proteaseverdau, das Molekül gespalten, dann vergrößert sich die räumliche Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Das Quenching findet nicht mehr statt und die Fluoreszenz des Donors wird messbar (Abb.3.11b).

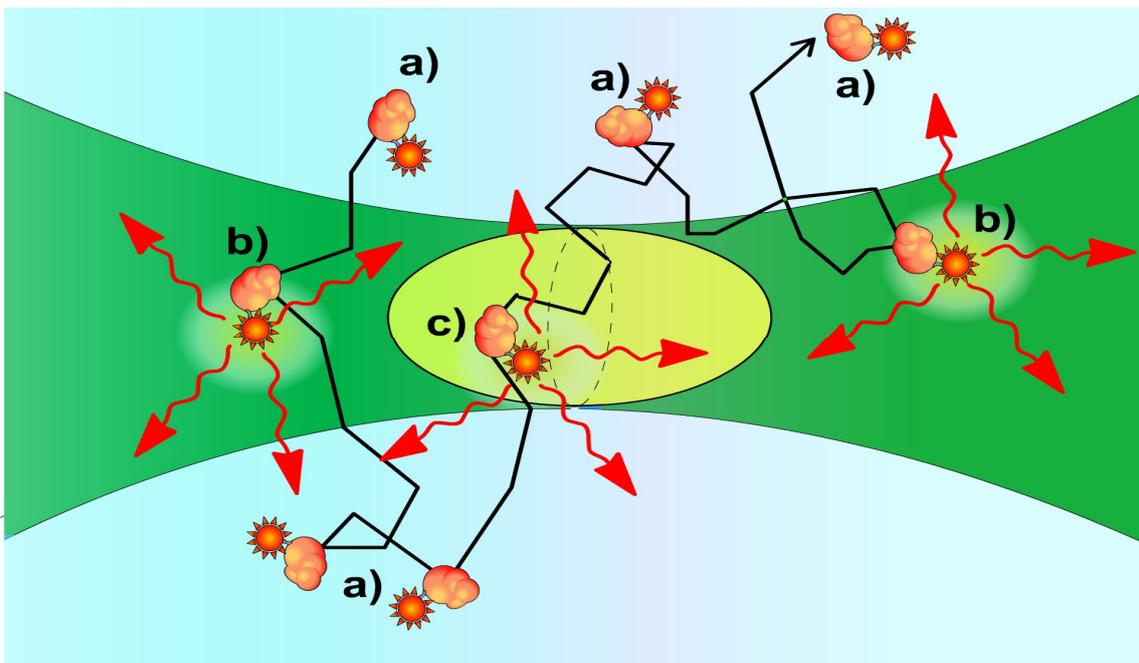


**Abb.3.11: Darstellung von Quenching (a) und Dequenching (b)**

Der Donor alleine zeigt Fluoreszenz, die durch das Anbinden eines Akzeptors erlischt. Man spricht dann vom Quenching (a). Beim Dequenching (b) befinden sich Akzeptor und Donor an einem Molekül. Ein intaktes Molekül zeigt aufgrund von Quenching keine Fluoreszenz. Wird das Molekül gespalten, so entsteht ein Fluoreszenzsignal.

### 3.2.2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Befindet sich ein makroskopisches System im thermodynamischen Gleichgewicht, so ändert sich die Konzentration einer Molekülsorte in einem Volumenelement nicht. Mikroskopisch betrachtet, kann es jedoch zu Fluktuationen kommen. Diese Fluktuationen treten bei makroskopischen Messungen teilweise als Hintergrundrauschen auf, welches sich bei längerer Messung herausmittelt. Misst man nun ein kleines mikroskopisches Volumenelement bei hoher Zeitauflösung aus, so mitteln sich diese Fluktuationen nicht mehr heraus. In diesen Fluktuationen sind charakteristische kinetische Prozesse, wie Diffusionsbewegungen, Rotationen und chemische Gleichgewichte, enthalten. Bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie <sup>[201;202]</sup> wird mittels konfokaler Mikroskopie (Kapitel 3.2.4.1) ein wenige  $\mu\text{m}^3$  großes Volumen (Abb.3.12) auf Fluoreszenz detektiert.



**Abb.3.12: Darstellung des konfokalen Detektionsvolumen**

Ein Laserstrahl definiert ein Anregungsvolumen (dunkelgrün) und eine konfokale Optik ein Detektionsvolumen (hellgrünes Oval). Solange ein Fluorophor gelabeltes Molekül außerhalb des Lasers ist (a), leuchtet es nicht. Sobald es in den Laserstrahl eintritt (b), emittiert es Fluoreszenzlicht, das jedoch nur detektiert wird, wenn es im konfokalen Detektionsvolumen erzeugt wird (c).

Das generierte Primärsignal ist eine Fluktuationsfunktion. Es erscheint auf den ersten Blick wie ein „Rauschen“ (Abb.3.13a), enthält jedoch alle kinetischen Größen der beteiligten Systeme<sup>[13;203;204]</sup>. Die Zeitskala, die durch diese Art der Korrelationsanalyse erfasst werden kann, wird nach unten durch die Schnelligkeit des Detektorsystems begrenzt und nach oben durch die mittlere Aufenthaltsdauer

der Fluorophore im Detektionsvolumen. Üblicherweise ist dies der Zeitbereich von einigen Mikrosekunden bis Sekunden.

Um aus dem „Rauschen“ eines solchen Primärsignals kinetische Informationen zu generieren, wurden schon vor über einhundert Jahren entsprechende theoretische Überlegungen von Einstein und Smoluchowski zu Papier gebracht [205-207]. Allerdings beschäftigten sich diese mit theoretischen Berechnungen für die Detektion eines definierten Raumvolumens und bezogen sich auf makroskopische Partikel, die durch die Braunsche Wärmebewegung in dieses Volumen eintraten oder es verließen.

Der konfokale Aufbau liefert für die Fluorophore genau dieselbe Ausgangsbedingung, die jedoch durch die Fluoreszenzstrahlung etwas komplizierter gestaltet sind. Letztendlich misst man den Eintritt in das Detektionsvolumen und den Austritt daraus. In den letzten 15 Jahren sind die theoretischen Modelle und Experimente nicht nur auf die Fluorophoreigenschaften, sondern auch auf Translations- und Rotationsbewegungen [191;208], uniforme und laminare Strömungsprofile [203], zahlreiche chemische Reaktionen [209] und sogar für Analysen innerhalb von Zellen [210] und Zellkompartimenten angepasst und optimiert worden.

Aus dem „Rauschen“ des Primärsignals  $F(t)$  (Abb.3.13a) wird die Fluktuation über ein normiertes zeitliches Selbstfaltungsintegral in eine Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  (Abb.3.13b) umgewandelt.

$$G(\tau) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} F(t) \cdot F(t + \tau) dt}{\int_{-\infty}^{+\infty} F(t)^2 dt}$$

Prinzipiell vergleicht man ein zeitlich verschobenes Primärsignal mit dem unverschobenen Primärsignal und sucht somit nach „Selbstähnlichkeiten“. Dieses etwas „abstrakte“ Vorgehen entspricht der alltäglichen Bewegungsautokorrelation des Auges. Bei dieser Autokorrelation ist ein „sich nicht bewegend“ sitzender Hase in einem Feld nicht zu sehen. Sobald er jedoch eine Bewegung macht, wird diese durch das Auge „erkannt“. Dabei führen die Sehnerven eine Autokorrelation durch und melden dem Gehirn viele autokorrelierte Messpunkte, die die Form eines Hasen ergeben.

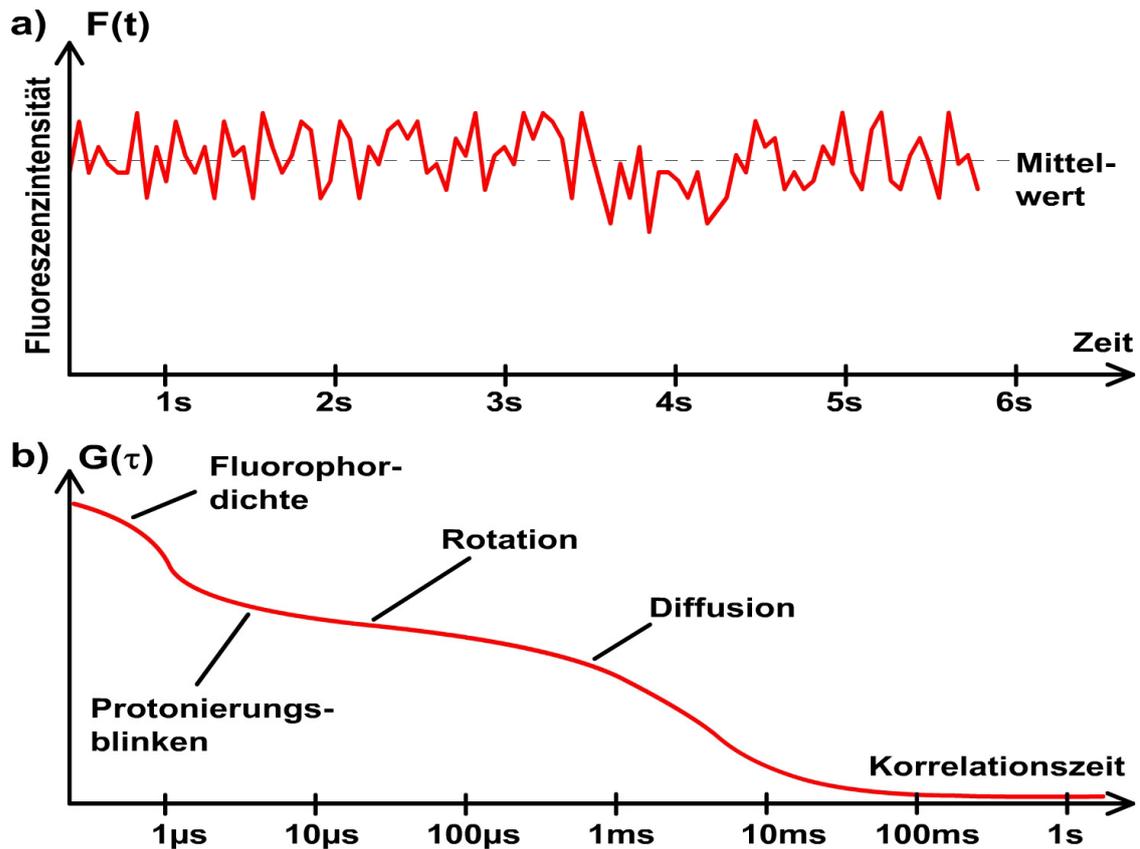


Abb.3.13: Primärsignal  $F(t)$  (a) und Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  (b) <sup>[13]</sup>

Das Primärsignal (a) scheint auf den ersten Blick, ein weißes „Rauschen“ zu sein. Durch Anwendung einer Autokorrelation des Primärsignals  $F(t)$  erhält man die Autokorrelationskurve  $G(\tau)$  (b), die le kinetischen Daten über die Fluorophore im Detektionsvolumen enthält, aber auch Informationen über die Datenerfassung und andere zeitliche Charakteristika des Messsystems.

Die erhaltene Autokorrelation  $G(\tau)$  kann nun nach einzelnen kinetischen Komponenten des Systems zerlegt werden. Wie zuvor erwähnt, bleibt hierbei zu berücksichtigen, dass das gültige Erfassungsintervall der Autokorrelation durch die Zeit für die Erfassung eines Datenpunktes und die mittlere Aufenthaltsdauer des langsamsten Partikels im Detektionsvolumen begrenzt ist. Kürzere Zeitdarstellungen in der Autokorrelation  $G(\tau)$  enthalten Informationen über das Datenerfassungssystem. Längere Zeiten enthalten mechanische und thermische Schwingungen des Mikroskops bis hin (zumindest theoretisch) zum Herzschlag des Messenden. Die Gesamtmesszeit für die Primärfunktion  $F(t)$  sollte dabei mindestens das 16-fache der zu ermittelnden Zeitgröße betragen <sup>[211-214]</sup>. Verwendet man jedoch nur das zugelassene Zeitintervall, können <sup>[204]</sup> verschiedene Systemgrößen bestimmt werden.

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left( \frac{1}{1 + (\tau / \tau_D)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \tau / (S^2 \cdot \tau_D)}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{R}{1-R} \cdot e^{-\tau / \tau_R} \right) \cdot \left( 1 + \frac{T}{1-T} \cdot e^{-\tau / \tau_T} \right)$$

wobei:

- $N$  = Zahl der Partikel im Detektionsvolumen
- $\tau$  = Zeitgröße für die Autokorrelationsfunktion
- $\tau_D$  = charakteristische Diffusionszeit senkrecht zum Laser
- $S$  = Verhältnis aus Länge zu Breite des Detektionsvolumens
- $R$  = relativer Anteil eines Protonierungszustandes
- $\tau_R$  = mittlere Dauer einer Protonierung
- $T$  = relativer Anteil des phosphoreszenten Tripletzustandes
- $\tau_T$  = mittlere Lebensdauer des Tripletzustandes

Je nach verwendetem Fluorophor bzw. Anzahl der verschiedenen fluoreszenten Spezies muss eine oder mehrere Autokorrelationsfunktionen entsprechend angepasst werden, um die charakteristischen Systemgrößen zu ermitteln.

Mit FCS ist es so möglich, eine biomolekulare Interaktion nachzuweisen, da ein kleines Molekül vor der Bindung eine kurze Diffusionszeit  $\tau_D$  besitzt, die sich bei der Anbindung an ein größeres Molekül deutlich verlängert.

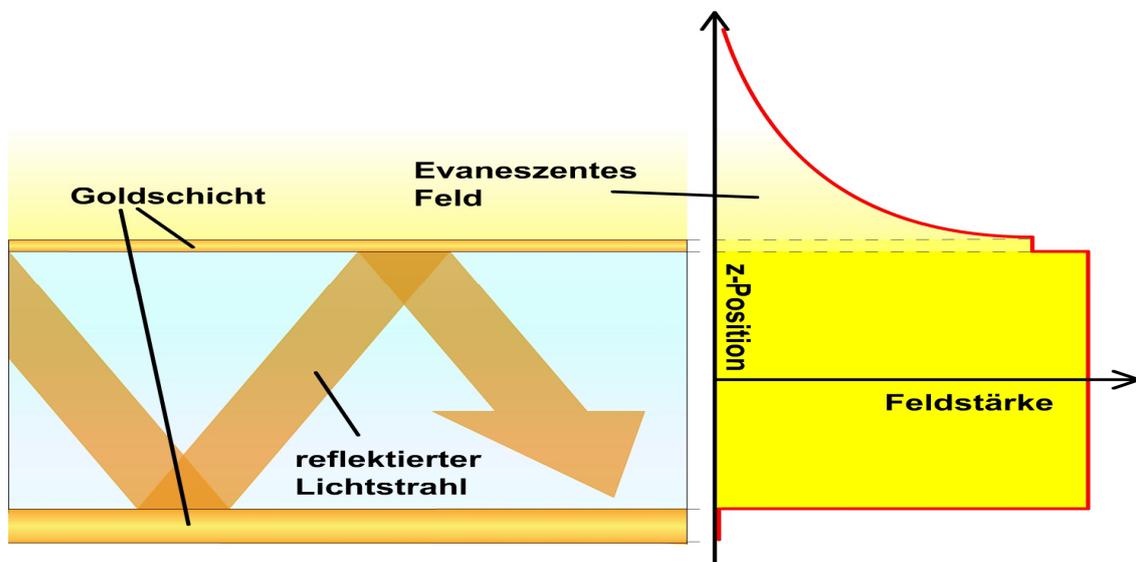
Diese Technik wurde bei der Beladung von MHC-Molekülen mit fluoreszenten Peptiden <sup>[215]</sup> und bei der Verfolgung von intramolekularen Umlagerungen in Proteinen <sup>[208]</sup> angewendet.

Bei der Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) werden beide interagierende Moleküle jeweils mit unterschiedlichen Fluorophor gelabelt und jeweils ein Primärsignal aufgenommen<sup>[216-218]</sup>. Danach wird mit jedem einzelnen Farbkanal eine Autokorrelation durchgeführt und die beiden Farbkanäle zusätzlich in einer Kreuzkorrelation verrechnet. Prinzipiell gelten für die Kreuzkorrelation ähnliche Gleichungen wie bei der Autokorrelation.

Mit FCCS kann man bi- und trimolekulare Interaktionen mit deutlich höherer Genauigkeit (im Vergleich zu FCS) vermessen und sogar mittlere Molekülabstände, Bindungsgleichgewichte und Reaktionskinetiken bestimmen <sup>[219]</sup>. In der Zwischenzeit wurden sogar Konstrukte mit 5 Bindungspartnern über FCCS vermessen <sup>[220]</sup>. Zwischenzeitlich gibt es auch Kreuzkorrelationsmessungen mit 3 oder 4 unterschiedlichen Fluorophoren <sup>[221;222]</sup>.

### 3.2.3 Das Evaneszente Feld

Evaneszenz leitet sich vom lateinischen „evanescere“ = „dahinschwinden“ ab. Ein Evaneszentes Feld entsteht, wenn ein elektromagnetisches Feld oder eine entsprechende Welle an einer Phasengrenze total reflektiert wird <sup>[223]</sup>. Auf Seiten der „dünnere“ Phase entsteht durch diese „Totalreflexion“, die aus quantenmechanischen Gesichtspunkten niemals vollständig sein kann, das Evaneszente Feld, das einige hundert nm über die Phasengrenze hinausreicht. Das Feld fällt exponentiell ab (Abb.3.14) und ist abhängig von der Wellenlänge des reflektierten Feldes.



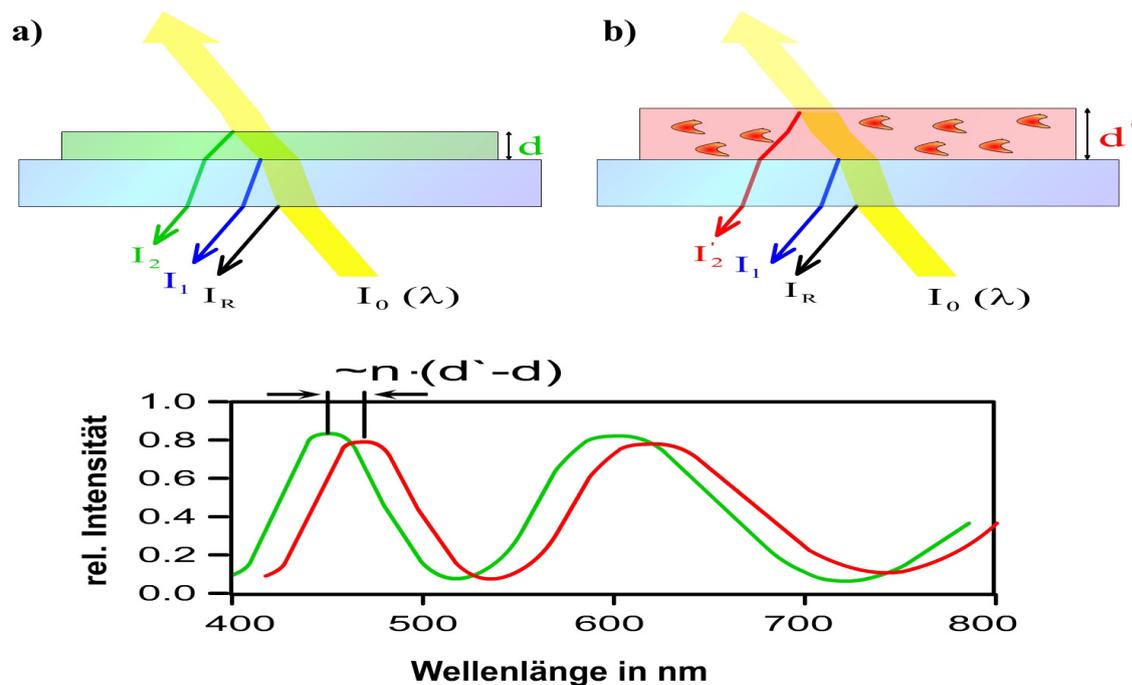
**Abb.3.14: Entstehung eines Evaneszenten Feldes**

Durch die Totalreflexion eines elektromagnetischen Feldes oder einer Welle an einer Phasengrenze entsteht auf der feldfreien Phasenseite ein Evaneszentes Feld. Es ist eine quantenmechanische Reminiszenz, die einige hundert nm weit über die Phasengrenze hinaus wechselwirken kann. Tritt eine Veränderung auf der Phasenseite des Evaneszenten Feldes auf, wird über die Rückkopplung die Totalreflexion ebenfalls verändert.

#### 3.2.3.1 Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (RIfS)

Bei der RIfS-Technik <sup>[224-226]</sup> wird durch einen Wellenleiter (Transducer) weißes Licht geleitet. Dieses kann mehrfach im Wellenleiter reflektiert werden, wodurch ein verstärktes Interferenzspektrum entsteht (Abb.3.15). Auf der Oberseite des Transducers wird zuerst ein polymerer Träger mit funktionellen Gruppen aufgebracht. Danach wird ein Interaktionspartner einer molekularen Wechselwirkung an diese funktionelle Gruppe gebunden. Das Evaneszente Feld baut sich im Polymer auf. Man kann nun mittels einer Durchflusszelle den Polymer

benetzen und ihn durch dieses Medium mit dem zweiten Interaktionspartner inkubieren. Findet eine Wechselwirkung statt, so wird sich die optische Dichte im Polymer verändern. Durch Rückkopplung über das Evaneszente Feld ändert sich die Reflexion und damit das Interferenzmuster. Die Verschiebung der Minima und Maxima ist dabei proportional zur Anzahl der Interaktionen und es können so quantitative Kinetik- und Bindungsmessungen durchgeführt werden.



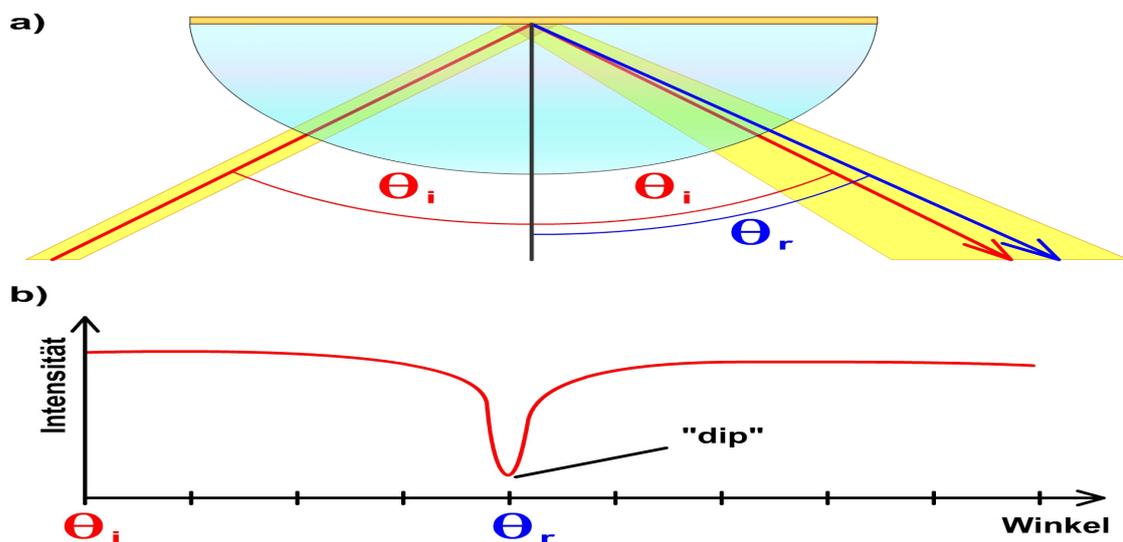
**Abb.3.15: Schematischer Aufbau eines RI-S-Chips**

Auf dem Transducer ist ein Polymer aufgebracht, der einen kovalent gebundenen Interaktionspartner enthält (a). In diesen Polymer reicht das Evaneszente Feld hinein. Durch molekulare Interaktion mit einem Analyten verändern sich die Dicke und die Lichtbrechung des Polymers (b). Hierdurch verändert sich das Evaneszente Feld und das Interferenzspektrum. Aus der Verschiebung der Minima und Maxima wird das Signal generiert.

### 3.2.3.2 Surface-Plasmon-Resonance (SPR)

Bei der Surface-Plasmon-Resonance <sup>[188;227;228]</sup> wird ebenfalls ein Lichtwellenleiter verwendet. Jedoch wird anstelle des weißen Lichts nur eine durch einen entsprechenden Laser erzeugte Wellenlänge verwendet. Der Wellenleiter ist mit einer dünnen ca. 50 nm dicken Goldschicht bedampft und mit einem ca. 100 nm dicken Polymer mit funktionellen Gruppen beschichtet. Der Auftreffwinkel des Laserlichts ist so gewählt, dass eine Totalreflexion an dieser Goldschicht stattfindet. Der Laser wird danach wieder ausgekoppelt und winkelabhängig wird die Intensität bestimmt (Abb.3.16a). Durch die Reflexion des Laserlichts baut sich das Evaneszente Feld in der Goldschicht auf und reicht noch etwa 300 nm über

die Goldschicht in den Polymer und das Medium hinein. Eine Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) ist das Anregen eines Schwingungszustandes eines Oberflächenelektrons in der Goldschicht. Durch das Evaneszente Feld tunneln die Photonen des Lasers in die Goldschicht und können entsprechende Resonanzschwingungen anregen, was sich als Intensitätsverlust (Dip) unter einem bestimmten Reflektionswinkel (der stets größer ist als der Totalreflexionswinkel) bemerkbar macht (Abb.3.16b). Anlagerungen von Molekülen an der Oberfläche sowie Temperatur- oder Dichteänderungen im Medium oberhalb der Goldschicht verändern die Resonanzzustände und damit den Winkel unter dem der Dip erscheint. „Biacore“ legte eine Winkeländerung von  $10^{-4}$  Grad, die auch der maximalen Auflösung des Goniometers entspricht, als eine „Reflective Unit“ (1 RU) fest <sup>[186;229]</sup>. Empirische Messungen ergaben  $\sim 1000$  RU für eine Proteinanlagerung von  $1 \text{ ng/mm}^2$ . Unter Berücksichtigung der Polymerdicke entspricht dies dann einer Konzentration von  $10 \text{ mg/ml}$  innerhalb des Polymers. Aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit muss ein SPR-Chip einer genauen Temperaturkontrolle unterliegen. Die Signalintensität kann durch Markierung des Liganden mit Metallnanopartikeln deutlich erhöht werden. Da ein Winkel weniger genau erfasst werden kann als ein komplettes Spektrum, ist das Signal in der RIFS-Technik genauer und intensiver als bei einer SPR-Messung.



**Abb.3.16: Aufbau einer SPR-Meßzelle im Kretschmann-Aufbau <sup>[8]</sup>**

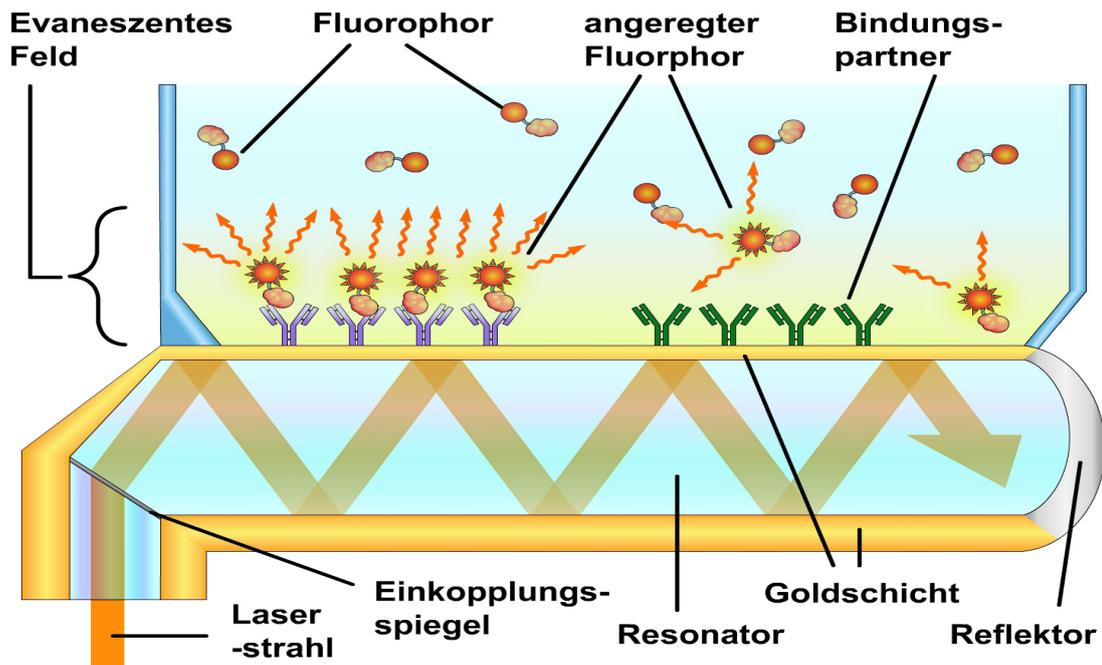
Der Laser wird über ein Prisma (a) eingekoppelt, wodurch unter einem Winkelbereich  $\Theta_i$ , der totalreflektiert wird, ein Lichtkegel entsteht. Unter bestimmten Winkeln  $\Theta_r$  werden Plasmonenresonanzen angeregt und die entsprechenden Photonen dadurch absorbiert. Der entstehende Intensitätsabfall (Dip) wird winkelabhängig (b) erfasst und ist proportional zur Proteinmenge. Die Anlagerung eines Liganden verschiebt den Dip um  $0,1^\circ$  pro  $1 \text{ ng}$  Protein und  $1 \text{ mm}^2$  Messfläche.

Zwischenzeitlich wurde eine hochauflösende SPR-Technik entwickelt <sup>[230]</sup>, die ihrerseits deutlich an die RfS-Technik erinnert, bzw. technische Ähnlichkeit dazu besitzt. Man verwendet weiterhin Laserlicht (wie bei klassischem SPR), aber man misst nur unter einem Austrittswinkel (wie bei RfS) die Intensität. Aus der Änderung der Intensität wird die Oberflächenbelegung berechnet. Dies wurde hochauflösend für molekulare Monolagen bereits gezeigt <sup>[231]</sup>. Dieser Ansatz scheint recht vielversprechend, sofern die Signalamplitude noch deutlich erhöht werden kann.

Eine weitere Technik, die ein Hybrid aus SPR und RfS darstellt, ist die Lichtfaser-SPR-Technik. Hierbei wird über eine Glasfaser weißes Licht (wie bei RfS) geleitet. Am zumeist Gold beschichteten Ende der 200 nm dicken Glasfaser trifft das weiße Licht unter allen Winkeln auf diese Grenzfläche auf. Ein Teil des Lichts wird über SPR im umgebenden Medium absorbiert. Das zurückreflektierte Licht wird ausgekoppelt und ein Spektrum aufgenommen oder ein Bild generiert. Durch eine Anlagerung ändert sich die Farbe des absorbierten Lichts (entsprechend der RfS-Technik). Dies kann als bildgebendes Verfahren verwendet werden.

### 3.2.3.3 Fluoreszenz auf einem Zeptosense-Chip

Die Zeptosense-Technik <sup>[232]</sup> ist eine Adaption an das thermische Resonanzimaging zur Charakterisierung von Halbleiterschaltungen. Man verwendet weißes oder Laserlicht, das in den Wellenleiter, der wieder mit einem Polymer überschichtet ist, eingekoppelt wird. Durch Totalreflexion entsteht wieder ein Evaneszentes Feld inner- und oberhalb des Polymers. Jedoch wird das Licht nicht für die Signaldetektion verwendet, sondern dient nur als Energiequelle. Nähert sich ein fluoreszenter Ligand der Oberfläche auf 300 nm, wird er angeregt und erzeugt ein Fluoreszenzsignal <sup>[233]</sup>. Interagiert der Ligand an der Oberfläche, wird dort ein konstantes Fluoreszenzsignal erzeugt, da die Anregungseffizienz exponentiell mit der Nähe zur Oberfläche ansteigt. Somit erzeugen nur gebundene Liganden ein deutliches Signal (Abb.3.17). Alle Fluorophore, die mehr als 300 nm von der Oberfläche entfernt sind, erzeugen kein Signal, was im Vergleich zu allen anderen Fluoreszenztechniken einmalig ist. Diese Technik der Fluoreszenzanregung erlaubt Nachweise bis in den zeptomolaren Bereich ( $3 \cdot 10^{-20}$  M). Das Design und der Aufbau des Wellenleiters sind jedoch technisch recht aufwändig.



**Abb.3.17: Schematischer Aufbau eines Zeptosense-Chip** <sup>[3]</sup>

Über einen Lichtwellenleiter-Resonator wird ein Evaneszentes Feld in der Lösung erzeugt. Ein fluoreszenter Ligand wird, sobald er in das Evaneszente Feld eintritt angeregt und ein entsprechendes Fluoreszenzsignal erzeugt. Bei einer Anlagerung entsteht ein stabiles Fluoreszenzsignal. Da das anregende Lichtfeld im Wellenleiter verbleibt, ist diese Meßmethode besonders sensitiv (Nachweise bis in den zeptomolaren Bereich).

Der Zeptosense-Chip kann mit klassischen Mikroarrays kombiniert werden <sup>[232]</sup> .

### 3.2.4 Mikroskopie

Ein Mikroskop dient zur Vergrößerung eines Objekts und seine Auflösung ist für klassische optische Mikroskope nach dem Abbe'schen Gesetz bestenfalls so groß wie die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts. Neuere Ansätze über quantenmechanische Dämpfungsfelder <sup>[234-236]</sup> oder holographische Phasenregression <sup>[237]</sup> ermöglichen es allerdings, mit Lichtmikroskopen bis in den atomaren Bereich vorzudringen.

#### 3.2.4.1 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

Ein konventionelles Epifluoreszenz-Mikroskop (Abb.3.18) verwendet üblicherweise eine starke UV-taugliche Lichtquelle wie eine Plasmabogenlampe oder eine Quecksilberdampflampe. Die Optik konzentriert die maximale Ausleuchtung durch die Lampe auf die Oberfläche des zu untersuchenden Objekt. Bei dickeren

Objekten kann dies zu unerwünscht starker Hintergrundfluoreszenz führen. Dies kann durch konfokale Optik umgangen werden.

Für die Detektion der Fluoreszenz kann das eingestrahlte Licht durch einen Anregungsfilter auf einen definierten Wellenlängenbereich eingeschränkt werden. Das Fluoreszenzlicht der Probe kann durch einen Emissionsfilter ebenfalls beschränkt werden, um unspezifische Fluoreszenz oder Spektren anderer parallel verwendeter Fluorophore aus der Bildaufnahme zu entfernen.

Die Bilderfassung wird heute üblicherweise durch eine hochauflösende und schnelle CCD-Kamera vorgenommen.

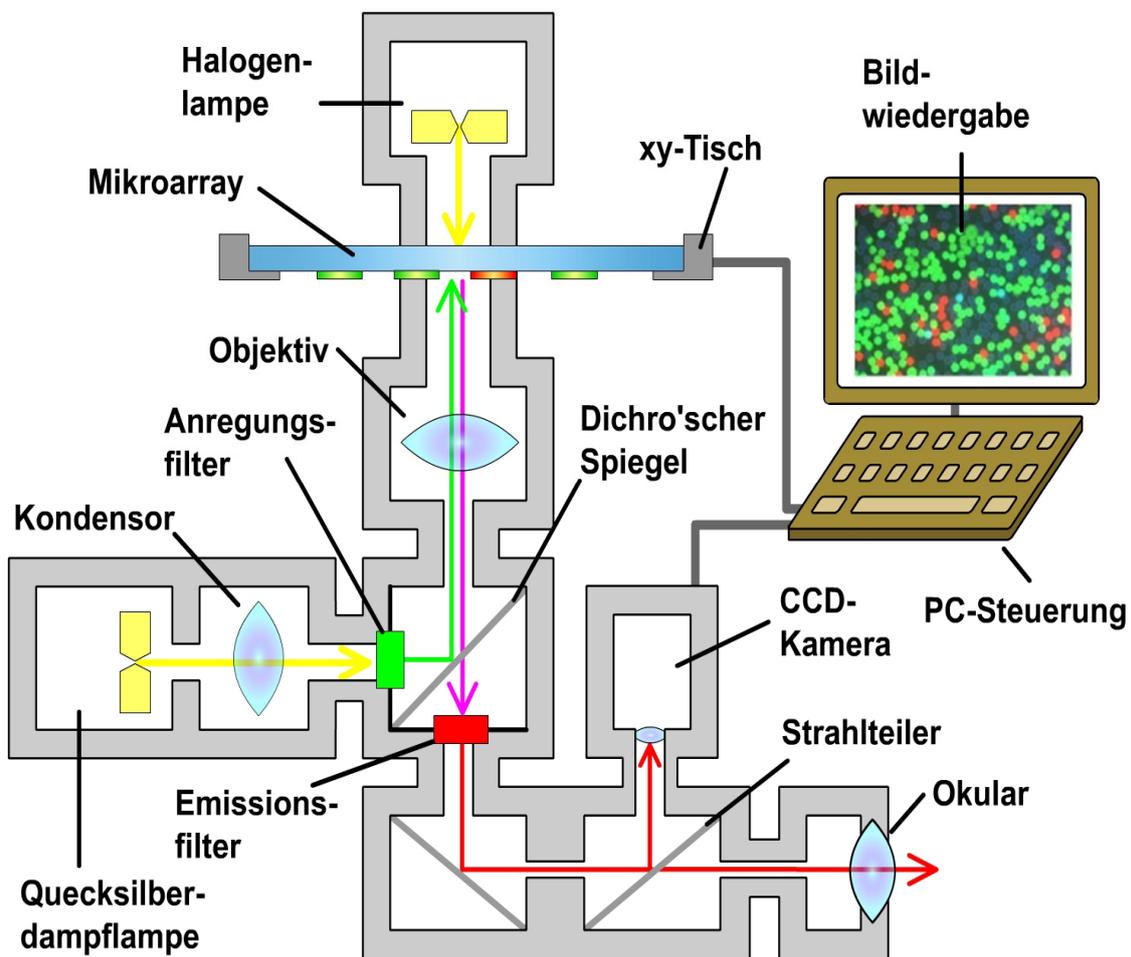


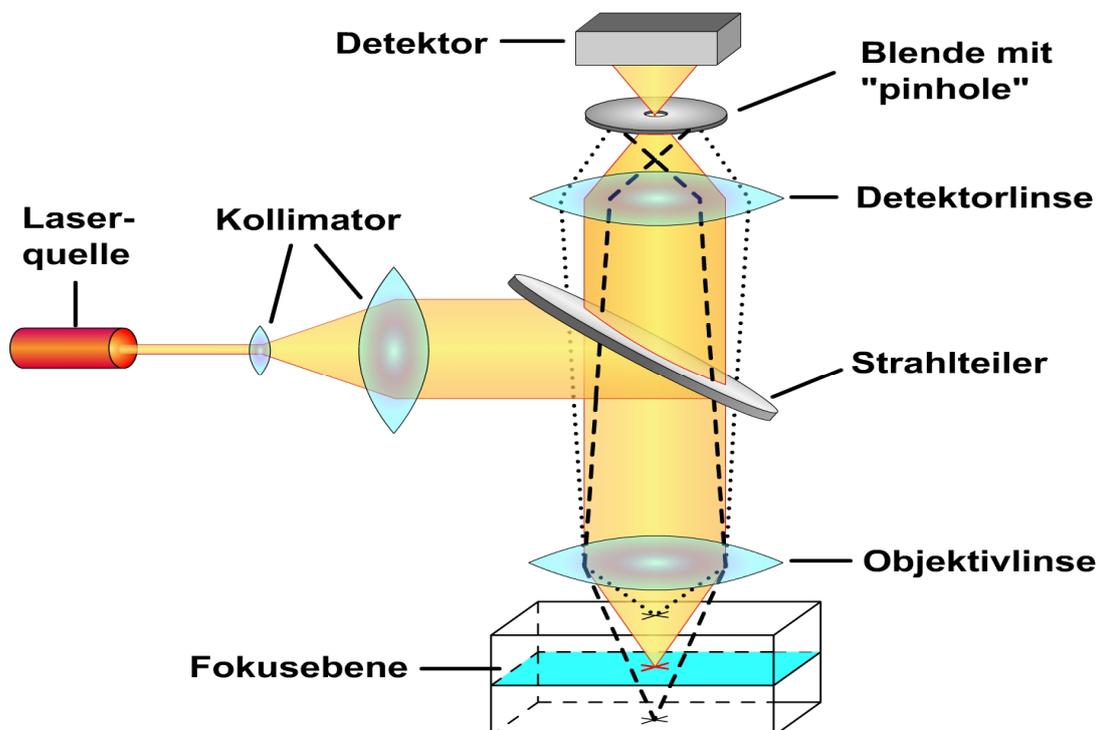
Abb.3.18: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops [7]

Mit einer Quecksilberdampfampe wird ein weißes Spektrum sowie UV-Licht erzeugt. Über einen Filter wird die Anregungswellenlänge ausgewählt, vom dichro'schen Spiegel auf die Probe reflektiert und dort absorbiert. Emittiertes Fluoreszenzlicht passiert den dichro'schen Spiegel und kann entweder mit dem Auge betrachtet oder mit der CCD-Kamera aufgenommen werden. Eine Halogenlampe oder Quecksilberdampfampe kann für Auflichtaufnahmen eingesetzt werden.

### 3.2.4.2 Aufbau einer konfokalen Optik

Eine konfokale Optik (Abb.3.19) ist bei bildgebenden Verfahren <sup>[202;238]</sup> immer mit einem Raster- oder Scanning-Prozess verbunden. Dieser Vorgang verlangsamt die Bildaufnahme deutlich. Durch die Verwendung einer Nipkow-Scheibe können mehrere konfokale Volumina erzeugt und damit die Bildaufnahme deutlich beschleunigt werden. Ein konfokales Volumen (Abb.3.12) wird erzeugt, indem ein rasterbarer Laserstrahl auf das Objekt fokussiert wird. In diesem Bereich wird besonders viel Fluoreszenz erzeugt. Über konventionelle Mikroskopoptik wird nun der Laserfokus auf den Detektor abgebildet. Durch eine Lochblende (Pinhole) vor dem Detektor wird sämtliche Fluoreszenz, die ober- und unterhalb der Laserfokusebene erzeugt wird, ausgeblendet. Die Lochblende muss vor jeder Messung so in der xy-Ebene ausgerichtet werden, dass der Laser genau in der Lochblende fokussiert wird. Nur so kann der Laserfokus genau abgebildet werden. Je kleiner die Lochblende eingestellt ist und je genauer der Laser fokussiert wird, umso besser wird die Auflösung der konfokalen Aufnahme.

Bei Fluoreszenz-Korrelations-Messungen (Kapitel 3.2.2.4) wird ebenfalls ein konfokales Volumen benötigt, aber man benötigt keine Scan-Vorrichtung.



**Abb.3.19: Aufbau eines konfokalen Strahlengangs**

Ein Laserstrahl wird auf der Probe fokussiert. Das „Pinhole“ wird in x-, y- und z-Richtung genau ausgerichtet, so dass nur Licht aus der Fokusebene in den Detektor gelangt. Licht, das ober- (Punkt-Linie) und unterhalb (Strich-Linie) der Fokusebene erzeugt wird, trifft auf die Blende.

### 3.3 Diffusion

Unter Diffusion versteht man die ungerichtete Wärmebewegung von Molekülen und Partikeln<sup>[239]</sup>. Diese Wärmebewegung der Moleküle ist die Ursache des Netto-Stofftransports in einem Konzentrationsgefälle. Da bei thermischer Molekülbewegung a priori keine Bewegungsrichtung bevorzugt wird, muss sie in einem Konzentrationsgefälle zwangsläufig zu einer Abwanderung gelöster Teilchen aus Zonen hoher Konzentration in Bereiche geringerer Konzentration führen<sup>[240]</sup>. Das Phänomen der Diffusion ist alltäglich, da sich alle Geruchsstoffe durch die Luft über Diffusion verteilen. Nahezu alle Lebewesen sind in der Lage, den daraus entstehenden Konzentrationsgradienten wahrzunehmen und so die Quelle des Geruchsstoffes zu lokalisieren.

#### 3.3.1 Die Fick'schen Gesetze

Diffusion beruht auf Zufallsbewegungen von Molekülen und entsprechende mathematische Grundlagen wurden 1855 von Fick formuliert<sup>[241]</sup>. Er adaptierte hierfür die von Fourier 1822 aufgestellten Gleichungen zur Wärmeleitung in Feststoffen<sup>[242;243]</sup>.

Die mathematische Theorie der Diffusion beruht auf der Annahme, dass bei eingestelltem Diffusionsgleichgewicht der Fluss  $J_{Diff}$  der Moleküle sowohl proportional zum Konzentrationsgradienten  $\frac{\partial c}{\partial x}$  als auch zum Diffusionskoeffizienten  $D$  sein muss. Dieser Ansatz ist als erstes Fick'sches Gesetz bekannt und wird oft als „Steady-State“, d.h. von einer Quelle fließt ein konstanter Strom zu einer Senke, bezeichnet.

$$J_{Diff} = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x}$$

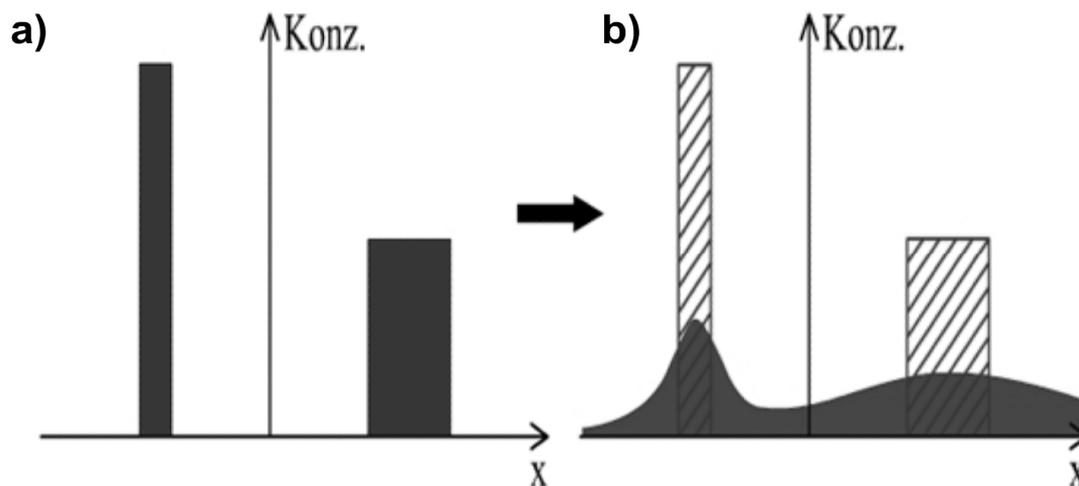
Die Diffusionskonstante  $D$  ist ein Maß für den hydrodynamischen Radius und der Form des Moleküls und der Zähigkeit des umgebenden Mediums<sup>[244]</sup>.

Hat sich der Diffusionsgradient noch nicht eingestellt, so findet das zweite Fick'sche Gesetz seine Anwendung.

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}\right)_t$$

Ist zum Zeitpunkt  $t_o = 0$  eine anfängliche Konzentrationsverteilung  $c(x, t_o)$  in einem Medium bekannt, so kann unter Ausschluss von Störungen wie Verdunstung oder Konvektionsströmungen, für jeden späteren Zeitpunkt die Konzentrationsverteilung  $c(x, t)$  entsprechend berechnet werden (Abb.3.20).

$$c(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \int_{-\infty}^{+\infty} c(x, t_o) \cdot e^{-\frac{(x-x_o)^2}{4Dt}} dx_o$$



**Abb.3.20: Schematische Darstellung einer Konzentrationsveränderung durch Diffusion**

Aus (a) der anfänglichen Konzentrationsverteilung  $c(x, t_o)$  kann (b) die spätere Konzentrationsverteilung  $c(x, t)$  mittels der Fick'schen Gesetze berechnet werden.

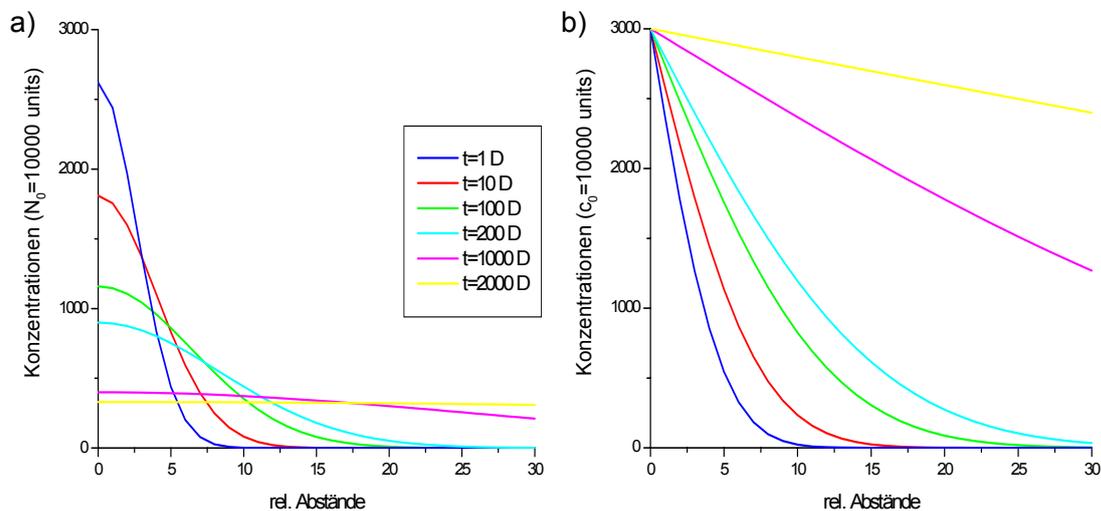
Wenn man nun in einem „leeren“ Medium einen Ausgangspunkt mit hoher Konzentration erzeugt, so wird durch Diffusion automatisch ein Konzentrationsgradient entstehen, der im Laufe der Zeit immer weiter ins Medium hineinreichen wird. Diesen Effekt kann man dazu nutzen, um mit einer einzigen Zugabe einer Verbindung an einem Punkt im Medium einen beliebigen Konzentrationsgradienten zu schaffen.

### 3.3.2 Endliche und unendliche Quellen

Zur Lösung der Differentialgleichungen, die durch die Anwendung der Fick'schen Gesetze beschrieben werden, nimmt man generell zwei physikalische Grenzsituationen an. An einem Ort ohne räumliche Ausdehnung soll zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine Konzentration  $c_o$  vorliegen. Man bezeichnet diesen Ort als

„Quelle“ aus dem die Konzentration  $c_o$  entspringt. Bleibt diese Konzentration über die Zeit konstant, so spricht man von einer unendlichen Quelle (Abb.3.21a). Dies ist der Fall, wenn aufgrund eines chemischen Gleichgewichts oder eines Phasenübergangs die Konzentration konstant gehalten wird. Wenn die Konzentration in der Quelle im Laufe der Zeit abnimmt, also versiegt, so spricht man von einer endlichen Quelle (Abb.3.21b).

Im Falle der unendlichen Quelle entspricht der Kurvenverlauf der komplementären Errorfunktion, die am Startpunkt immer die Konzentration  $c_o$  besitzt und im Falle der endlichen Quelle einer Gaußverteilung, deren Integral stets der Gesamtmenge des diffundierenden Stoffes entspricht <sup>[243]</sup>.



**Abb.3.21: Konzentrationsgradienten durch Diffusion bei verschiedenen Quellen**

In einer endlichen, versiegenden Quelle (links) und einer unendlichen, nicht versiegenden Quelle (rechts) befindet sich zum Startzeitpunkt  $t = 0$  die Konzentration  $c_o$ . Mit zunehmender Zeit bildet sich ein Konzentrationsgradient aus, der immer weiter ins Medium hineinreicht. Bei der endlichen Quelle nimmt die Konzentration mit der Zeit in der Quelle stetig ab und der Gradient verflacht. Dieses Verflachen ereignet sich auch bei der unendlichen Quelle, allerdings bleibt die Konzentration in der Quelle konstant. Die unendliche Quelle wird dabei durch die komplementäre Errorfunktion und die endliche Quelle durch eine Gaußfunktion beschrieben.

Unabhängig von der Art der Quelle kann durch die Erzeugung einer einzigen Quelle und einer gegebenen Zeit stets ein Konzentrationsgradient erzeugt werden. Erzeugt man nun zwei Quellen unterschiedlicher Stoffe an unterschiedlichen Orten, so kann man die Konzentrationsgradienten eines Zwei-Komponenten-Assays herstellen.

### 3.4 Peptidsynthese auf Festphasen

In den ersten Jahrhunderten der Entwicklung der Chemie aus der Alchemie wurde zumeist in homogener flüssiger Phase gearbeitet. Ebenso wurde die Peptidsynthese in homogener Phase durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass nach jeder Reaktion das Zwischenprodukt aufgereinigt werden konnte, aber auch stets den Nachteil, dass nach jedem Reaktionsschritt die reaktiven Chemikalien abgetrennt werden mussten. Trotzdem wurden mit nicht unbeträchtlichem Aufwand kleinere Proteine synthetisiert.

Robert Bruce Merrifield entwickelte und veröffentlichte 1963 das Konzept, einen polymeren Träger zu verwenden, der relativ einfach durch Filtration von der Reaktionslösung getrennt werden kann <sup>[112;113;245]</sup>. Damit kann eine Synthese nicht mehr nur in homogener Phase sondern auch in heterogener Phase durchgeführt werden. Variationen dieses Ansatzes sind die Flüssigphasen-Synthese, bei der sich der Polymer im Lösungsmittel komplett auflöst, später aber wieder ausfällbar ist, und die Phasentransfer-Synthese, bei der sich entweder Edukt oder Produkt in der flüssigen Phase löst und die restlichen Bestandteile im Polymer verbleiben. Weiterhin erlaubte die Festphasensynthese die Verwendung von Syntheserobotern <sup>[113]</sup> und eröffnete so ganz neue Möglichkeiten.

Für sein innovatives Konzept wurde Merrifield 1984 mit dem Nobelpreis in Chemie geehrt und man bezeichnet die Festphasensynthese auch oft als Merrifield-Synthese.

Heutzutage werden Polymerkügelchen (**Beads**) verwendet, die in exzellenter Qualität und in nahezu jeder Größe (100 nm bis 800 µm), Oberflächenbeschaffenheit und Rauigkeit erhältlich sind. Bei der Festphasenreaktion quellen die Beads im Lösungsmittel auf und bieten damit ihr gesamtes Volumen als Reaktionsmatrix an. Zumeist besteht das Innere eines Beads aus einem Polystyrolkern, der mit 1% Divinylbenzol quervernetzt wird. Entweder werden während der Polymerisation funktionelle Gruppen copolymerisiert oder nachträglich eine weitere Polymerschicht mit funktionellen Gruppen auf dem Polystyrolkern aufgebracht. Neben Carboxy- und Aminogruppen sind viele weitere funktionelle Gruppen erhältlich oder herstellbar.

Während der Synthese werden die Beads mit Chemikalien in einem Lösungsmittel versetzt. Dieses kann problemlos über einen entsprechenden Filter entfernt

werden, da die Kugelform der Beads stets genug Freiraum lässt. Die Beads sind jedoch alles andere als statisch. Sie quellen in den für die Peptidsynthese üblichen organischen Lösungsmitteln wie DCM oder DMF bis zum Fünf- oder Sechsfachen ihres ursprünglichen Volumens auf. Hierdurch erhalten die Chemikalien Zugang zum Inneren des Beads und können auch dort eine Reaktion eingehen. Somit ist bei der Festphasensynthese nicht die Beadoberfläche sondern das gesamte Volumen reaktiv.

Der polymere Träger sollte homogen reagieren, chemisch inert, gut mit Lösungsmittel benetzbar, leicht filtrierbar und mechanisch stabil sein. Heutzutage werden etliche verschiedene Trägermaterialien verwendet, angefangen von klassischen Polymeren wie Polystyrol, Acrylamiden, PVC und PE bis hin zu proteolytisch verknüpfter Cellulose oder Agarose, Melamin oder amorphen Silizium. Die Art der gewünschten Synthese und der eingesetzten Chemikalien legt den entsprechenden Festphasen-Polymer fest, aus dem das Bead zu bestehen hat.

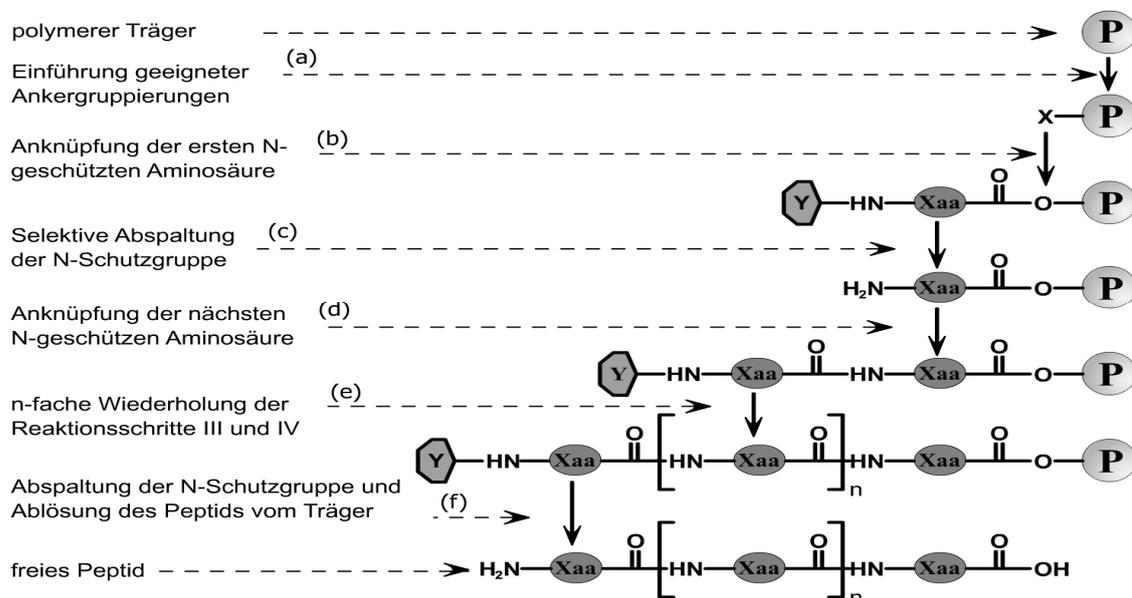
### 3.4.1 Grundsätzliches zur Festphasen-Peptidsynthese

Bei der Festphasen-Peptid-Synthese <sup>[246;247]</sup> wird das gewünschte Peptid Schritt für Schritt aufgebaut. Jedoch muss der polymere Träger bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllen.

- Hierzu wird zuerst auf der Polymermatrix ein Abstandshalter (**Spacer**) aufgebracht, der sterische Einschränkungen abbaut und die funktionelle Gruppe für die Reaktion leichter verfügbar macht und zudem noch die Benetzbarkeit durch Lösungsmittel erhöhen soll. Der Spacer soll chemisch inert sein und verbleibt auf dem polymeren Träger.
- Ein sogenannter „**Linker**“ führt dann die funktionelle Gruppe, in der Peptidsynthese üblicher Weise eine NH<sub>2</sub>-Gruppe, ein und enthält zudem eine spaltbare Gruppe (Abb.3.22a). Diese sorgt dafür, dass über eine geeignete chemische Reaktion das Peptid vom Polymer gespalten werden kann. Der Linker kann die Wahl der funktionellen Gruppe, die das Peptid an diesem Ende modifiziert, beeinflussen. So kann beispielsweise durch die Verwendung eines Rink-Amid-Syntheseharzes eine Amidierung des C-Terminus erreicht werden.

Zumeist werden die Beads nach der Polymerisation direkt mit Spacer und Linker hergestellt. Die Festphasensynthese kann in zwei wesentliche Schritte [246;247] unterteilt werden, die repetitiv zum Aufbau eines Peptids führen (Abb.3.22).

- Der **Kupplungsschritt** (Abb.3.22b) bindet eine Aminosäure an die funktionelle Gruppe des Harzes. Hierbei wird zumeist die Carboxyfunktionalität der Aminosäure aktiviert und der polymere Träger weist freie Aminogruppen auf. Damit keine Selbstpolymerisation der aktivierten Aminosäure erfolgt, sind diese mit einer NH<sub>2</sub>-Schutzgruppe in diesem Reaktionsschritt inertisiert. Weitere reaktive Gruppen in der Seitenkette der Aminosäuren werden mit weiteren Schutzgruppen, die erst nach der Synthese abgespalten werden, blockiert.
- Nach mehrfachem Waschen des Harzes wird der **Entschützungsprozess** eingeleitet (Abb.3.22c). Nun wird mittels einer weiteren chemischen Reaktion die zuvor geschützte Aminogruppe der Aminosäure und damit nun die Schutzgruppe am N-Terminus des Peptids entfernt, ohne dabei die Schutzgruppen an den Seitenketten zu entfernen. An die freie Aminogruppe kann eine weitere Aminosäure gekuppelt werden. Nach wiederholtem Waschen beginnt der Zyklus wieder mit einem Kupplungsschritt.



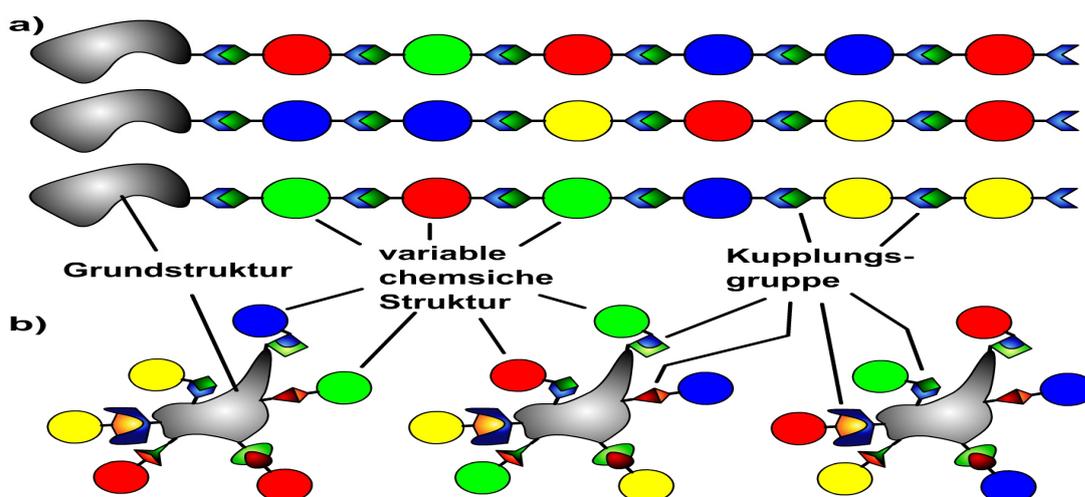
**Abb.3.22: Schematische Darstellung der Festphasensynthese**

Das Syntheseharz (a) enthält einen Abstandshalter (Spacer) und eine Abgangsgruppe (Linker) freie NH<sub>2</sub>-Gruppe. Nach vollendeter Synthese wird der Linker gespalten und so das Peptid freisetzt. Im ersten **Kupplungsschritt** (b) wird eine Aminosäure angebunden, deren NH<sub>2</sub>-Gruppe geschützt und COOH-Gruppe aktiviert ist. Im ersten **Entschützungsprozess** (c) wird von der NH<sub>2</sub>-Gruppe die Schutzgruppe entfernt, wodurch eine freie NH<sub>2</sub>-Gruppe entsteht. Nun kann erneut ein Kupplungsschritt (d) und ein Entschützungsprozess erfolgen. Nach zyklischer Wiederholung erhält man das gewünschte Peptid (e), welches nun durch Spaltung des Linkers freigesetzt wird (f).

Bei der Festphasensynthese wird stets ein deutlicher Überschuss an der zu kuppelnden Aminosäure zugegeben, um eine möglichst komplette Umsetzung zu erhalten. Dies ist insbesondere wichtig, wenn lange Peptide hergestellt werden. Bei einem 40 Aminosäuren langen Peptid und einer Kupplungseffizienz von beispielsweise 99,5% erhält man zu 81,8% die gewünschte Peptidsequenz. Bei 98%iger Kupplungseffizienz nur noch zu 44,5% das gewünschte Peptid. Es ist also darauf zu achten, dass jeder Kupplungsschritt und jeder Entschützungs-schritt mit möglichst 100% Effizienz durchgeführt wird.

### 3.4.2 Split & Mix Kollektionen

Die Festphasensynthese bietet nun die einzigartige Möglichkeit schnell sogenannte **kombinatorische Kollektionen** <sup>[248]</sup> zu synthetisieren. Die Anzahl der unterschiedlichen Verbindungen in einer Kollektion wird als Diversität bezeichnet. Die Herstellung einer chemischen Kollektion ist prinzipiell auch mit anderen Methoden möglich, allerdings nicht mit derselben Effizienz, Einfachheit und Eleganz wie bei der Festphasensynthese. Man unterscheidet bei chemischen Kollektionen zwischen linearen und verzweigten Aufbau. Bei linearen Kollektionen (Abb.3.23a) werden verschiedene Bausteine in unterschiedlicher Reihenfolge aneinandergelagert, vergleichbar einer Perlenkette. Bei verzweigten Kollektionen (Abb.3.23b) werden auf einem chemischen Grundkörper an unterschiedlichen Stellen verschiedene Bausteine eingeführt.

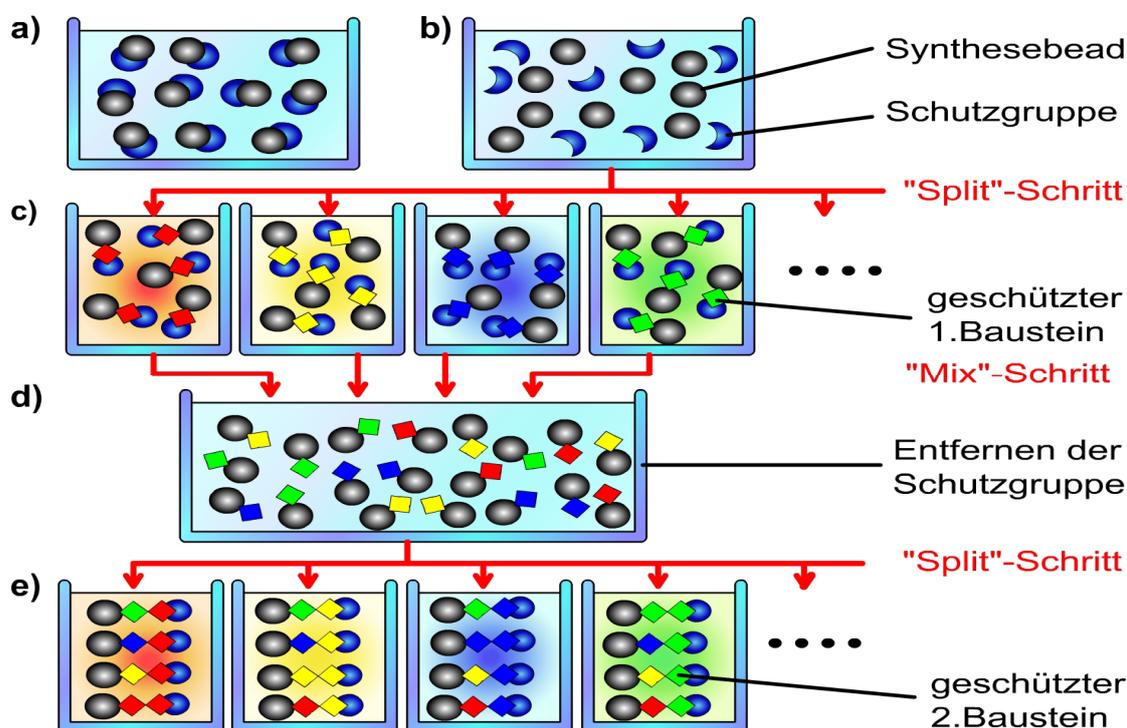


**Abb.3.23: Unterschied zwischen linearen und verzweigten chemischen Kollektionen**

Bei einer linearen Kollektion (a) wird eine beliebig lange Kette aufgebaut. An den unterschiedlichen Positionen der Kette können unterschiedlichste Bausteine wie Aminosäuren eingefügt sein. Bei verzweigten Kollektionen (b) wird an einen chemischen Grundkörper an verschiedenen Positionen jeweils ein Baustein eingefügt, wodurch die Diversität auf die Zahl der entsprechenden Positionen eingeschränkt wird.

Durch das „**Split & Mix-Verfahren**“ (Abb.3.24) in der Festphasensynthese werden beide Varianten von Verbindungskollektionen zugänglich.

Man beginnt mit dem Entschützen der ersten Position (Abb.3.24b). Danach werden die bis dahin identischen Beads auf  $n_1$  Reaktionsgefäße aufgeteilt (Split). In jedem Reaktionsgefäß wird nun jeweils ein anderer Baustein  $R^1$  hinzugefügt (Abb.3.24c) und angekuppelt, wodurch auf jedem Bead genau eine definierte Verbindung entsteht. Die entstehende Verbindung unterscheidet sich nun hinsichtlich der ersten Position  $R^1$  zwischen den Reaktionsgefäßen. Die Beads werden nun in einem Gefäß vereint (Mix) und die zweite Position wird entschützt (Abb.3.24d). Danach werden die Beads auf  $n_2$  Reaktionsgefäße aufgeteilt (2. Split) und wieder verschiedene Bausteine  $R^2$  angekuppelt (Abb.3.24e). Nach weiterem Mischen der Beads fährt man so sukzessive mit Entschützen, Splitten, Kuppeln und wieder Mischen fort, bis die Kollektion mit gewünschter Diversität erzeugt wurde. Dabei wird auf jedem Bead genau eine Verbindung synthetisiert. Je nach „Geschichte“ des Beads bei seiner Reise durch die verschiedenen Reaktionsgefäße entsteht eine unterschiedliche Verbindung.



**Abb.3.24: Schematisches Vorgehen bei der Split & Mix Synthese**

Die Schutzgruppe wird entfernt und die Beads in verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt (Split). In jedem Reaktionsgefäß wird ein anderer Baustein angebunden und die Beads werden danach wieder in einem Gefäß vereint (Mix). Sukzessive wird jeweils eine Schutzgruppe entfernt und die Beads auf verschiedene Gefäße wieder gesplittet. Dort wird jeweils pro Gefäß ein weiterer Baustein angebunden und die Beads wieder in einem Gefäß vereint. Am Ende der Synthese können die Beads einzeln in Gefäße überführt und dort die Verbindung abgespalten werden.

Die **Diversität** <sup>[110]</sup> einer Kollektion mit  $k$  unterschiedlichen Positionen und  $n_k$  unterschiedlichen Bausteinen an der jeweiligen Position beträgt  $\prod_{i=1}^k n_k$

Verbindungen. Mindestens ebenso viele Beads müssen daher verwendet werden. Da das Splitten ein statistisches Verteilen der Beads ist, wird stets ein Vielfaches der Diversität an Beads eingesetzt. Man spricht dabei von Redundanz. Aus statistischen Gründen sollte die Redundanz größer als 6 sein, damit mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit mindestens ein Bead jeder möglichen Verbindung synthetisiert wurde.

Ist eine Kollektion generiert, kann jedes Bead einzeln in ein Gefäß transferiert, die Verbindung abgespalten und das Bead entfernt werden. So erhält man eine Stammlösung der Verbindung.

Man erhält also mit einer minimalen Anzahl an Reaktionsschritten (Summe aller Diversitäten der einzelnen Positionen) eine maximale Anzahl an Verbindungen (Produkt aller Einzeldiversitäten). Keine andere Technik oder Methode bietet diesen Vorteil.

### 3.4.3 Scan-Kollektionen

Eine Scan-Kollektion <sup>[249]</sup> ist eine besondere Form der kombinatorischen Kollektion, die insbesondere bei Peptiden und Proteinen Anwendung findet. Als Basis verwendet man hierbei bekannte Peptid- oder Proteinsequenzen, die mit einem anderen Protein (Rezeptor) interagiert. Die Sequenz wird jeweils an einer oder mehreren Positionen variiert.

- Bei einer **Alanin-Scan-Kollektion** <sup>[250;251]</sup> wird jeweils eine Position in der Peptidsequenz durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Diese Verbindungen werden nun jeweils auf biomolekulare Interaktion mit dem Rezeptor im Vergleich zum ursprünglichen Peptid getestet. Wurde die Position einer funktionell wichtigen Aminosäure durch das Alanin ersetzt, so wird die Interaktion deutlich schlechter ausfallen. Änderungen funktionell unwichtiger Positionen zeigen keine Änderung in der Interaktion mit dem Rezeptor.
- Bei einer **X-Scan-Kollektion** <sup>[249]</sup> wird jeweils eine Position in der Peptidsequenz durch jede mögliche Aminosäure ersetzt und die

entstandenen Verbindungen werden auf Interaktion mit dem Rezeptor geprüft. So ist es möglich ein Struktur-Wirkungs-Profil der einzelnen Positionen zu erhalten, was zu einem vertieften Verständnis der molekularen Wechselwirkung führt. Anhand der erhaltenen Informationen kann so die Wechselwirkung optimiert oder die Strukturanaloga entwickelt werden.

- Besitzt man die Sequenz eines Proteins so können überlappende Teilsequenzen hergestellt werden. Man synthetisiert dabei Teilsequenzen des Proteins mit festgelegter Sequenzlänge und testet diese auf Interaktion mit dem Rezeptor. So kann festgestellt werden welche Sequenzen für die Interaktion notwendig sind (**Epitopmapping**) <sup>[249;252-254]</sup>. Interagierende Sequenzen können in einer weiteren Syntheserunde verlängert oder verkürzt hergestellt werden, um so die kürzeste noch interagierende Sequenz zu ermitteln (Minimal-Epitop).
- Bei **Teilkollektionen** werden einzelne natürliche Sequenzen oder Sequenzbereiche beibehalten und ein Teil der Sequenz wird zufällig mit „Split & Mix-Techniken“ generiert. So kann man die Sequenz eines bekannten interagierenden Peptids verlängern oder teilweise verändern und dabei die Interaktion zum Rezeptor verbessern <sup>[250]</sup>.

### 3.4.4 Strukturaufklärung

Die Festphasensynthese nach der Split-Mix-Methode bietet den einzigartigen Vorteil mit einer minimalen Anzahl an Syntheseschritten eine maximale Anzahl von Verbindungen zu generieren, allerdings für den Preis, dass die Verbindung in ihrer Struktur „unbekannt“ ist. Man weiß, dass auf jedem einzelnen Bead nur eine einzige Verbindung <sup>[248;249;255-258]</sup> synthetisiert wurde (one bead = one compound), allerdings sind die Beads als solche ununterscheidbar. Man kann also nicht den Weg zurückverfolgen, den das Bead während der „Split & Mix Synthese“ durch die einzelnen Reaktionsgefäße genommen hat. Findet man also eine Verbindung, die besonders gut mit dem Rezeptor interagiert, hat man noch keine Information über deren Struktur oder Sequenz. Daher muss ein Teil der Verbindung dafür verwendet werden, um diese Struktur zu ermitteln. Die Strukturaufklärung wird als Dekonvolution bezeichnet und erfolgt durch klassische chemische Analytik. Bei

Peptiden wird beispielsweise mit automatisiertem Edman-Abbau oder sequenzierende MS-MS-Messungen die Sequenz des Peptids ermittelt. Durch eine geschickte Wahl der Bausteine ist es möglich, dass jede Verbindung eine einzigartige Masse besitzt, so kann sehr einfach über die Bestimmung der Masse die Struktur ermittelt werden.

Es wurden umfangreiche Anstrengungen unternommen, um die Dekonvolution von kombinatorischen Kollektionen einfach und rationell zu gestalten. Beispielsweise wurden in einzelne Beads Barcodes <sup>[79]</sup> integriert und diese beim Aufteilen registriert. In anderen Systemen verwendete man Farbstoffe oder DNA-Sequenzen <sup>[257]</sup>. Jedoch wurde bisher noch kein Konzept entwickelt, um diesen Nachteil der kombinatorischen Festphasensynthese zu beseitigen.

### **3.5 Pam<sub>3</sub>Cys-OH und Biomimetik**

Biomimetik und Bionik ist die Übertragung, Nachahmung und Anwendung von biologischen und natürlichen Prinzipien in der Technik. Wohl am bekanntesten ist hierbei der Lotos-Effekt. Da auf der mikrostrukturierten Oberfläche weder Staub noch Erde haften kann, reinigt jeder Tropfen Wasser die Lotosblüte und die Blätter. Eine Nachahmung dieser Strukturen findet man heute auf schmutzabweisenden Armaturen und in entsprechender Farbe mit „Lotos-Effekt“.

Bei der Bionik übernimmt man dabei das Funktionsprinzip als solches und transferiert es oft in neue technische Bereiche, wie beispielsweise die Strömungswiderstand senkende „Delphindelle“ die heute bei Sportflugzeugen Einsatz findet. In der Biomimetik versucht man nahezu identische Kopien zumindest bezüglich einer Eigenschaft des natürlichen Originals herzustellen, sei es in chemischer Hinsicht oder in Form oder Struktur.

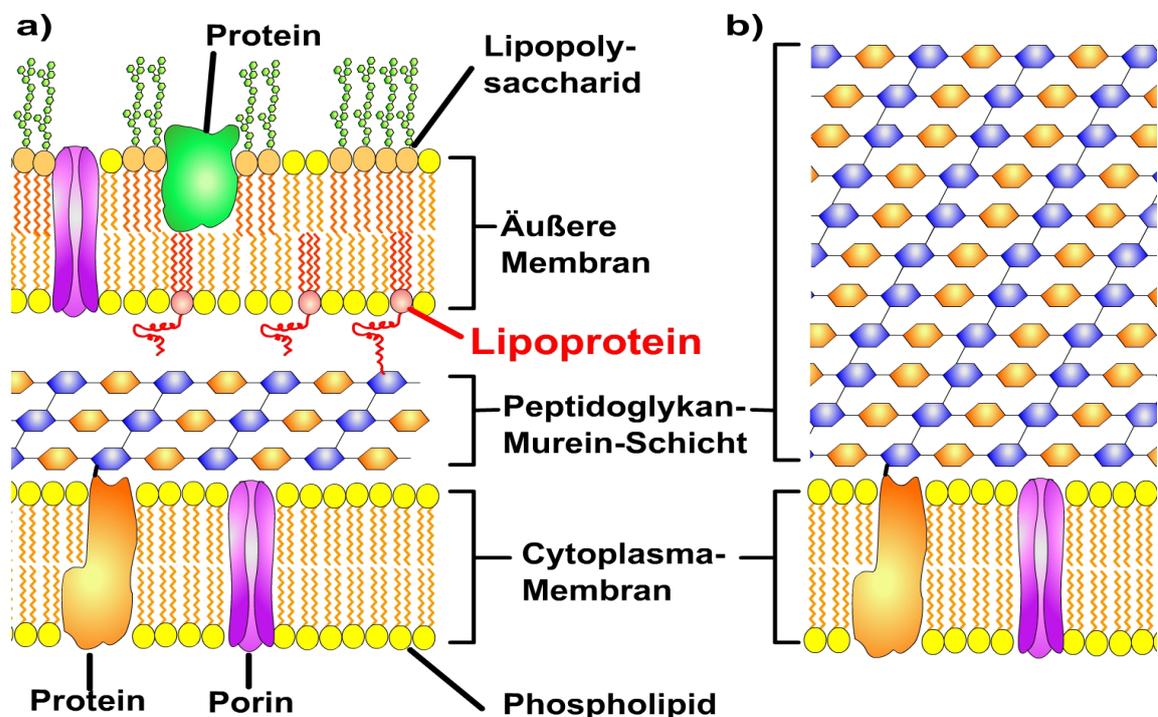
#### **3.5.1 Das Braunsche Lipoprotein**

Membranstrukturen sind in allen biologischen Systemen zu finden. Sie sind sowohl Teil innerer Strukturen wie Mitochondrien und dem Zellkern als auch äußerer Strukturen, wie die Zellmembran, die die Zelle von ihrer Umgebung abschließt. Bakterien sind durch eine komplexe Hülle geschützt. Sie besitzen eine

innere cytoplasmatische Membran, die das Cytosol umschließt und eine mureinhaltige Peptidoglykanschicht.

Je nach der Zusammensetzung der Zellwand und damit auch der Möglichkeit diese anzufärben unterscheidet man nach Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Die Dicke der anfärbaren Peptidoglykanschicht beträgt bei Gram-negativen Bakterien 10-40 nm und kann bei Gram-positiven Bakterien (Abb.3.25b) bis zu 200 nm dick sein. Nur Gram-negative Bakterien besitzen eine weitere äußere Membran, die die Peptidoglykanschicht umschließt und auf der Außenseite hydrophile Lipopolysaccharide enthält (Abb.3.25a).

Bei allen Bakterien vermittelt die äußerste Schicht <sup>[259]</sup> sowohl Löslichkeit und Funktionalität als auch physikalischen Schutz des Bakteriums.



**Abb.3.25: Schema der Bakterien-Zellwand: Gram-negativ (a) und Gram-positiv (b)** <sup>[5]</sup>

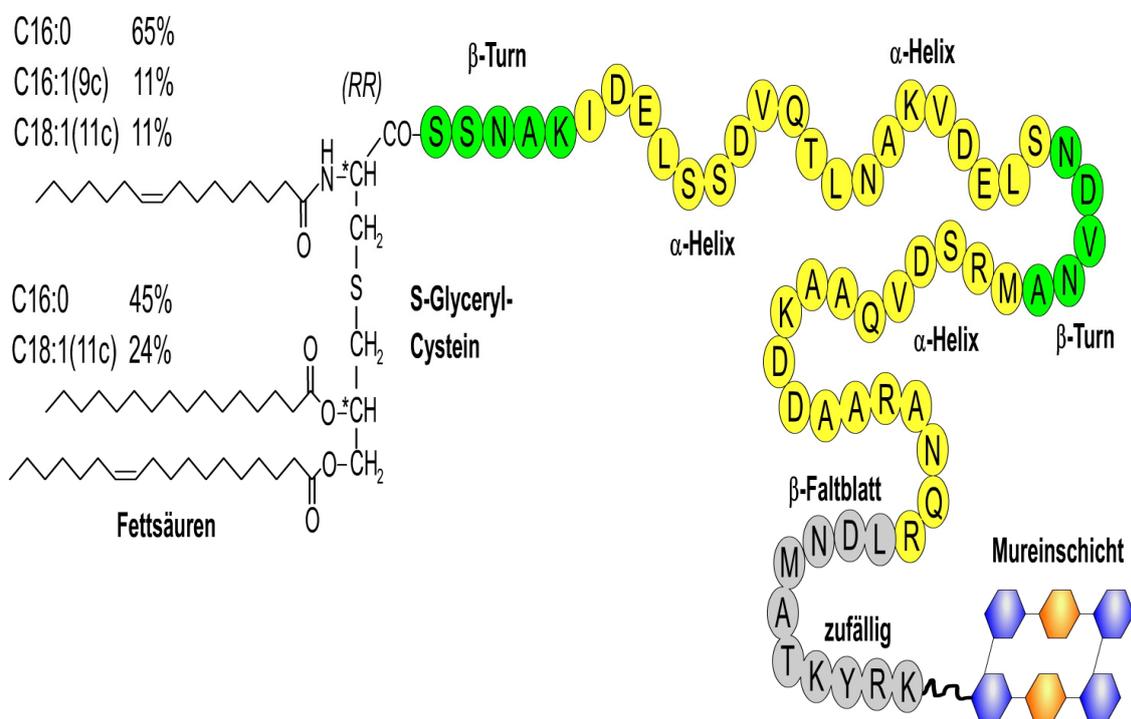
Allen Bakterien besitzen eine innere cytoplasmatische Membran und eine Mureinhaltige Peptidoglykan-Schicht. Bei der Gram-Färbung wird die Mureinhaltige Schicht angefärbt. Diese Schicht bei Gram-negativen Bakterien so dünn, dass die Färbung nicht wahrnehmbar ist.

Zu den bekanntesten Proteinen der äußeren Membran zählt wohl das Murein-Lipoprotein (Braunsches Lipoprotein). Braun isolierte es als erstes Membranprotein 1969 aus dem Bakterium *E. coli* <sup>[12]</sup> und es vergingen einige Jahre bis die Struktur (Abb.3.26) aufgeklärt wurde <sup>[260;261]</sup>.

Das Braunsche Lipoprotein hat eine molare Masse von 7200 D. Der Proteinanteil besteht aus 58 Aminosäuren und kann über die  $\epsilon$ -Aminogruppe seines C-

terminalen Lysin-Rests kovalent mit einer Carboxygruppe eines Diaminopimelinsäure-Rests der Mureinschicht verknüpft werden. Das Lipopeptid liegt in E.Coli in etwas weniger als einer millimolaren Konzentration vor. Obwohl nur ein Drittel des Braunschen Lipoproteins kovalent an die Mureinschicht gebunden ist <sup>[262]</sup>, geht man davon aus, dass es die äußere Membran an die Mureinschicht bindet und zugleich als Abstandshalter fungiert.

Besonders ist, dass in seiner Sequenz weder His-, Trp-, Gly-, Pro- noch Phe-Reste zu finden sind und dass seine Sekundärstruktur einen außergewöhnlich hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil besitzt <sup>[262;263]</sup>.



**Abb.3.26: Das Braunsche Lipoprotein** <sup>[12]</sup>

Das Lipoprotein besitzt 58 Aminosäuren und etwa ein Drittel ist kovalent an die Mureinschicht gebunden.

Strukturell bemerkenswert ist, dass an das N-terminale Cystein eine Fettsäure gebunden und die Thiolgruppe in einer Thioether-Brücke mit einem 2,3-Dihydroxypropyl-Rest verbunden ist, an den wiederum zwei weitere Fettsäuren verestert sind.

Die beiden esterartig an das S-Glycerylcystein gebundenen Fettsäuren sind hauptsächlich Palmitinsäure (45%), cis-Vaccensäure (24%), Cyclopropanhexadecansäure (12%), Palmitoleinsäure (11%) und Cyclopropanoctadecansäure (8%). Die Fettsäuren, die N-terminal an das Cystein gebunden sind, sind vor allem

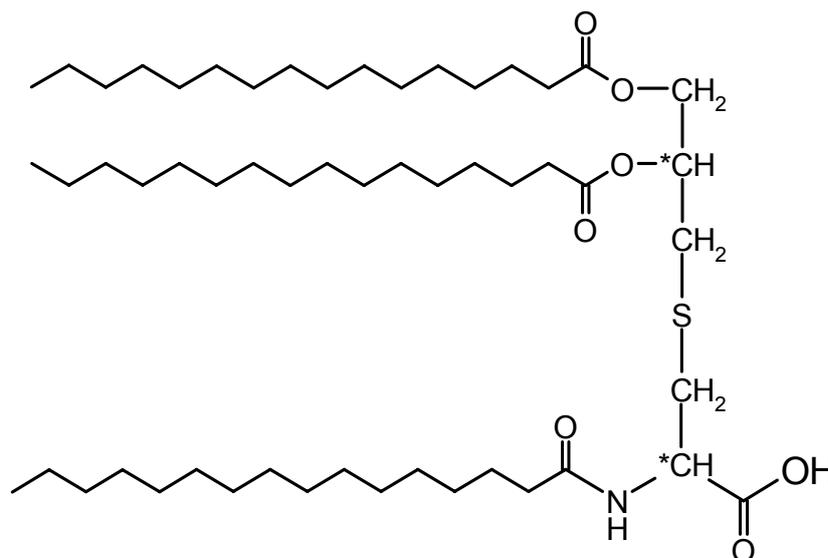
Palmitinsäure (63%), Palmitoleinsäure (11%) und cis-Vaccensäure (11%), also langkettige Fettsäuren <sup>[263]</sup>.

Das Braunsche Lipoprotein ebenso wie viele andere strukturähnliche Lipoproteine sind starke mitogene Stoffe und können bei allen B-Zellen und Makrophagen eine Immunantwort auslösen oder eine beginnende Immunantwort um bis zum Hundertfachen verstärken <sup>[264]</sup>. Der Lipidteil aus den 3 Fettsäuren verankert das Lipoprotein in der äußeren Bakterienmembran. Nicht nur in Gram-negativen, sondern auch in Gram-positiven Bakterien, und aus Zellmembranen von Mycoplasmen und aus der Cytochromuntereinheit des photoreaktiven Zentrums von *Rhodospseudomonas viridis* wurden Lipoproteine isoliert <sup>[265;266]</sup>.

### 3.5.2 Pam<sub>3</sub>Cys-OH

Ein Proteaseverdau von Lipoproteinen lieferte Lipopeptide mit 3-6 Aminosäuren, die ebenfalls mitogene Wirkung zeigten und in ihrer Aktivität vergleichbar zum unverdauten Lipoprotein waren <sup>[263;264;267]</sup>.

Unter Berücksichtigung der Häufigkeit der einzelnen Fettsäuren (3.5.1) wurde der Lipoprotein-N-Terminus als synthetisches Analogon hergestellt <sup>[264;268;269]</sup>. Dabei wurden die Fettsäuren am S-Glycerylcystein-Rest durch Palmitinsäure ersetzt (Abb.3.27).



**Abb.3.27: Struktur von N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-[2RS]-propyl]-[R]-cystein**

Pam<sub>3</sub>Cys-OH ist ein synthetisches Analogon des N-Terminus des Braunschen Lipoproteins. Hierbei wurden alle Fettsäuren durch Palmitinsäure ersetzt.

Wird Pam<sub>3</sub>Cys-OH zu Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser-Asn-Ala, der natürlichen Sequenz des Braunschen Lipoproteins erweitert, so zeigt es eine vergleichbare mitogene Wirkung wie das Braunsche Lipoprotein <sup>[252;270-272]</sup>.

Wird ein nicht immunogenes Peptid, beispielsweise aus dem EGF-Rezeptor, an Pam<sub>3</sub>Cys-OH gekuppelt, so wird man mit diesem Konjugat schon bei einmaliger Immunisierung, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, polyklonale Anti-Peptid-Antikörper (IgM und IgG) erhalten <sup>[273;274]</sup>. Aus dieser Immunisierung wurden monoklonale Antikörper gegen den nativen EGF-Rezeptor erzeugt <sup>[275]</sup>.

Abgesehen von der mitogenen und der immunisierenden Wirkung der Pam<sub>3</sub>Cys-Konjugate zeigt der hydrophobe Anteil der Verbindung weiterhin die Tendenz zur Myzellenbildung und zur Einlagerung in Zellmembranen <sup>[276]</sup> und membranähnliche Vesikel <sup>[277]</sup>.

Weiterhin zeigt es deutliche Interaktionen mit hydrophoben Membranen <sup>[276]</sup> und hydrophoben Oberflächen <sup>[278;279]</sup>. Sollte es also möglich sein, eine entsprechend membranähnliche Umgebung zu schaffen, so kann davon ausgegangen werden, dass sich die Pam<sub>3</sub>Cys-Konjugate in dieser Umgebung über hydrophobe Wechselwirkungen integrieren.

Unter biomimetischen Gesichtspunkten sollte es möglich sein, die Pam<sub>3</sub>Cys-Konjugate als Membrananker zu verwenden, um so die Konjugate in einer Membran zu fixieren.

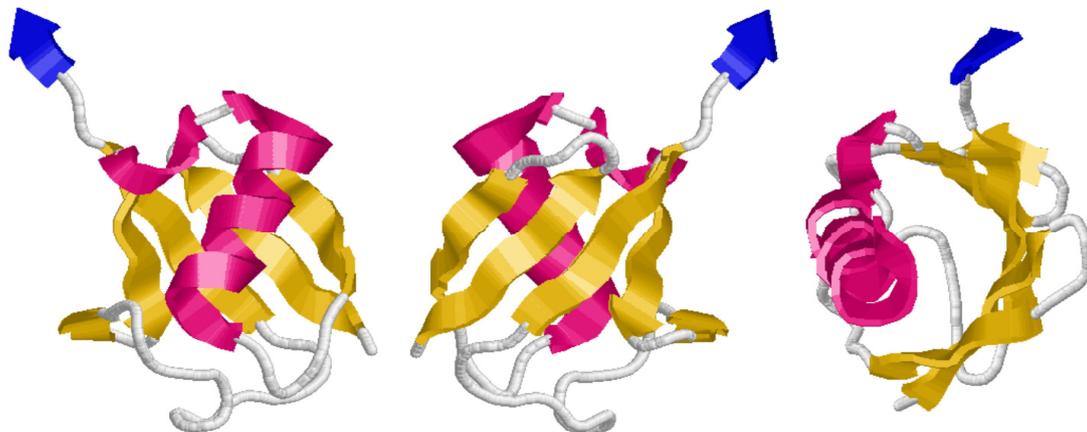
### **3.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)**

Vor der Aufklärung des Ubiquitin-Proteasom-System wurde angenommen, dass der Proteinpool in einer Zelle statisch ist, indem die Zelle ihre Aminosäuren, die sie benötigt, selbst produziert und nicht auf Aminosäuren von außen zurückgreift. Ebenso war es unvorstellbar, dass es ein System geben sollte, das einen gezielten Abbau von zellinternem Protein durchführen kann <sup>[16;17]</sup>. Ende 1970 wurde Ubiquitin entdeckt und erst viel später wurde aufgeklärt, dass Ubiquitin eine zentrale Rolle im Abbau intrazellulärer Proteine besitzt. Man erkannte, dass die Proteinhomöostase auf einem äußerst komplexen und dynamischen Zusammenspiel aus Synthese und gezieltem Abbau ist. Den Entdeckern und Aufklärern des Ubiquitinsystems Aaron Ciechanover, Avram Herkko und Irwin Rose wurde 2004 der Nobelpreis in Chemie verliehen.

### 3.6.1 Ubiquitin – überall zu finden

Ubiquitin wird von dem lateinischen Wort *ubique* abgeleitet und bedeutet „überall“. Es kommt in allen Lebewesen, genauer Eukaryonten, und in einigen Prokaryonten und Archaeen vor. Es ist sowohl in jeder Hefezelle wie auch in jeder einzelnen menschlichen Zelle zu finden.

Ubiquitin (Abb.3.28) besitzt eine molare Masse von 8.600 D <sup>[280]</sup> und besteht aus 76 Aminosäuren. Es hat eine fassartige globuläre Struktur, die sehr wärmebeständig ist, und wird langsam proteolytisch abgebaut. Ubiquitin ist ein sehr starres Molekül. Der einzige flexible Teil des Ubiquitins ist der C-Terminus mit den beiden Glyzinen G75 und G76 <sup>[10]</sup>.



**Abb.3.28: Molekulare Darstellung von humanem Ubiquitin <sup>[10]</sup>**

Ubiquitin hat eine molare Masse von 8,6 kD und besteht aus 76 Aminosäuren. Alle Säugerubiquitine zeigen eine fast identische Aminosäuresequenz und entsprechend dieselbe Struktur. Es ist ein kleines, hitzestabiles, globuläres Molekül, das über 5  $\beta$ -Faltblätter (ocker) und 2  $\alpha$ -Helices (magenta) verfügt. Der C-Terminus mit 2 Glycinen (blau) wird an andere Proteine geknüpft. Die 5 Faltblätter und die längere Helix bilden eine fassartige Struktur, die die Stabilität des Ubiquitins bedingt. Die Abbildung wurde mit dem pdb-File 1XD3 erstellt.

Noch vor Cytochrom C, dem Zentralmolekül in der Energieerzeugung und Oxidation, ist Ubiquitin das konservierteste Protein auf diesem Planeten. Beispielsweise unterscheidet sich das Ubiquitin des Menschen von dem der Hefe (oder dem der Karotte) in nur 3 Aminosäuren. Heute sind an nur 6 Aminosäurepositionen im Ubiquitin insgesamt 17 Aminosäurepositionen bekannt. Seit dem „gemeinsamen“ Vorfahren der Hefe, der Karotte und des Menschen hat sich die Aminosäuresequenz des Ubiquitins damit um nur 4% verändert, was für Ubiquitin eine Mutationsrate von etwa einer Aminosäure pro 1.000.000.000 Jahre bedeutet.

Diese geringe Mutationsrate zeigt deutlichst, welche essentielle Wichtigkeit Ubiquitin in der Chemie des Lebens besitzt <sup>[280;281]</sup>. Hinzu kommt, dass heute mehr als 1000 Enzyme bekannt sind, die mit Ubiquitin interagieren. Dies entspricht ein paar Prozent des gesamten Proteinpools der Zelle <sup>[17;282]</sup>. Hieran kann man die fundamentale Rolle des Ubiquitins in der Zelle erkennen.

### **3.6.2 Die biochemische Rolle des Ubiquitins und die E-Familien**

Trotz seiner enormen Wichtigkeit in der Zellhomöostase und in der Regulierung des Proteinpools blieb die Bedeutung von Ubiquitin lange Zeit unerkant. Es wurde anfangs sogar als „extrem unwichtig“ eingestuft <sup>[16;283-286]</sup>.

Ubiquitin ist in eine Vielzahl grundsätzlicher biologischer Prozesse involviert. Hierzu zählen bisher die Bereiche der Kontrolle der Zellteilung, Signal-Transduktion, Regulation der Transkription, DNA-Reparatur-Mechanismen, „Qualitätskontrolle“ der Proteinsynthese im Endoplasmatischen Retikulum, Stress-Regulation, Induktion und Regulation von Immunantworten <sup>[287;288]</sup> und Entzündungsreaktionen <sup>[289]</sup>, Apoptose, embryonale Entwicklungsstufen und die circadiane innere Uhr, um nur einige wenige Hauptbereiche aufzulisten <sup>[16;17]</sup>.

Die Hauptfunktion von Ubiquitin ist seine Verwendung als Marker im intrazellulären Proteinabbau. Kovalentes Anbinden eines Ubiquitins an ein Protein terminiert dieses zum Abbau im 26S Proteasom <sup>[290;291]</sup>. Wie schnell und über welche Zwischenstadien dieser Abbau erfolgen wird, hängt allerdings noch von der Anknüpfung weiterer Ubiquitine ab <sup>[292-296]</sup>.

1980 wurde erkannt, dass Ubiquitin über eine Isopeptidbindung kovalent an das abzubauen Protein geknüpft wird. In einem energieverbrauchenden Prozess wird Ubiquitin mittels ATP aktiviert. Initial bildet sich eine extrem energetische Übergangsverbindung, ein Acyladenylat zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und AMP unter Freisetzung von Pyrophosphat. Dieser Übergangszustand kann nicht zufällig ohne Hilfe eines enzymatischen Aktivierungssystems entstehen oder substratspezifisch übertragen werden, da der Energiegehalt dieser Verbindung extrem hoch ist <sup>[297-300]</sup>.

Bereits zwei Jahre später wurde das erste Ubiquitin-aktivierende Enzym isoliert und charakterisiert. Es aktiviert Ubiquitin in ähnlicher Weise wie die Aminoacyl-

tRNA-Synthetase <sup>[301]</sup>. Heute werden alle Ubiquitin-aktivierende Proteine dem Enzym E1 zugeordnet.

Bei der Ubiquitinaktivierung wird zunächst das C-Terminale G76 des Ubiquitins zum Monophosphat-Acyladenylat-Ester aktiviert und dann auf ein Cystein des aktivierenden E1-Enzym unter Abspaltung von AMP selbst übertragen. Energetisch steht die Ubiquitinierungsreaktion also gleichauf mit der DNA-Polymerasereaktion.

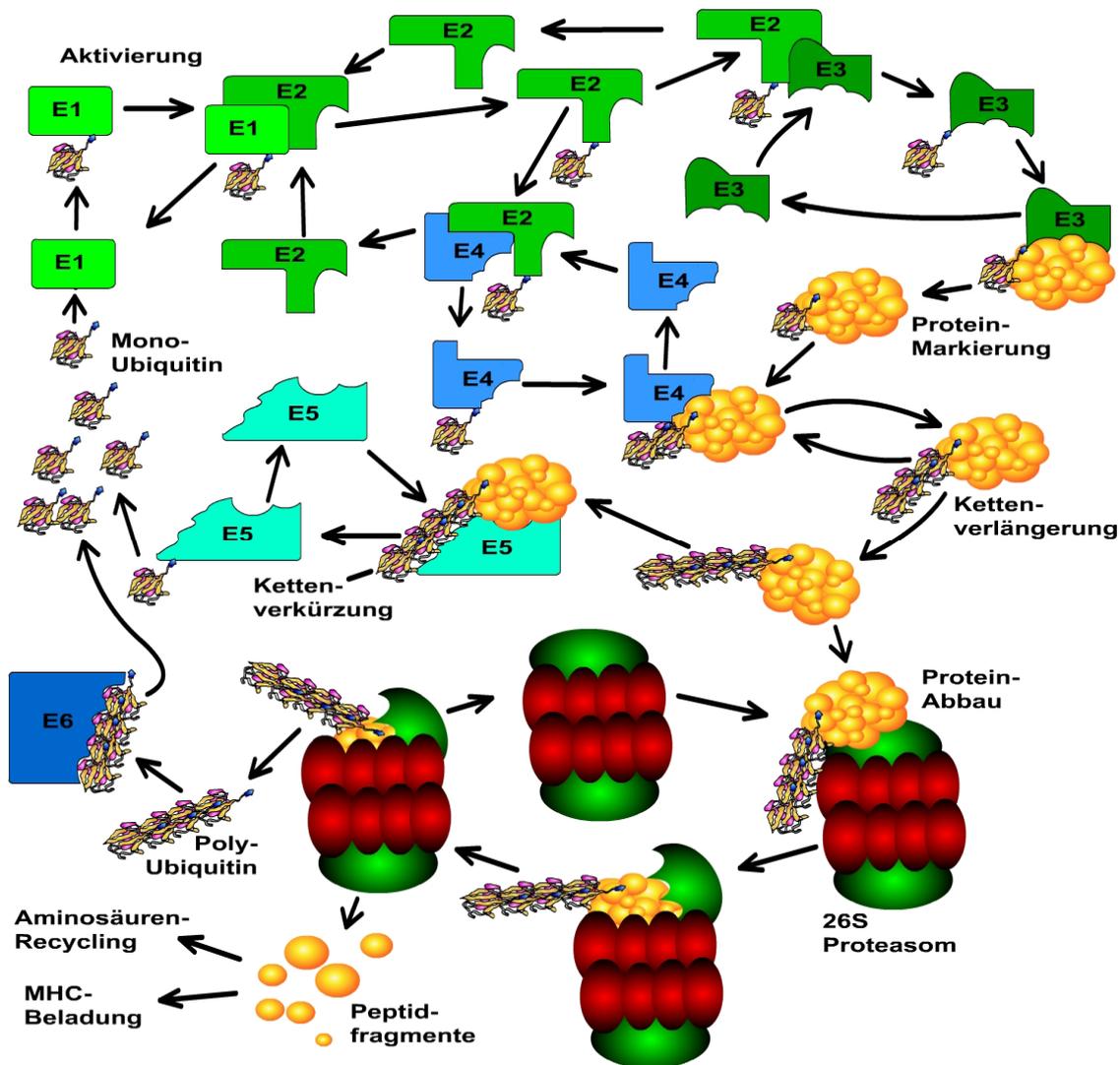
Aus chemischer Sicht ist schon dieser E1/Ubiquitin-Thiolester kompetent genug, um auf nahezu jede Aminogruppe transferiert zu werden. Dies geschieht auch bei der nicht-ribosomalen Polypeptidsynthese, die etwa zeitgleich zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) entdeckt wurde <sup>[302]</sup>.

Jedoch erwies sich die Ubiquitinaktivierung sehr komplex (Abb.3.29). Nach und nach wurde zunächst entdeckt, dass Ubiquitin über Enzyme der Familie E1 aktiviert wird. Diese werden dann auf Ubiquitin-Träger-Proteine der Familie E2 übertragen, die ihrerseits das Ubiquitin auf Ubiquitin-Ligase-Proteine der Familie E3 übertragen. Dabei wird jeweils der Thiolester mit dem Ubiquitin erhalten und von einem Protein zum anderen weitergereicht. Erst die E3-Proteine übertragen dann das Ubiquitin auf die abzubauenen Proteine. Hierbei wird dann kein Thiolester gebildet sondern eine Peptidbindung, die entweder über den N-Terminus des Zielproteins oder über eine  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins etabliert wird.

Den E3-Proteinen fällt somit die Substratspezifität zu, wohingegen die E2-Proteine für die Regulierung und Aktivierung verschiedener E3-Subfamilien zuständig sind. An die Lysine des ersten Ubiquitins, das an ein Protein gebunden wurde, werden nun mittels eines Enzyms aus der E4-Familie weitere Ubiquitine kovalent gebunden. Es entsteht eine Polyubiquitinkette. Je nach dem über welche Lysine des Ubiquitins die Polyubiquitinkette aufgebaut wird, entscheidet sich das Schicksal des markierten Proteins. Diese „Etikettierung“ kann vom Abbau, über weitere Modifikationen bis hin zum Erhalt des Proteins führen. Weiterhin wird das Protein, je nach Form und Länge der Polyubiquitinkette, in verschiedene Kompartimente der Zelle transferiert <sup>[303]</sup>. Zumeist endet jedoch die Reise des markierten Proteins am 26S Proteasom, in dem es abgebaut wird. Das Polyubiquitin wird dabei abgespalten und in das Cytosol entlassen.

Zwei weitere Familien ergänzen und komplettieren die E-Familien. Die E5-Familie enthält Deubiquitinierungs-Enzyme, die entweder ein Ubiquitin oder eine komplette Polyubiquitinkette entfernen oder diese innerhalb eines Proteins auf einen anderen Aminosäurerest übertragen.

Die Enzyme der E6-Familie zerlegen schließlich die Polyubiquitinketten, die nach dem Proteinabbau im Proteasom freigesetzt werden, wieder in einzelne Ubiquitine. Hierdurch schließt sich dann der Kreis für das Ubiquitin <sup>[304-307]</sup>.

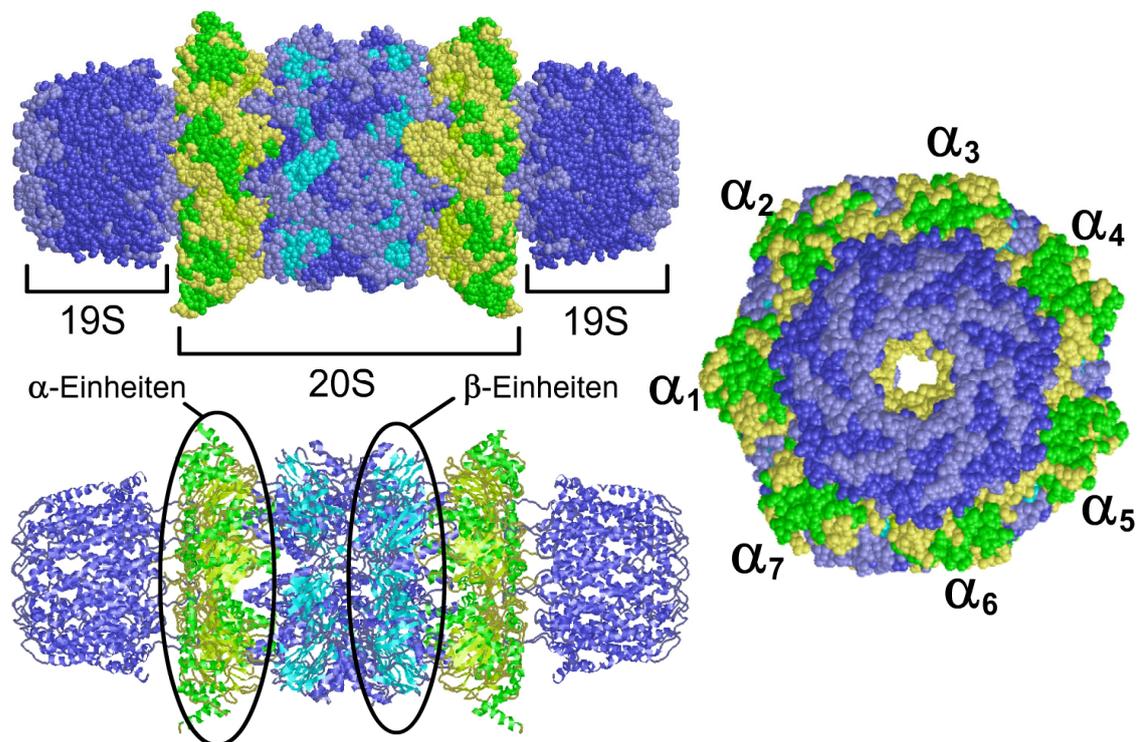


**Abb.3.29: Der Ubiquitin-Konjugations-Pathway**

Ubiquitin wird zunächst unter ATP-Verbrauch und Pyrophosphat-Abspaltung aktiviert und von E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) auf sich selbst übertragen. Dann an E2 (Ubiquitin-Träger-Enzym) und letztendlich an E3 (Ubiquitin-Ligase-Enzym) übertragen. Der Transfer von Ubiquitin findet stets über das C-Terminale G76 des Ubiquitins und dem Thiol eines Cysteins des Trägerproteins aus den E-Familien unter Bildung eines Thioesters statt. Erst am „Zielprotein“ wird das Ubiquitin in Form einer Peptidbindung gebunden. E4-Proteine verlängern die Ubiquitinkette, E5 verkürzen sie. Sobald die Polyubiquitin eine bestimmte Länge erreicht hat wird das so markierte Protein im Proteasom abgebaut. E6-Proteine zerlegen freie Polyubiquitinketten in Monoubiquitine. Die Abbildung wurde nach <sup>[16;17]</sup> modifiziert.

Das 26S Proteasom (Abb.3.30) ist ein Multienzym-Komplex, das je nach Spezies eine Molekularmasse zwischen 1.500.000 und 2.500.000 D besitzt und aus insgesamt 64 Untereinheiten besteht. Man unterteilt das 26S Proteasom in das katalytisch aktive 20S Proteasom und die beiden 19S Deckel-Kontrolleinheiten <sup>[308-312]</sup>.

Die proteolytisch aktive 20S Proteasom-Einheit ist in Eukaryonten <sup>[309]</sup>, Prokaryonten <sup>[313]</sup> oder Archaeen <sup>[314;315]</sup>, also in allen Lebewesen dieses Planeten, zu finden und besteht aus insgesamt 28 Untereinheiten, jeweils 14  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten. Die Untereinheiten lagern sich zu heptameren Ringen zusammen, die sich wiederum zum fassförmigen 20S Proteasom in der Stöchiometrie  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  zusammenlagern. Die  $\alpha$ -Ringe besitzen ATPase-Aktivität und die  $\beta$ -Ringe sind die proteolytisch aktiven Zentren. Im Falle von Prokaryonten sind nahezu alle  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten identisch, bei Eukaryonten sind alle 7  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten unterschiedlicher Natur.



**Abb.3.30: Aufbau des 26S Proteasoms** <sup>[21;22]</sup>

Das 26S Proteasom besteht aus einem fassförmigen, katalytisch aktiven 700 kD schweren 20S Proteasomkern und ein bis zwei 19S Deckel-Kontrolleinheiten. In der 20S-Einheit werden Proteine in 7 bis 8 Aminosäuren lange Peptide zerlegt. Die 19S Deckel-Einheiten schützen vor zufälliger Proteolyse, indem sie nur Proteine, die mit einem Polyubiquitin markiert sind, in das Proteasom leiten. Das Protein wird entfaltet, in das Proteasom eingefädelt und dort abgebaut. Die Polyubiquitinkette selbst wird abgespalten und unabgebaut in das Cytosol entlassen. Seitansicht (links), Blick ins Proteasom (rechts). Die Abbildung wurde mit dem PDB-File 1FNT generiert.

Trotz dieses unterschiedlichen Aufbaus zwischen Pro- und Eukaryonten erzeugt das 20S Proteasom zumeist Peptide von 7 bis 8 Aminosäuren Länge. Diese Länge ist unabhängig sowohl von der Anzahl, Anordnung oder dem Abstand der aktiven proteolytischen Zentren des Proteasoms als auch der Aminosäuresequenz des abgebauten Proteins <sup>[306;316]</sup>. Nach dem Abbau wird ein Großteil dieser kurzen Peptide weiter in Aminosäuren zerlegt. Ein kleiner Anteil dieser Peptide wird auf MHC-Klasse I Rezeptoren <sup>[317-319]</sup> gebunden und dient dem adaptiven Immunsystem als Kontrolle des zellinternen Proteinpools <sup>[151]</sup>. Durch die Gegenwart von Interferon  $\gamma$  oder dem PA28-Aktivator (über den nur Lebewesen mit adaptiven Immunsystem verfügen) kann das Schnittverhalten des Proteasoms modifiziert werden, wodurch andere Peptidstücke entstehen. Hierdurch ergibt sich eine andere Beladung der MHC I Rezeptoren und damit ein verändertes antigenes Muster.

Die 19S-Deckel-Kontrolleinheit versiegelt unter ATP-Verbrauch die aktive 20S-Einheit und schützt so den Proteinpool vor zufälligem Abbau durch das 26S Proteasom <sup>[320]</sup>. Die Deckeleinheit besteht aus 18 Untereinheiten, deren Struktur und Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist <sup>[321]</sup>. Ebenso ist noch nicht geklärt, wie ein Protein durch die Deckel-Kontrolleinheit in das Innere des 20S-Proteasoms befördert wird. Bisher wurden 6 Untereinheiten als ATPasen identifiziert, die für die Anbindung an das 20S Proteasom notwendig sind <sup>[309;310;322]</sup>.

Weitere 8 Untereinheiten bilden zusammen eine Struktur, die Polyubiquitinketten erkennt und das daran gebundene Protein, dann wie ein „reverses Chaperon“ entfaltet und in das katalytische Zentrum befördert. Während des „Einfädels“ spaltet eine weitere Untereinheit die Polyubiquitinkette ab und entlässt sie ins Cytosol <sup>[304]</sup>. Das 26S Proteasom ist nur aktiv, wenn es über eine Polyubiquitinkette aktiviert wurde und ohne die Polyubiquitinkette findet kein Abbau im 26S Proteasom statt <sup>[323]</sup>.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte und Software

Bei allen Geräten wurde die jeweils mitgelieferte Software verwendet.

Plasmareinigung	Plasma System 100 TePla AG ( <a href="http://www.tepla.com">www.tepla.com</a> ), Deutschland
Kontaktwinkelmessung	KSV CAM 200 KSV instruments ( <a href="http://www.ksvinc.com">www.ksvinc.com</a> ); USA
Mikropipettier-Roboter	GESIM Nanoplotter 2.0 GESIM, Dresden, Deutschland
Epifluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 100 Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Laser-Scanning	LSM510 Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FCS-Mikroskop	Confocor 2 Zeiss, Oberkochen, Deutschland
RiFS-Messungen	Eigenbau Arbeitskreis Gauglitz, Tübingen, Deutschland
Isothermale Kalorimetrie	Thermal Activity Monitor TAM2277 Thermometrics AB, Järfälla, Sweden
NMR-Messungen	Bruker DRX 600 Brucker Daltoniks, Bremen, Deutschland
Metamorph	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland
Image Pro Plus	Media Cybernatics, Silver Springs, USA
ELISA-Reader	SpectraMax 340 Molecular Devices, Albersville, USA
Kontaktbelichter	Proximitybelichter Karl Suss GmbH, Deutschland
ESI-MS	VG Quattro II Fisons Instruments, England
HPLC-MS	HPLC MS NGM11

	Micromass (MS), Gilson (HPLC)
HPLC (präparativ)	RP-C18, Reprosil 100, C18, 5 µm, 125 x 20 mm Dr. Maisch GmbH, Deutschland
CCD-Kamera	Sensicam 1200 PCO Computer Optics, Kelheim, Deutschland
Ultraschall-Lanze	Sonoplus GM70 Bandelin GmbH, Berlin, Deutschland
Reinraumanlagen	Daltrop, Deutschland

#### 4.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Standardchemikalien wie Lösungsmittel, Salze, Kupplungsreagenzien und Farbstoffe wurden sofern nicht anders beschrieben als Feinchemikalien bei Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz), Senn Chemicals (Dielsdorf, Schweiz), and Orpegen Pharma (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Aminoslides	Nunc, ArrayIt, BD Biosciences, Genetix
Silane	ABCR Research Chemicals, Deutschland
Hydrophobe Träger	IMPLEN, München, Deutschland
Fmoc-Aminosäuren	Novabiochem, Heidelberg, Deutschland
Fmoc-Ado	Neosystem, Straßburg, Frankreich
Synthescharze	Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland
S0387	FEW, Wolfen, Deutschland
Fluoreszenzfilter	AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland Chroma, Deutschland
FCS-Mikrotiterplatten	Molecular Machines & Industries AG, Glattbrugg, Schweiz
Pam <sub>3</sub> Cys-OH	EMC microcollections GmbH, Deutschland
ELF-97-Phosphat	Molecular Probes, Deutschland
PDMS (Sylgard 184)	Dow Corning Chemicals, England
Photolithographische Maske	ML&C GmbH, Jena, Deutschland
Aluminiumlegierungen	Klett Aluminiumtechnik, Dußlingen, Deutschland
Tesafilm	in jedem Schreibwarenladen

Streptavidin-HRP	Pierce, Bonn, Deutschland
Primärer IL8-Antikörper	clone G265-5, BDPharMingen, San Diego, USA
Sekundärer IL8-Antikörper	clone G265-8 BDPharMingen, San Diego, USA
RPMI 1640 Medium	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
TMB	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
10 x PBS-Puffer	Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Rekombinanter IL8 Standard	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Tris	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland Greiner, Fracht, Deutschland
Siebdrucknetze	Koenen GmbH, Ottobrunn, Deutschland Bopp und CoAG, Zürich, Schweiz Spörl KG, Sigmaringendorf, Deutschland

### 4.1.3 Puffersysteme und Lösungen

#### PBS-Puffer

- 1:10 Verdünnung des 10 x PBS-Puffers mit Wasser

#### Block-Puffer

- 4% BSA (w/v) in PBS-Puffer

#### Waschpuffer

- 6,06 g Tris
- 200 µl Tween20
- Auffüllen auf 1000 ml
- Einstellen auf pH 8,0

#### AP-Puffer

- 9,0 g NaCl
- 1,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 150 µl Tween 20
- Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml, pH 9,0

#### Kaisertest

- Lösung A: 0,66 mg KCN, 1 ml H<sub>2</sub>O, 49 ml Pyridin
- Lösung B: 2,5 g Ninhydrin, 50 ml n-Butanol
- Lösung C: 20 g Phenol, 40 ml n-Butanol

#### 4.1.4 Zellkultur

THP-1

ATCC Nummer: TIB-202)

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Braunschweig, Germany)

### 4.2 Allgemeine Methoden

Diese Methoden wurden in allen Teilbereichen der Doktorarbeit verwendet.

#### 4.2.1 Peptidsynthesen

Die Peptidsynthesen wurden mit Fmoc/Boc-Schutzgruppen-Chemie durchgeführt [112;246;247].

##### 4.2.1.1 Vorquellen der Beads

Synthesebeads mit 20 µm Durchmesser zeigten ein anderes Verhalten während der Synthesen als die üblicherweise verwendeten 90-130 µm durchmessenden Beads. Um die Reaktivität der 20 µm Beads komplett zu aktivieren, wurden diese aus dem trockenen Zustand mit 80% DM und 20% DCM für 15 min vor einer Reaktion inkubiert.

##### 4.2.1.2 Kupplung von Fmoc-Aminosäuren

Für die Synthese wurden Fmoc-Aminosäuren eingesetzt. Für die Kupplungsvorschrift gilt allgemein:

- 3 eq. Fmoc-Aminosäure
- 3 eq. Isopropylcarbodiimid (DIC)
- 3 eq. 1-Hydroxybenzotriazol Monohydrat (HOBT)
- 3 eq. N,N'-Diisopropylethylenamin (DIPEA)
- Lösen in DMF mit Endkonzentration von mind. 0,3 M
- 90 min Inkubationszeit
- 8 x Waschen mit DMF

Mit einem Kaiser-Ninhydrin-Test kann die Vollständigkeit der Kupplung geprüft werden.

#### 4.2.1.3 Kupplung von Pam<sub>3</sub>Cys-OH

- 2 eq. Pam<sub>3</sub>Cys-OH gesättigt in DCM lösen
- 3 eq. Isopropylcarbodiimid (DIC) zusammen mit
- 3 eq. 1-Hydroxybenzotriazol Monohydrat (HOBT) gesättigt in DMF lösen
- Mischen der beiden Lösungen und Inkubation für 5 min
- trockenes Harz mit der Lösung überschichten und Inkubation für 12 h bei 30°C
- Waschen 3 x DCM, 3 x DMF, 3 x Diethylether, 3 x DMF

Mit einem Kaiser-Ninhydrin-Test kann die Vollständigkeit der Kupplung geprüft werden.

#### 4.2.1.4 Kupplung von Farbstoffen

Die Verbindungen wurden mit Farbstoffen wie 5/6-Carboxyfluorescein, 5/6-Carboxy-TAMRA, S0387 aber auch Biotin markiert.

- 2 eq. Farbstoff
- 3 eq. Isopropylcarbodiimid (DIC)
- 3 eq. 1-Hydroxybenzotriazol Monohydrat (HOBT)
- 3 eq. N,N'-Diisopropylethylenamin (DIPEA)
- Lösen in DMF/DCM (50:50) mit Endkonzentration von mind. 0,3 M
- 4 h Inkubationszeit
- Waschen 4 x DMF, 4 x DCM

Dies stellt wieder einen negativen Kaiser-Ninhydrin-Test dar.

#### 4.2.1.5 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Durch Zugabe von 30% Piperidin in DMF wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

- 500 µl 30% Piperidin für 5 min
- 1 x Waschen mit DMF
- 500 µl 30% Piperidin für 10 min
- 8 x Waschen mit DMF

Ein positiver Kaiser-Ninhydrin-Test bestätigt das Vorhandensein einer NH<sub>2</sub>-Gruppe und damit die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

#### 4.2.1.6 Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe

Die Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe<sup>[324]</sup> wird unter Schutzgas durchgeführt.

- 2 eq. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> gelöst in DCM/Essigsäure/Morpholin (92.5 : 5 : 2.5)
- Inkubation des Harzes unter Schütteln für 2 h
- Waschen 6 x DCM, 6 x DMF, 6 x DCM, 6 x Methanol und 6 x DMF

Ein positiver Kaiser-Ninhydrin-Test bestätigt das Vorhandensein einer NH<sub>2</sub>-Gruppe und damit die Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe.

#### 4.2.1.7 Abspaltung der Seitenschutzgruppen auf dem Harz

Nach Ende der Synthese werden die Seitenschutzgruppen entfernt.

- Inkubation mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (95 : 2,5 : 2,5) für 90 min
- Waschen mit 4 x DCM, 4 x DMF, 4 x Wasser, 4 x Ether
- Suspendieren der Beads in warmen tBu-OH (60°C)
- Ultraschall für 5 min und Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff
- Lyophilisieren für 40 h

Die so erhaltenen Beads werden licht- und feuchtigkeitsgeschützt gelagert.

#### 4.2.1.8 Abspaltung vom Harz mit UV-Licht

Im Falle der LIPODOT-Verbindungen werden diese mit UV-Licht abgespalten.

- Suspendieren der Beads in tBu-OH/Wasser (80:20)
- unter Rühren für 90 min mit UV-Licht bestrahlen
- Filtrat auffangen und Beads erneut in 80% tBu-OH und 20% Wasser suspendieren
- unter Rühren für 90 min mit UV-Licht bestrahlen
- Filtrate vereinigen und lyophilisieren

Das erhaltene Pulver wird trocken und lichtgeschützt gelagert.

#### 4.2.1.9 Abspaltung vom Harz mit Säure

Falls kein Photolinker bei der Synthese verwendet wurde, werden die Peptide vom Harz abgespalten und parallel dazu die Seitenschutzgruppen entfernt.

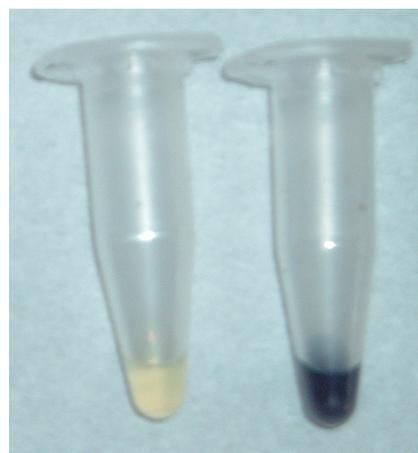
- Inkubation mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (95 : 2,5 : 2,5) für 90 min
- Filtrat in Ether aufnehmen (Peptide fallen aus) und abzentrifugieren
- 2 x Zentrifugat mit Ether waschen und jeweils abzentrifugieren
- Zentrifugat in tBu-OH/Wasser (80:20) lösen und lyophilisieren.

So kann das Peptid gekühlt gelagert und portioniert werden.

#### 4.2.1.10 Kaiser-Test

Der Kaiser-Test ist eine empfindliche Farbreaktion (Abb.4.1) zum Nachweis von freien Aminogruppen und wird jeweils zur Überprüfung einer vollständigen Kupplung oder Freisetzung verwendet.

- Vorlegen des Syntheseharzes in einem Eppendorf-Cup
- Zugabe je eines Tropfens der Lösungen A, B und C und gutes Durchmischen
- Erhitzen auf 105°C für 10 min
- Überprüfen der Farbreaktion



**Abb.4.1: Färbung des Kaiser-Tests**

Negative Reaktion (links),  
Positive Reaktion (rechts)

Eine vollständige Kupplung mit einer Fmoc-Aminosäure ergibt einen negativen (leicht gelblichen) Kaisertest. Nach einer Entschützung der Aminogruppe wird der Kaisertest positiv (tief dunkelblau).

#### 4.2.1.11 Aufreinigung

Die hergestellten Verbindungen zeigten als Rohprodukt zwischen 80% und 95% Reinheit. Sofern dieser Reinheitsgrad nicht ausreichte wurde die Verbindung mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

#### 4.2.1.12 Analytik der Verbindungen

Die Analytik der Verbindungen wurde mit ESI-MS oder HPLC-MS durchgeführt. Hierfür wurden die Verbindungen in einem Gemisch aus ACN/MeOH (97,5:2,5) gelöst und 100 µl für die Analytik verwendet.

### 4.2.2 Mikroskopie

#### 4.2.2.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Für die Epifluoreszenz wurde ein Axiovert 100 M (Zeiss) zusammen mit der mitgelieferten Software Axiovision 3.2 (Zeiss) verwendet. Für die Bildaufnahme wurde eine Sensicam 1200 und als Lichtquelle eine Quecksilberdampfampe verwendet. Ein vollautomatischer, sowohl über die Software als auch manuell steuerbarer, xy-Tisch (Merzhäuser, Deutschland) liefert an die Software eine Positionsangabe. Als weitere Software wurden Metamorph und Image Pro Plus verwendet. Zusätzlich wurden zu Metamorph kompatible Softwaremodule für automatische Positionierung, Bilderfassung und Einscannen entwickelt\*.

<u>Filtersätze</u>	Anregungsfilter	Strahlteiler	Emissionsfilter
Fluorescein	HQ470/40	Q495LP	HQ525/50
Rhodamin	HQ548/10	Q565LP	HQ610/75
S0387	HQ620/60	Q660LP	HQ700/75
ELF-97	D350/50	400LP	420LP
Beads	D350/50	450LP	500LP

#### Objektive

5-fach	Plan Neofluar 5 x NA 0,15
10-fach	Plan Neofluar 10 x NA 0,3 (DIC I)
20-fach	Plan Neofluar 20 x NA 0,5 (DIC II)
40-fach	C-Apochromat 40 x NA 0,75 (DIC II)
63-fach	Plan-Apochromat 63 x NA 1,4

---

\* Umsetzung der Programmkonzepte durch Frau Regina Bohnert (Arbeitsgruppe Priv. Doz. Brock, Tübingen)

#### 4.2.2.2 Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde mit einem invertierten LSM510 Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Deutschland) verwendet. Für die Anregung der Fluorophore standen ein HeNe-Excimer-Laser und ein Argonionenlaser zur Verfügung.

Aufgrund der komplexen Optik war es mit diesem Instrument möglich, bis zu 3 Fluorophore parallel zu detektieren. Die Anregungslaser wurden stets parallel eingekoppelt.

##### Filtereinstellungen

Fluorescein	HFT UV/488/543/633 Strahlteiler in Kombination mit einem NFT 545 Strahlteiler und einem BP 505-530 Bandpassfilter
Rhodamin	HFT UV/488/543/633 Strahlteiler in Kombination mit einem NFT 635 Strahlteiler und einem BP 560-615 Bandpassfilter
S0387	HFT UV/488/543/633 Strahlteiler in Kombination mit einem LP650 Langpassfilter
ELF-97	HFT UV/488/543/633 Strahlteiler in Kombination mit einem NFT 545 Strahlteiler und einem BP 560-615 Bandpassfilter
Beads	HFT UV/488/543/633 Strahlteiler in Kombination mit einem NFT 545 Strahlteiler und einem LP650 Langpassfilter

##### Objektive

5-fach	Plan Neofluar 5 x NA 0,15
10-fach	Plan Neofluar 10 x NA 0,3 (DIC I)
20-fach	Plan Neofluar 20 x NA 0,5 (DIC II)
40-fach	C-Apochromat 40 x NA 0,75 (DIC II)
63-fach	Plan-Apochromat 63 x NA 1,4

#### 4.2.2.3 FCS-Mikroskopie

Das Epifluoreszenz-Mikroskop (4.3.2.1) verfügte über ein FCS-Modul, das dieselben Filtersätze und Objektive nutzte. Zur Anregung standen ein Argon- und ein HeNe-Excimer-Laser zur Verfügung. Sämtliche Berechnungen wurden mit der ausgelieferten Software durchgeführt.

<u>Filtersätze</u>	Anregung	Strahlteiler	Emissionsfilter
Fluorescein	488 nm Argon	HFT488	HQ525/50
Rhodamin	543 nm HeNe	HFT 488/543	HQ610/75
S0387	488 nm Argon	HFT488	HQ525/50

### Justage des Pinholes

Zur Erzeugung eines konfokalen Volumens musste das Pin-Hole nach jedem Neustart des Mikroskops justiert werden.

- Vorlegen einer konzentrierten Fluorophorlösung
- Wiederholte Variation der x- und y-Position des Pinholes bis zum Erreichen eines maximalen Detektorsignals
- Variation der z-Position zur Maximierung des Signals

### Einstellung der Fluorophor-Konzentrationen

Für die Messung wurden jeweils 15  $\mu$ l Lösung in einer 384-Well-Platte (MMI, Zürich, Schweiz) vorgelegt. Lösungen mit Fluorophoren oder Fluorophor-gelabelten Verbindungen wurden nun vorvermessen, um die mittlere Anzahl der Fluorophore im konfokalen Detektionsvolumen zu bestimmen. Entsprechend der Ergebnisse wurden die Lösungen so verdünnt, dass im zeitlichen Mittel noch 1-2 Fluorophore im Detektionsvolumen vorlagen, um eine entsprechend hohe Autokorrelation zu erhalten.

### Ermittlung des konfokalen Volumens und der Fluorophoreigenschaften

Diese Werte wurden zuerst ermittelt, um spätere Autokorrelationsauswertungen mit weniger Variablen bezüglich des Fluorophors und des konfokalen Volumens berechnen zu können.

- Fokussierung des Lasers auf 200  $\mu$ m oberhalb des Wellbodens
- 10 Messungen des ungebundenen Fluorophors für je 45 s
- Autokorrelation und Berechnung der Fluorophoreigenschaften wie Triplettzustand, Quantenausbeute, Anzahl der Fluorophormoleküle und der Diffusionszeit  $\tau_D$  und Maße des konfokalen Volumens

Diese Werte werden für alle weiteren Messungen und Berechnungen konstant gehalten.

### FCS-Messung

Alle Messungen und Versuche wurden als 3-fach Bestimmung durchgeführt.

- Fokussierung des Lasers auf 200  $\mu\text{m}$  oberhalb des Wellbodens
- 10 Messungen der fluoreszenten Verbindung für je 45 s
- Autokorrelation und Berechnung der Diffusionszeit  $\tau_D$ , Triplettzustand, Quantenausbeute, Anzahl der Fluorophormoleküle unter Beibehaltung der zuvor ermittelten Werte des konfokalen Volumens
- Zugabe des Interaktionspartners und Durchmischen des Volumens
- 10 Messungen der fluoreszenten Verbindung für je 45 s
- Autokorrelation und Berechnung der Diffusionszeit  $\tau_D$ , Triplettzustand, Quantenausbeute, Anzahl der Fluorophormoleküle unter Beibehaltung der zuvor ermittelten Werte des konfokalen Volumens

Die Diffusionszeit  $\tau_D$  aller 10 Messungen wurde gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

#### 4.2.2.4 Auswertung mit Metamorph

Innerhalb der Software Metamorph wurden einige Routinen programmiert. Entsprechend der Vorgaben wurden Routinen zur Steuerung des xy-Tisches, des Abscannen von Arrays und der Bildaufnahme von Regina Bohnert programmiert. Sofern vorhanden, wurden Subroutinen der Software direkt benutzt und zu kleineren Routinen zusammengestellt.

Routine	Funktion
<i>Objects</i>	erfasst anhand eines Kantenkontrasts Strukturen im Bild und erstellt pro Objekt eine separate Umrandungsmaske.
<i>Size</i>	Nach Eingabe der Größe eines Pixel in $\mu\text{m}$ werden alle erfassten Größen in $\mu\text{m}$ umgerechnet.
<i>Background</i>	lässt alle Masken aus <i>Objects</i> um eine einstellbare Pixelzahl anwachsen, verschmilzt sie zu einer einzigen Maske und invertiert sie dann.

<i>Backintensity</i>	summiert die Helligkeit aller Pixel in der Maske aus <i>Background</i> auf und dividiert sie durch die Anzahl der Maskenpixel.
<i>Ellipse</i>	passt für jede Maske aus <i>Objects</i> eine Ellipse mit minimaler Fläche an; die Längen der Halbachsen.
<i>Sizeexclusion</i>	Nach Eingabe des minimalen und des maximalen Ausschlusswertes in $\mu\text{m}$ werden alle Masken aus <i>Objects</i> gelöscht, deren (durch <i>Ellipse</i> bestimmten) Halbachsen größer als der Maximalwert oder kleiner als der Minimalwert sind.
<i>Structureexclusion</i>	Nach Eingabe des maximalen Ausschlusswertes werden alle Masken in <i>Objects</i> gelöscht, deren Verhältnis von (durch <i>Ellipse</i> bestimmten) großer Hauptachse zu kleiner Halbachse größer als der eingegebene Wert ist.
<i>Intensity</i>	summiert für jede Maske aus <i>Objects</i> die Helligkeit aller Pixel und dividiert sie durch die Anzahl der Maskenpixel.
<i>Brightness</i>	eliminiert alle Masken aus <i>Objects</i> , deren <i>Intensity</i> höher als 85% des maximal möglichen Weißwertes sind oder die über mehr als 5% Pixel mit einem Helligkeitswert von 90% des Weißwertes enthalten.
<i>Darkness</i>	eliminiert alle Masken aus <i>Objects</i> , deren <i>Intensity</i> geringer als die 1,2-fache <i>Backintensity</i> ist oder die über mehr als 5% Pixel mit einem Helligkeitswert von 90% der <i>Backintensity</i> enthalten.
<i>Centre</i>	berechnet für eine Maske den Schwerpunkt.
<i>Values</i>	erfasst die Zuordnungsnummer der Maske aus <i>Objects</i> , die x- und y-Position durch <i>Centre</i> , die Längen der Halbachse durch <i>Ellipse</i> , das Verhältnis der Halbachsen und die <i>Intensity</i> der Maske und überträgt sie in ein Excel-importierbares wmf-File.

#### 4.2.2.5 Wann ist ein Signal ein Signal?

Ab wann ein Signal als solches gewertet werden kann, ist seit langem ein umstrittener Bereich in der Wissenschaft und gipfelte in der Unterscheidung zwischen Sensibilität und Sensitivität einer Messung <sup>[68;325]</sup>.

*Ein Signal sollte etwa drei Mal so stark wie das Hintergrundrauschen sein.*

Dies ist eine sehr hilfreiche Faustregel, wenn auch eine etwas ungenaue Definition.

Für absolute Intensitäten  $I$  wie im Falle von Mikroskopie und Bildaufnahmen werden zwei Definitionen verwendet, die einander entsprechen.

### Der Kontrast C

Die klassische Definition des Kontrasts  $C$  ist <sup>[326;327]</sup>.

$$C = \frac{I_{\text{Signal}} - I_{\text{H int ergrund}}}{I_{\text{Signal}} + I_{\text{H int ergrund}}}$$

$$\Delta C = \sqrt{\left(\frac{2 \cdot I_{\text{Signal}}}{(I_{\text{Signal}} + I_{\text{H int ergrund}})^2}\right)^2 + \left(\frac{2 \cdot I_{\text{H int ergrund}}}{(I_{\text{Signal}} + I_{\text{H int ergrund}})^2}\right)^2}$$

Somit kann der Kontrast Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Sofern die Signalintensität  $I_{\text{Signal}}$  größer als das Hintergrundsignal  $I_{\text{H int ergrund}}$  ist, erhält man Kontrastwerte zwischen 0 und 1.

Bei einem perfekten Signal ist der Hintergrund nicht detektierbar und der Kontrast beträgt demnach 1. Ist das Signal nicht vom Hintergrund zu unterscheiden, so erhält man einen Kontrast von 0.

Die Faustregel mit dem dreifachen Signal gegenüber dem Hintergrund entspricht einem Kontrast von 0,5. Aufgrund der Messgenauigkeit heutiger Detektoren wie CCD-Kameras und Scanner wird ein Kontrast von 0,1 noch als signifikant angesehen, da das Detektorrauschen  $\Delta S$  ca. 0,02 beträgt.

### Das S/N-Verhältnis

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio = S/N) ist ebenfalls ein gebräuchliches Maß für die Qualität eines Signals. Es gilt dabei

$$\frac{S}{N} = \frac{I_{\text{Signal}}}{I_{\text{H int ergrund}}}$$

$$\Delta \frac{S}{N} = \sqrt{\left(\frac{\Delta S}{N}\right)^2 + \left(\frac{S \cdot \Delta N}{N^2}\right)^2}$$

Kontrast und S/N-Verhältnis sind direkt ineinander umrechenbar. Es gilt dabei

$$\frac{S}{N} = \frac{1+C}{1-C}$$

Da der Kontrast zwischen -1 und 1 liegen kann, ist für das S/N-Verhältnis jede reelle Zahl möglich. Ein S/N-Verhältnis von 3 oder höher gilt als gutes Signal, aber schon ein Verhältnis von 1,25 kann bei rauscharmen Detektoren als Signal gewertet werden.

### 4.2.3 Softlithographisches Printing mit PDMS-Stempel

Für die Herstellung des PDMS-Stempels wird ein Master benötigt. Der Master wird mittels Lithographie als Abbild einer Photolithographiemaske hergestellt und besitzt ein wenige Mikrometer hohes Relief. Der flüssige PDMS-Polymer wird auf das Relief gegossen und erzeugt durch Polymerisation den PDMS-Stempel, der strukturell ein Negativabdruck des Masters darstellt.

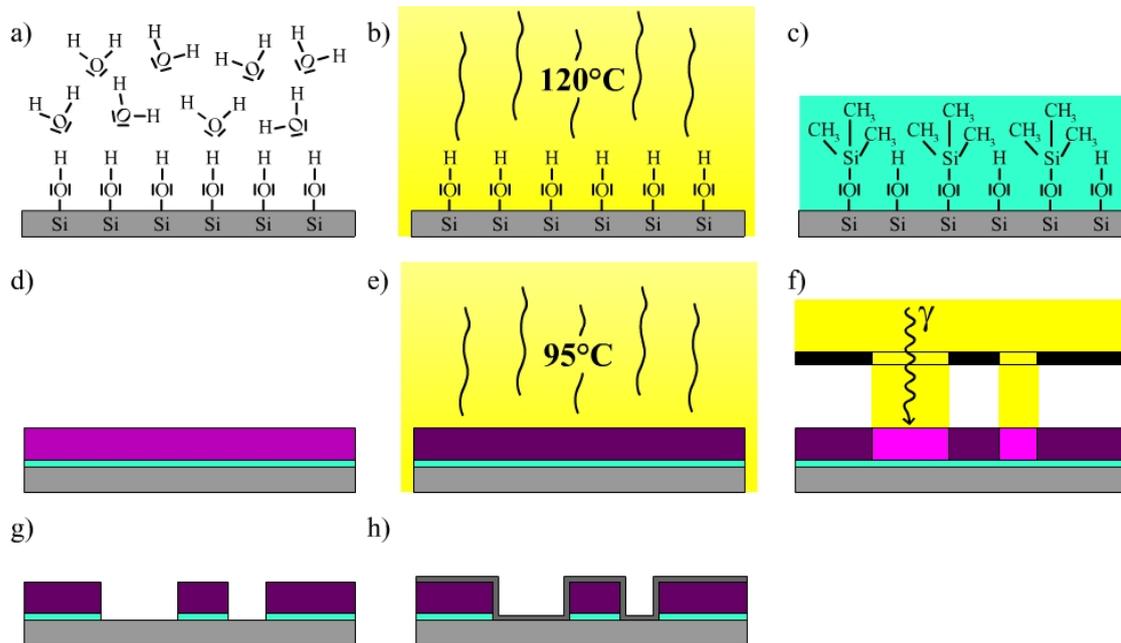
#### 4.2.3.1 Herstellung des Masters

Mittels CAD wurden die Strukturen definiert und auf eine Chrom-beschichtete Glas-Photolithographiemaske übertragen. Diese Lithographiemaske wurde in einem Kontaktbelichter auf einen Wafer übertragen, der zuvor mit Photolack beschichtet wurde (Abb.4.2a bis f). Nach der Entwicklung des Photolacks wurde der nun strukturierte Wafer mit einem Silan inertisiert und als Master verwendet.

#### Standardprotokoll

- Reinigen des Wafers in 10% wässriger Flußsäure
- Waschen mit 3 x Wasser und 3 x Isopropanol
- Ausheizen des Wafers bei 120°C für 10 min
- Überschichten mit 5% HMDS in Isopropanol
- Belacken des Wafers mit Photolack mittels Spin-Coating
- Ausheizen des Photolacks bei 95°C für 5 min
- Kontaktbelichtung, Lichtdosis entsprechend der Lackdicke
- Entwickeln des Photolacks
- Ausheizen des strukturierten Photolacks bei 100°C für 15 min

- Gasphasensilanisierung mit einem Perfluorosilan für 24 h
- staubfreie und lichtgeschützte Lagerung der Master in einer Reinraumbox

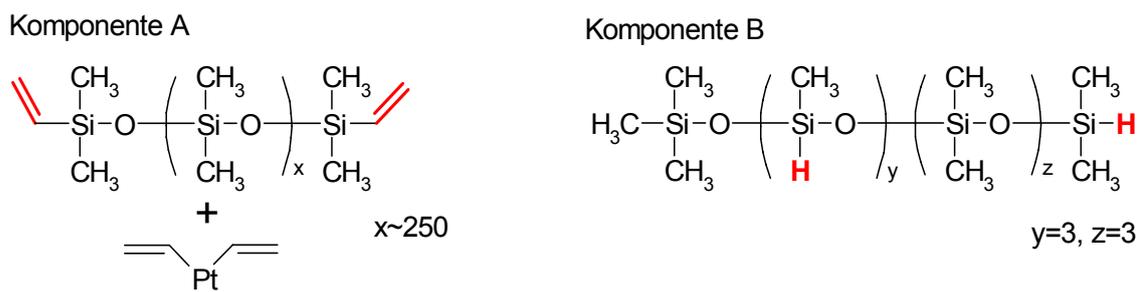


**Abb.4.2: Herstellung des Masters**

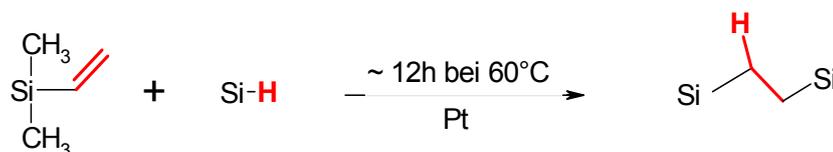
Der Wafer wird mit Flusssäure vorbehandelt und gereinigt (a), ausgeheizt (b), um das Oberflächenwasser zu entfernen, und mit HMDS (c) hydrophobisiert. Nach einer Spincoating-Belackung (d) wird der Lack ausgeheizt (e) und belichtet (f). Nach der Entwicklung (g) wird der Lack ausgeheizt, mit einem Perfluorosilan inertisiert (h)

### 4.2.3.2 Herstellung des PDMS-Stempel

Die Herstellung ist ein einfaches Abguss-Verfahren <sup>[157]</sup> mit einem Zwei-Komponenten-Polymer (Abb.4.3).



Polymerisationsreaktion



**Abb.4.3: Polymerisationsreaktion von PDMS**

Komponente A und B werden im Verhältnis 1:10 gemischt und bei 60°C zu einem hydrophoben Elastomer auspolymerisiert.

### Standardprotokoll

- Vermischen der PDMS-Komponenten A und B im Verhältnis 1:10
- Einlegen des Masters in eine Petrischale
- Überschichten des Masters mit der PDMS-Mischung
- Entgasen und Entfernen der Luftblasen durch Lagerung der Petrischalen für 45 min bei 1 mbar Druck
- Polymerisation bei 60°C für mind. 12 h
- Vorsichtiges Abheben des PDMS-Stempels vom Master
- Reinigen des Masters und des PDMS-Stempels mit Wasser
- staubfreie und lichtgeschützte Lagerung der Master und der PDMS-Stempel in einer Reinraumbox

#### 4.2.3.3 Stempeln von Molekülen

Der Stempelprozess mit PDMS-Stempeln wird auch als „Softlithographisches Printing“ oder „Mikrokontakt Printing“ bezeichnet. Man kann damit maximal eine molekulare Monolayer übertragen. Für das Einfärben (Inking) des Stempels wird eine 5 bis 20 nanomolare Lösung benötigt, die nur das zu übertragende Molekül enthält. Im Falle von DNA, Peptiden, Proteinen und Antikörpern dürfen auch Salze in der Einfärbe-Lösung enthalten sein.

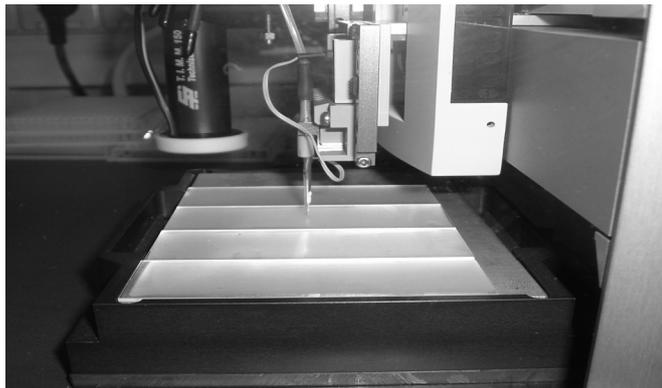
### Standardprotokoll

- Zuschneiden des Stempels auf die gewünschte Größe
- Reinigen des PDMS-Stempels mit Wasser
- Inkubation des Stempel-Reliefs für 60 min mit der Einfärbe-Lösung
- 3 x Waschen des Stempels mit Wasser
- Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Auflegen des Stempels auf eine planare Oberfläche
- Abheben des Stempels nach 15 s Kontakt
- Waschen der Oberfläche mit Wasser

Der Stempel kann mit derselben Einfärbe-Lösung nochmals verwendet werden.

#### 4.2.4 Herstellung von Mikroarrays mit Nanopipettier-Roboter

Die Mikroarrays wurden mit einem GESIM Nanoplotter 2.0 (Abb.4.4) hergestellt\*. Die zu übertragenden Verbindungen wurden möglichst konzentriert in einer 384-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und die entsprechende Position eingespeichert. Die Positionierung und Volumina der abgesetzten Tropfen auf den Mikroarray-Trägern wurden vor der Herstellung einprogrammiert und für spätere Verwendung wie Reproduktionen eines identischen Arrays gespeichert.



**Abb.4.4: Mikro-Pipettiereinheit des GESIM Nanoplotter 2.0**

Bis zu 5 Mikroskopslides konnten temperaturreguliert und parallel mit bis zu 384 Verbindungen gefertigt werden. Die Verbindungen wurden jeweils einzeln übertragen.

##### Standardprotokoll

- Programmieren des Arrays durch Festlegung der Abmessungen der Mikroarrayslides, der Zahl der Verbindungen, Anordnung, Position und Anzahl der Spots und der jeweils übertragenen Volumina (Tropfenanzahl) sowie die Anzahl der Mikroarrays pro Slide.
- Einlegen der Mikroarrayslides und der 384-Well-Mikrotiterplatte mit den zu übertragenden Verbindungen
- Angleichen der Luftfeuchte in der Inkubationsbox bis zum Erreichen des Taupunktes auf den Mikroarrayslides
- Start des Pipettierprogramms
- Entnahme der Slides und Lagerung in einer Klimakammer bis zur vollständigen Umsetzung der Bindungsreaktion
- 3 x Waschen mit Wasser und Trockenblasen
- licht- und staubgeschützte Lagerung der Arrays bei 4°C

---

\* Einarbeitung und Betreuung durch Dr. Thomas Andre (Arbeitsgruppe Priv. Doz. Brock, Tübingen)

## 4.3 Methoden im Teilbereich LIPODOT

### 4.3.1 Vereinzeln von Beads

Am Ende der Synthese liegen die Beads mit den Verbindungen in einem Lösungsmittel wie DCM oder DMF vor. Entzieht man das Lösungsmittel durch einfaches Trocknen, Unterdruckverdampfung oder Filtration, verkleben die Beads stabil miteinander und können so nicht verwendet werden. Zur Generierung einer Bead-Monolayer werden vereinzelt Beads benötigt. Im Rahmen der Versuche wurde kein Lösungsmittel gefunden, aus dem die Beads direkt als einzelne Beads gewonnen werden konnten. Einzig über einen Gefriertrocknungsschritt und vorherige Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln war dies möglich. Folgende Prozedur wurde letztendlich zur Vereinzeln von Beads eingesetzt.

#### Standardprotokoll

- 30 min Inkubation der Beads in NMP
- 3 x Waschen mit DMF
- 30 min Inkubation unter leichtem Schütteln in einem Gemisch aus ca. 70% DMF und 30% DCM (dieses Gemisch entspricht in etwa der Schwebdichte der verwendeten Beads).
- 3 x Waschen mit DCM
- 5 min Inkubation in DCM
- 3 x Waschen mit 65°C warmen tBu-OH
- Aufnahme von 20 mg Beads in je 10 ml 65°C warmen tBu-OH und 2-5 min Beschallung mit einer Ultraschall-Lanze (maximale Leistung für Dauerbetrieb), bis keine größeren Beadagglomerate mehr sichtbar sind. Die Beads sind ausreichend vereinzelt, wenn keine sichtbare Absenkung mehr vorhanden ist.
- Durch kurze Behandlung mit Ultraschall werden die Proben nochmals durchmischt und danach sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.
- Lyophilisierung bei 0,5 mbar Druck und -80°C für 3 Tage und 6 h Angleichung auf Raumdruck und Raumtemperatur

Die Beads werden so als lockeres, feinkörniges und streufähiges Pulver erhalten und bis zur Verwendung unter Luft- und Lichtabschluss bei Raumtemperatur eingelagert.

### **4.3.2 Bead-Monolayer auf der Carrier Plate**

Um die für den Transfer notwendige Bead-Monolayer herzustellen, werden monodisperse Beads verwendet. Die Beads werden auf eine planare Oberfläche transferiert. Übliche technische Verfahren zur Herstellung von Beschichtungen mit Mikropartikeln sind Langmuir-Blodgett-Filme und Pulverbeschichtungsverfahren.

#### **4.3.2.1 Langmuir-Blodgett-Filme**

Für Langmuir-Blodgett-Filme werden die Mikropartikel entweder in einer Suspension vorgelegt oder schwimmen auf der Oberfläche einer Lösung, welche die Mikropartikel nicht benetzen. Synthesepartikel müssen per se mit möglichst jedem Lösungsmittel benetzbar sein, daher kann nur die Suspensions-Technik angewendet werden.

##### Standardprotokoll

- Die Suspension enthält 80 mg Beads pro ml und besteht aus 30% DCM und 70% DMF.
- Die planaren Träger werden unter 30° Steigung mit 1 cm/min aus der Lösung gezogen.
- Beschichtete Träger werden unter Lichtabschluss trocken und staubfrei gelagert.

#### **4.3.2.2 Pulverbeschichtung**

Pulverbeschichtung wird für Lackierung, Oberflächeninertisierung und Feuerverzinkung in der Automobilindustrie eingesetzt. Hierbei stehen zwei grundsätzliche Verfahren zur Verfügung.

Beim Tauchverfahren wird der Träger in eine Klebstofflösung getaucht. Diese wird angetrocknet und dann der Träger in eine Wirbelkammer, die das Pulver enthält,

getaucht. Bei der elektrostatischen Beschichtung wird der Träger aufgeladen und das Pulver elektrostatisch beim Sprühen durch eine Düse aufgeladen. Hierdurch haftet das Pulver an der Oberfläche.

Eine elektrostatische Beschichtung eines Trägers mit Beads ließ sich nicht durchführen. Daher fand nur das Tauchverfahren Anwendung unter der Einschränkung, dass die Klebstoffschicht dünner als der Durchmesser der verwendeten Beads ist.

### Standardprotokoll

- Der Träger wird entweder mit Spincoating und einem Klebstoff beschichtet oder man nimmt kommerziell erhältliche Polymerträger, die bereits über eine Klebstoffschicht verfügen (Klebestreifen wie Tesafilm).
- Der Träger wird in eine Halterung mit 45° Neigung eingespannt und das Pulver wird mittels Druckluft über eine Düse in den Halterungsraum versprüht. Beads, die auf die Klebstoffschicht treffen, bleiben dort haften.
- Nach der Beschichtung wird der Träger mit Druckluft bestrahlt, um so die Beads zu entfernen, die nicht hinreichend gut in der Klebstoffschicht verhaftet sind.
- Beschichtete Beads werden unter Licht-, Staub- und Feuchtigkeitsabschluss bei Raumtemperatur gelagert.

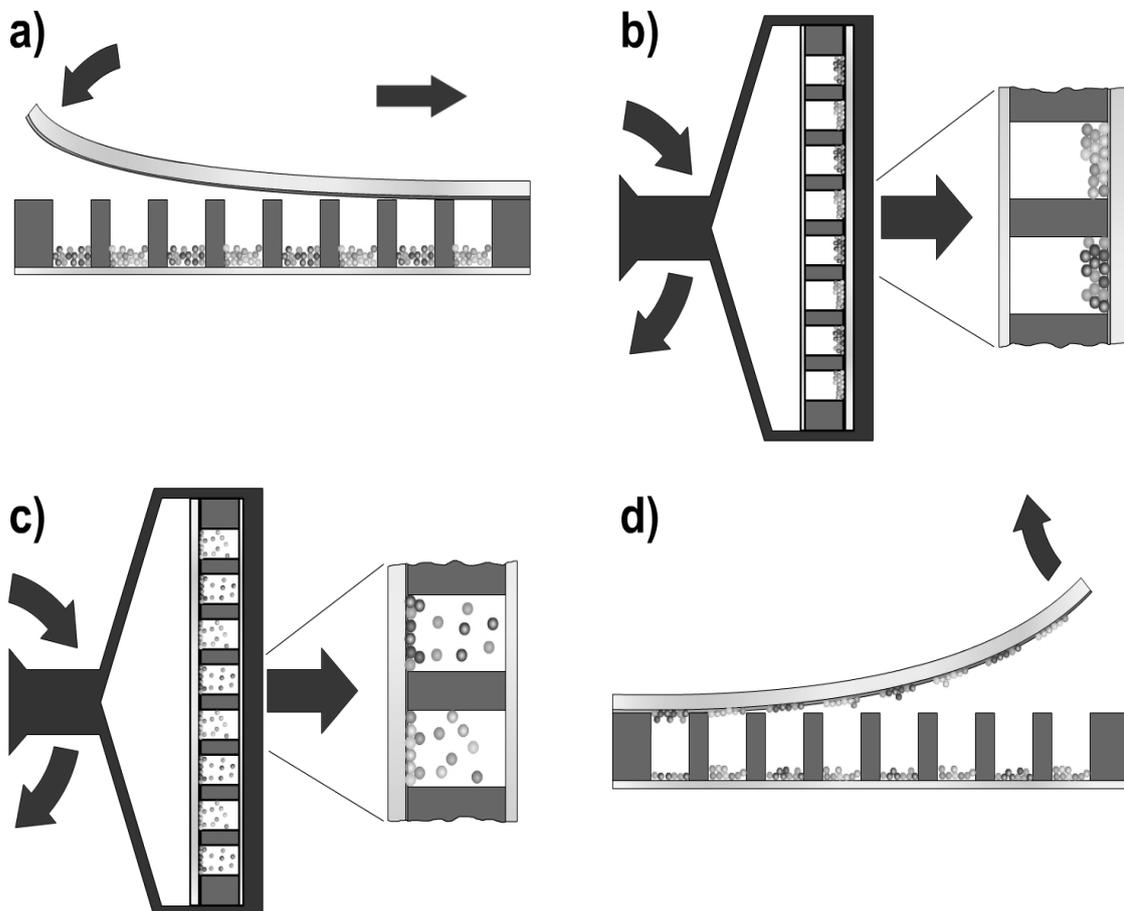
### 4.3.2.3 Zentrifugal-Pulverbeschichtung

Die Zentrifugalbeschichtung ist eine Variation der Pulverbeschichtung, die eigens für diese Aufgabenstellung entwickelt wurde. Dabei werden Synthesebeads (Pulver) mittels Zentrifugalkraft auf die klebstoffhaltige Schicht übertragen (Abb.4.5). Durch die Verwendung einer Beschichtungshalterung ist es zudem möglich eine orts aufgelösten Beschichtung der Klebstoffschicht mit den beads zu erzielen.

Danach wird die Beschichtungshalterung gewendet und nochmals zentrifugiert. Hierdurch werden die Beads, die nicht in der Klebstoffschicht haften, wieder in den Vorratsbehälter zurückbefördert und können für weitere Beschichtungen verwendet werden.

Standardprotokoll

- Der klebstoffbeschichtete polymere Träger wird luftdicht auf die Halterung aufgebracht.
- Die Beschichtungszentrifugation findet mit 8000 g für 3 min statt.
- Nach Wenden der Beschichtungshalterung wird mit 6000 g für 10 min zentrifugiert.
- Der so beschichtete polymere Träger wird von der Halterung abgezogen und findet seine Verwendung als Carrier Plate.
- Falls genug Beads noch in der Halterung vorhanden sind, kann eine weitere Beschichtung durchgeführt werden.



**Abb.4.5: Zentrifugal-Pulverbeschichtung zur orts aufgelösten Beschichtung**

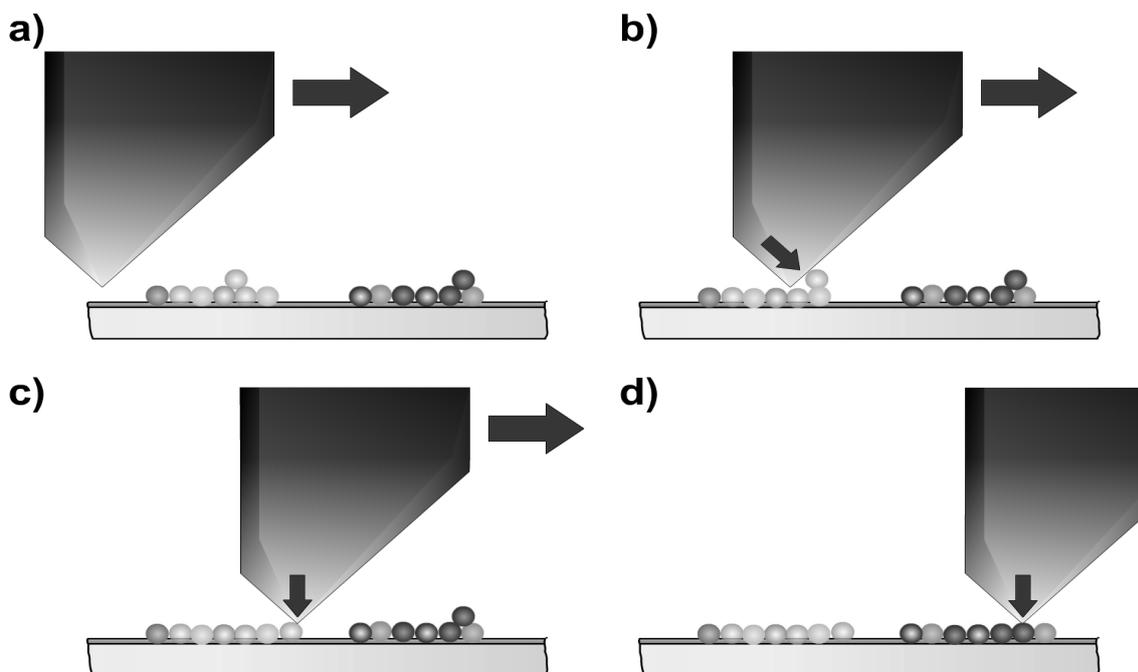
Der klebstoffbeschichtete Polymerträger wird auf der Lagerhalterung der Beads aufgespannt (a). Einzelne Vertiefungen der Lagerhalterung enthalten unterschiedliche Beads. Durch Zentrifugation werden die Beads in die Klebstoffschicht gedrückt (b). Die Halterung wird gewendet und nochmals zentrifugiert (c). Somit werden Beads, die nicht im Klebstoff haften, wieder zurück in die Halterung befördert und nur Beads, die tief im Klebstoff sitzen, bleiben auf dem Träger haften. Abschließend wird die beschichtete Carrier Plate von der Halterung getrennt (d) und die noch vorhandenen Beads können für eine weitere Beschichtung eingesetzt werden.

#### 4.3.2.4 Fixieren und Kämmen

Die vereinzelt Beads, die entsprechend Kapitel 4.3.2.2 und 4.3.2.3 auf eine Carrier Plate übertragen wurden, müssen noch in der Klebstoffschicht fixiert und zu einer Monolayer verarbeitet werden.

Dieses Fixieren und die Herstellung zur Monolayer erfolgt über das „Kämmen“. Diese Technik entstammt der Textilindustrie und wird für das Aufkleben von Pailletten verwendet. Dabei wird der Stoff mit Klebstoff beschichtet und die Pailletten werden vor eine Metallkante gegeben. Die Metallkante wird unter spitzem Winkel und definiertem Abstand über den Stoff gezogen. Durch dieses Kämmen wird einerseits die Paillette in den Klebstoff gedrückt und fixiert, andererseits überzähliges Material abgeschabt.

In ähnlicher Weise wird nun unter  $60^\circ$  Winkel und einer Kraft von 2-4 N/cm Kantenlänge des Metallkamms der Kämmprozess durchgeführt (Abb.4.6). Hierdurch werden Mehrlagenbeads entfernt und die Beads, die sich in direktem Kontakt mit der Klebstoffschicht befinden, darin fixiert. Der Kämmvorgang wird mehrmals wiederholt und die Carrier Plate nach jedem Kämmvorgang lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Mehrlagenbeads untersucht. Sobald keine Mehrlagenbeads mehr sichtbar sind, ist das Kämmen beendet.



**Abb.4.6: Schematische Darstellung des Kämmvorganges**

Über die beschichtete Carrier Plate (a) wird ein Kamm unter  $60^\circ$  Neigung geführt (b). Durch die Bewegung des Kamms werden „Mehrlagenbeads“ entfernt und an freien Stellen in die Carrier Plate integriert. Diese Integration eines Beads in die Monolayer kann am Rand eines Kompartiments (c) oder schon im Kompartiment (d) stattfinden.

#### 4.3.2.5 Herstellen einer Carrier Plate

Nach der Auswahl der Bead-Kollektionen wurden kompartimentierte Carrier Plates mit dem Pulverbeschichtungsverfahren hergestellt.

##### Standardprotokoll

- Vereinzeln der Beads
- Befüllen der Mikrotiterplatten-Wells mit 8 mg Beads
- Aufkleben des Tesafilms, so dass die Wells komplett verschlossen sind
- Pulverbeschichtung nach 4.3.2.3
- Abziehen des Tesafilms und kurzes Abblasen mit der Waferguard-Pistole bei 2 bar
- reihenweises Kämmen der Kompartimente nach 4.3.2.4
- Lagerung bis zur Verwendung in einer Reinraumbox

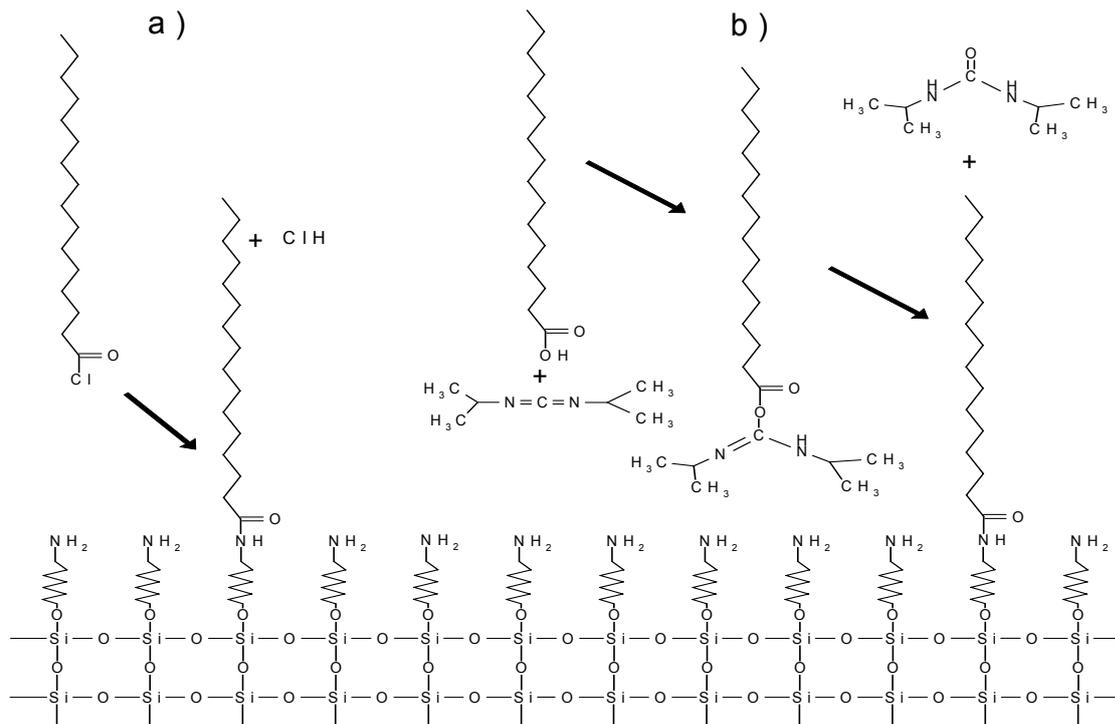
### 4.3.3 Modifizierung von Oberflächen

Bei kommerziellen Aminoslides kann direkt ohne Reinigung eine Oberflächenmodifizierung durchgeführt werden. Man kann klassische Reagenzien wie Säurechloride oder aktivierte Carbonsäuren verwenden <sup>[328]</sup>.

Für die Durchführung einer Silanisierung muss die Oberfläche zuerst gereinigt und die Oxide danach zu Hydroxy-Gruppen regeneriert werden. Alle Silane enthalten eine entsprechende Abgangsgruppe, die die Anbindung katalysiert. Üblicherweise sind dies Chloro-, Methoxy- oder Ethoxy-Gruppen (abnehmende Reaktivität).

#### 4.3.3.1 Hydrophobisierung von Aminoslides

Für eine Ankupplung von Molekülen an oberflächennahe Aminogruppen bieten sich Säurechloride und aktivierte Carbonsäuren mit kleinen Abgangsgruppen an. Säurehalogenide sind etwas reaktiver und besitzen eine deutlich kleinere Abgangsgruppe als Intermediat-aktivierte Carbonsäuren. Jedoch entspricht eine Oberflächenmodifikation physikalisch einer Kristallisation, die umso höhere Güte besitzt, je langsamer die Kristallisation erfolgt <sup>[159;329-336]</sup>.



**Abb.4.7: Kupplungsmethoden für die Modifikation von Oberflächen mit freien Aminogruppen**

Säurehalogenide (a) bieten die einfachste, aber auch reaktivste Chemie zur Kupplung an Aminogruppen. Mit steigender Reaktivität werden an Oberflächen auch mehr Flächendefekte, Inhomogenitäten und Nebenprodukte generiert. Eine weitere Methode bietet die Aktivierung von Carbonsäuren z.B. mit DIC (b).

#### Standardprotokoll für Säurechloride

- Lösen des Säurechlorids in DCM (0,2 molar)
- 4h Inkubation durch Überschichten
- Waschen der Oberfläche, 2 x DCM, 3 x  $H_2O$ , 3 x IPA, 2 x Aceton
- Trockenblasen der Oberfläche mit einem  $N_2$ -Gasstrahl
- staub- und lichtgeschützte Einlagerung der Oberflächen bis zur Verwendung

#### Standardprotokoll für Carbonsäuren

- Lösen der Carbonsäure in DMF (3 M)
- Zugabe von 1 eq. DIC und 20 min Voraktivierung
- 4 h Inkubation durch Überschichten
- Waschen der Oberfläche, 2 x DCM, 3 x  $H_2O$ , 3 x IPA, 2 x Aceton
- Trockenblasen der Oberfläche mit einem Gasstrahl
- staub- und lichtgeschützte Einlagerung der Oberflächen bis zur Verwendung

#### 4.3.3.2 Reinigung von Glasoberflächen mit Piranha-Lösung

Eine Piranha-Lösung ist eine frisch hergestellte Mischung aus Wasser, Wasserstoffperoxid und Schwefelsäure. Das so aktivierte Wasserstoffperoxid oxidiert sämtliche organische Komponenten und die Schwefelsäure komplexiert viele Metallionen. Die so gereinigte Oberfläche wird dann mit Wasser regeneriert und ist nach entsprechender Trocknung für die Silanisierung einsetzbar.

##### Standardprotokoll

- Vorlage von 40% Wasserstoffperoxidlösung (stabilisierte 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O) in einem Glasgefäß
- Zugabe von 60% konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (extreme Wärmeentwicklung!!!)
- Bei Gasblasenbildung kann das zu reinigende Glas in die Lösung gegeben werden.
- Das Glas verbleibt für 24 h in der Lösung.
- Das Glas wird für 5 min in Wasser inkubiert und mehrfach gründlich mit Wasser gespült, gefolgt von 3 x IPA, 3 x Aceton, mit einem N<sub>2</sub>-Gasstrahl trocken geblasen und wird umgehend silanisiert.

#### 4.3.3.3 Reinigung von Glasoberflächen mit Sauerstoffplasma

Mit einem „Plasma System 100“ wird ein Sauerstoffplasma erzeugt. Hierbei wird bei 20 mbar reiner Sauerstoff mittels Mikrowellenstrahlung in ein Plasma umgewandelt. Die nominelle Temperatur des Plasmas beträgt bei 300 W Mikrowellenleistung 12.000 K. Die so erzeugten Sauerstoffradikale treffen auf die Oberfläche und oxidieren zu sämtlichen organischen Verbindungen. Die hochschnellen Ionen übertragen ihre Energie auf die Oberfläche und tragen so einige nm ab. Dieser Vorgang entfernt die meisten Metallionen.

##### Standardprotokoll

- 0,2 mbar Sauerstoffdruck
- 300 W Mikrowellenleistung für 30 s
- 5 cm Abstand zwischen Plasmakern und Glasoberfläche

- Das Glas wird gründlich mit Wasser gespült, mit einem Gasstrahl trocken geblasen und umgehend silanisiert.

### 4.3.3.4 Gasphasensilanisierung

Für diese Art der Silanisierung wird die zu silanisierende Oberfläche bei 4 bis 8 mbar Druck mit einem flüchtigen Chlorosilan in Reaktion gebracht. Die Reaktion muss wasserfrei ablaufen.

#### Standardprotokoll

- Ein Exsikkator wird mit Aceton ausgewaschen.
- Eine Porzellanschale wird mit 500 µl eines Chlorsilans befüllt.
- Die Oberflächen werden auf den Zwischenboden des Exsikkators deponiert.
- Mit einer Diffusionspumpe wird ein Unterdruck von 4 mbar erzeugt, der Exsikkator mit Stickstoff geflutet und nochmals ein Unterdruck von 4 mbar erzeugt.
- Die Oberflächen verbleiben für mind. 10 h im Exsikkator.
- licht- und staubfreie Lagerung bei Raumtemperatur

### 4.3.3.5 Flüssigphasensilanisierung

Die Flüssigphasensilanisierung ist deutlich langsamer als die Gasphasensilanisierung, erzeugt jedoch dichtere und homogenere Schichten <sup>[336]</sup>. Ein Methoxy- oder Ethoxy-Silan wird in einem organischen hydrophoben Lösungsmittel wie Toluol oder Hexan verdünnt. Für die Reaktion sind geringe katalytische Mengen Wasser notwendig.

#### Standardprotokoll

- In einem Kunststoffgefäß wird 30% Toluol vorgelegt und mit 70% Methoxy-Silan vermischt.
- Inkubation der Oberfläche in diesem Gemisch für mind. 40 h
- mehrfaches Waschen mit Toluol, bis kein Silan mehr auf der Oberfläche sichtbar ist

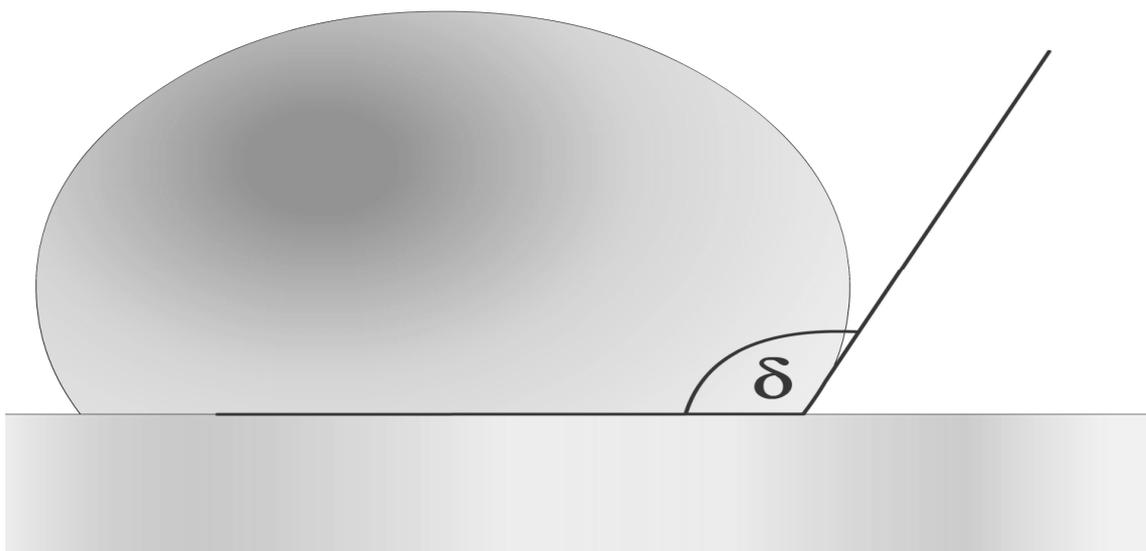
- weitere Waschschriffe mit 3 x Isopropanol, 3 x Ethanol, 3 x Wasser und 3 x Aceton
- Die Oberflächen werden mit einem Gasstrahl trocken geblasen und licht- und staubfrei bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert.

#### 4.3.4 Kontaktwinkelmessung

Ein Maß für die Hydrophobizität liefert die Kontaktwinkelmessung mit Wasser. Hierfür wird ein KSV CAM 200 und Wasser mit einer Leitfähigkeit von 18 M $\Omega$ /cm verwendet. Der Messwinkel wurde stets im „statischen Modus“ gemessen. Hierbei wird ein kleiner Tropfen (Droplett) mit 0,4 bis 3  $\mu$ l Volumen auf der Oberfläche abgesetzt. Mit Hilfe einer monochromen CCD-Kamera und einem Stroboskop-Rotlicht wird ein Profilbild des Tropfens aufgenommen, indem mind. 10 Aufnahmen des Tropfens zu einem Durchschnittsbild verrechnet werden.

Die Oberflächenkurve des Tropfens wird mit Hilfe einer „Young-Laplace-Kurve“ erfasst und verschiedene Parameter wie Kontaktwinkel (Abb.4.8), Oberflächenspannung, Schiefe und Volumen des Tropfens können so berechnet werden.

Hydrophile Oberflächen besitzen einen Kontaktwinkel unterhalb von 60°, hydrophobe Oberflächen einen Kontaktwinkel größer als 90°. Mittels wachshaltiger Oberflächenschichten können Kontaktwinkel bis 130° erreicht werden. Für größere Kontaktwinkel ist eine Oberflächenstrukturierung unumgänglich.



**Abb.4.8: Darstellung des Kontaktwinkels**

Ein Wassertropfen bildet mit einer Oberfläche und der umgebenden Luft an dieser Drei-Phasen-Grenze einen Kontaktwinkel  $\delta$  aus. Misst man den Winkel eines ruhenden Tropfens, spricht man von einer statischen Kontaktwinkelmessung.

### Standardprotokoll

- Die Oberfläche wird zuerst mit IPA, dann mit Aceton gereinigt und mit einem Gasstrahl trocken geblasen.
- Auf 5 verschiedenen Stellen der Oberfläche wird je ein je 1  $\mu\text{l}$  großer Tropfen auf die Oberfläche aufgesetzt und ein Durchschnittsbild aus 10 Einzelbildern aufgenommen.
- Mit Young-Laplace wird eine Oberflächenkurve berechnet und die Parameter (Kontaktwinkel, Standardabweichung und Tropfenvolumen) ausgegeben.
- Bei Tropfenvolumen unterhalb von 0,4  $\mu\text{l}$  und oberhalb von 3  $\mu\text{l}$  wird der automatisierte Algorithmus nochmals manuell überprüft (häufig nötig bei Kontaktwinkeln unter 30°) und die zuerst erhaltenen Werte werden nachgeprüft.

### **4.3.5 LIPODOT-Transfer von der Carrier Plate zur Assay Plate**

Beim LIPODOT-Transfer wird von jedem einzelnen Bead einer Bead-Monolayer auf der Carrier Plate die jeweilig enthaltene Verbindung abgespalten und auf die hydrophobe Assay Plate transferiert. Wie jeder „Stempelprozess“ benötigt man einen bestimmten Anpressdruck um einen Transfer vom „Stempel“ auf die „Oberfläche“ durchzuführen. Hierfür wurde eine entsprechende Apparatur gebaut\*.

#### 4.3.5.1 Transferapparatur

Die Transferapparatur besteht aus 3 Komponenten. In eine Halterung wird die Assay Plate eingelegt, in eine weitere die Carrier Plate eingespannt. Die dritte Komponente ist eine pneumatische Druckdose, die über eine elastische Membran sowie ein Einlassventil, einen Druckminderer und ein Auslassventil verfügt.

Nach dem Einlegen der Assay Plate wird die Carrier Plate Halterung aufgelegt und die gesamte Apparatur mit der Druckdose verschlossen. Schnellspannschrauben verriegeln die Druckdose mit der Assay Plate Halterung.

Durch Öffnen des Einlassventils strömt Druckluft auf die elastische Membran und presst diese gegen die Carrier Plate, die so wiederum gegen die Assay Plate

---

\* Umsetzung der Entwürfe und Bau der Transferapparaturen durch Walter Schaal (Feinmechanik-Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik, Tübingen)

presst. Danach wird das Einlassventil geschlossen, das Ventil zum Belüften geöffnet und die Apparatur geöffnet. Die Carrier Plate wird von der Assay Plate abgehoben und die Assay Plate entnommen.

#### 4.3.5.2 Standardprotokoll eines LIPODOT-Transfers

##### Vorbereitung

- Einspannen der Carrier Plate in die Halterung.
- Inkubation der Carrier Plate für 120 s mit Wasser oder einer wässrigen Lösung mit 1 mg/ml LIPODOT-Ankerverbindung (ergibt eine ca. 1 zu 5 Verdünnung der LIPODOT-Verbindungen an der Oberfläche).
- Trockenblasen

##### Druckzyklus

- Einlegen der Assay Plate in die Halterung.
- Spaltung des Photolinkers mit einer UV-Belichtungs-dosis von  $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  bei gesättigter Luftfeuchtigkeit.
- Einlegen der Carrier Plate Halterung in die Assay Plate Halterung.
- Auflegen der Druckdose und Verriegeln der Apparatur.
- Anlegen von 3 bar Druckluft an die Druckdose für 30 s.
- Abriegeln der Druckluft, Entlüften und Öffnen der Apparatur.
- Befeuchten der Carrier Plate für 10 s und anschließendem Trockenblasen.
- Entnahme der „bedruckten“ Assay Plate.
- Für eine weitere Kopie der Carrier Plate auf eine Assay Plate wird der gesamte Zyklus wiederholt.

##### Beenden des Druckens

- Die Carrier Plate wird gründlich mit einem Gasstrahl trocken geblasen und dann trocken und dunkel gelagert.

#### 4.3.6 LIPODOT-Ankerverbindung und Aufbau einer Kollektion

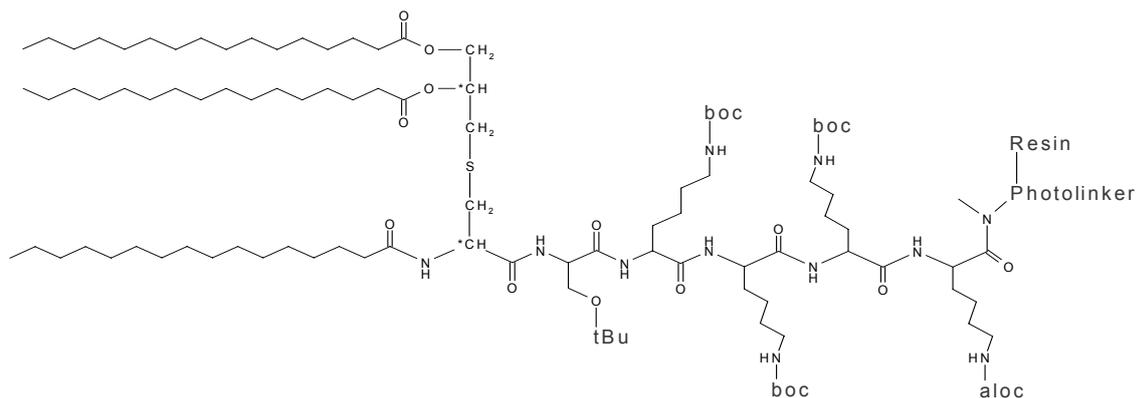
Für die Synthesen wurde Tentagelharz mit  $\text{NH}_2$ -Funktionalisierung verwendet. Die Beads besaßen einen Durchmesser von  $20 \mu\text{m}$  und eine Belegung von 0,19-0,24 mmol/g.

### 4.3.6.1 LIPODOT-Ankerverbindung

Die Ankerverbindung besitzt 4 verschiedene Funktionalitäten (Abb.4.9).

- Die **Freisetzung** der Ankerverbindung erfolgt über den **Photolinker**, der die Ankerverbindung auf dem Bead festgesetzt, aber durch Bestrahlung mit UV-Licht zerfällt, wodurch die Ankerverbindung freigesetzt wird.
- Die spätere **Immobilisierung** der Ankerverbindung erfolgt über die stark hydrophobe **Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe**. Sie sorgt zudem dafür, dass hydrophile Derivate dieser Grundverbindung trotzdem auf einer hydrophoben Oberfläche festgesetzt bleiben.
- Für eine entsprechende **Wasserlöslichkeit** der Ankerverbindung sorgt eine **SK<sub>4</sub>-Gruppe**, die auch bei hydrophoben Derivaten eine entsprechende Wasserlöslichkeit gewährleistet.
- Als **orthogonale Schutzgruppe** zum Aufbau einer Verbindungskollektion wird eine **Aloc-Schutzgruppe** verwendet. Sie erlaubt den Aufbau der Ankerverbindung mit klassischer Fmoc/Boc-Schutzgruppenchemie. Durch Abspaltung der Aloc-Gruppe wird eine NH<sub>2</sub>-Gruppe entschützt, an der ein weiterer Peptidstrang oder eine Kollektion mit Fmoc/Boc-Schutzgruppenchemie aufgebaut werden kann.

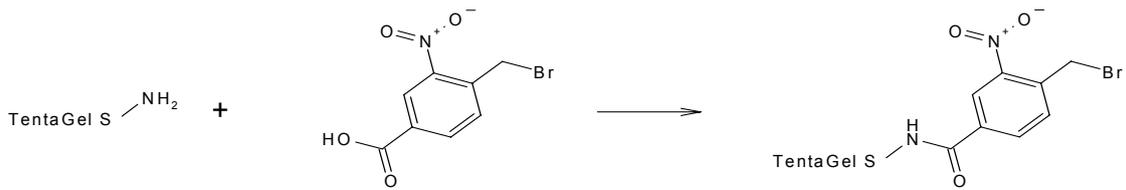
Die geschützte (Abb.4.9) Ankerverbindung enthält noch tBu-OH und Boc-Schutzgruppen.



**Abb.4.9: Strukturformel der Ankerverbindung**

Auf dem Harz wird zuerst eine photospaltbare Gruppe (Photolinker) angekuppelt, gefolgt von einem Fmoc-Lysin (Aloc-seitengeschützt), 3 mal Fmoc-Lysin (Boc-Seitenketten geschützt). Nach Kupplung eines Serins (tBu-OH-Seitenketten geschützt) wird abschließend Pam<sub>3</sub>Cys-OH gekuppelt.

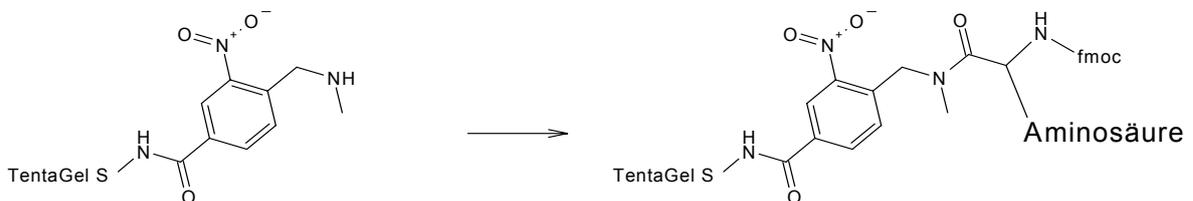
Zur Synthese der Ankerverbindung wurde zuerst die photospaltbare Gruppe 4-Bromomethyl-3-Nitrobenzoesäure wie eine Fmoc-Aminosäure 4.2.1.2 an das Harz gebunden.



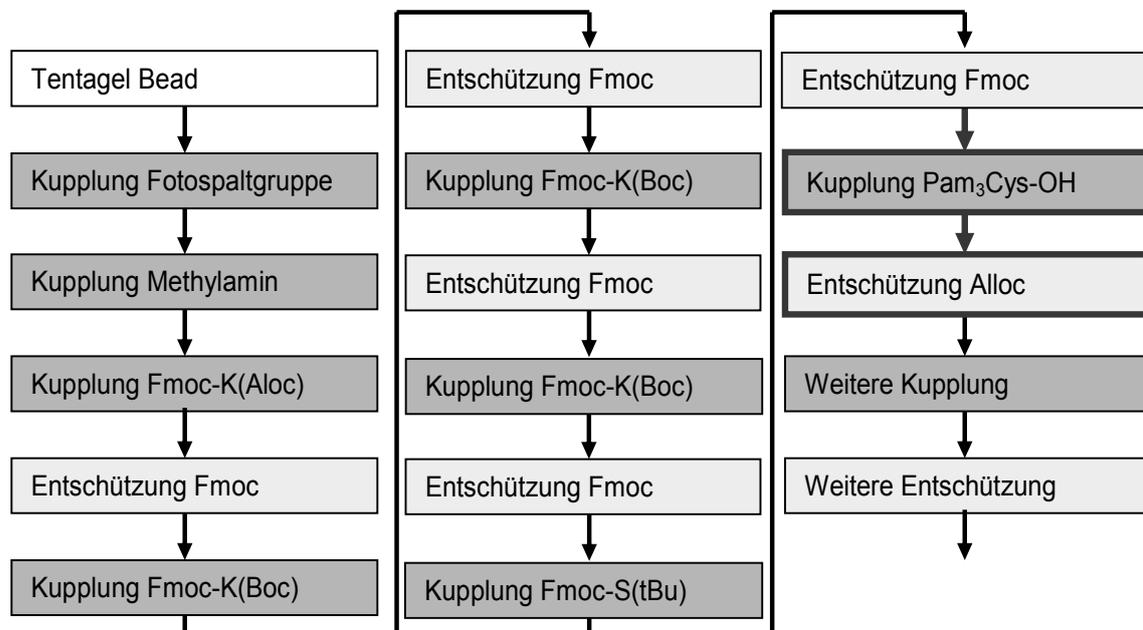
Danach wurde das Brom durch eine Aminomethylgruppe substituiert ( )



Anschließend wurde mit Fmoc-Aminosäuren gekuppelt (4.2.1.2)



Zuerst wurde ein Fmoc-Lys-(Aloc)-OH, gefolgt von 3 Fmoc-Lys-(Boc)-OH und einem Fmoc-Ser-OH gekuppelt. Abschließend wurde ein Pam<sub>3</sub>Cys-OH (4.2.1.3) auf den entschützten C-Terminus gekuppelt. Entsprechend dem Syntheschema (Abb.4.10) kann die im Weiteren als Ankerbindung bezeichnete Grundstruktur synthetisiert werden.



**Abb.4.10: Synthese-Schema zum Aufbau der Ankerbindung**

Kupplungsschritte (dunkelgrau) und Entschützungsschritte (hellgrau) entsprechen zumeist der klassischen Fmoc-Chemie zum Aufbau von Peptiden. Besonders kritische Reaktionen sind dick umrandet. Nach der Entschützung der Aloc-Gruppe ist die Ankerbindung fertiggestellt und eine Kollektion kann aufgebaut werden.

#### 4.3.6.2 Aufbau der Kollektion

Alle Kollektionen wurden mit dem Split & Mix Verfahren generiert.

##### Split-Schritt

- Vorquellen der Beads für 10 min in 50% DMF / 50% DCM
- Abfiltrieren des Lösungsmittels und Suspendieren der Beads in 30% DCM 70% DMF
- gleichmäßiges Verteilen der Beads in die Reaktionsgefäße
- Abfiltrieren des Lösungsmittels
- Zugabe der Kupplungsreagenzien (entsprechend der Peptidsynthese nach 4.2.1) und Zugabe einer Fmoc-geschützten Aminosäure pro Reaktionsgefäß
- Abfiltrieren der Kupplungsreagenzien und Waschen mit 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF
- Suspendieren der Beads in DMF

##### Mix-Schritt

- Vereinen aller in DMF suspendierten Beads
- Durchmischen der Suspension
- Abfiltrieren des DMF
- Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin (entsprechend 4.2.1.5)
- Abfiltrieren der Piperidinlösung und Waschen mit 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF

Danach kann ein weiterer Split-Schritt erfolgen. Nach Generierung der Kollektion werden (entsprechend 4.2.1.7) alle Schutzgruppen entfernt.

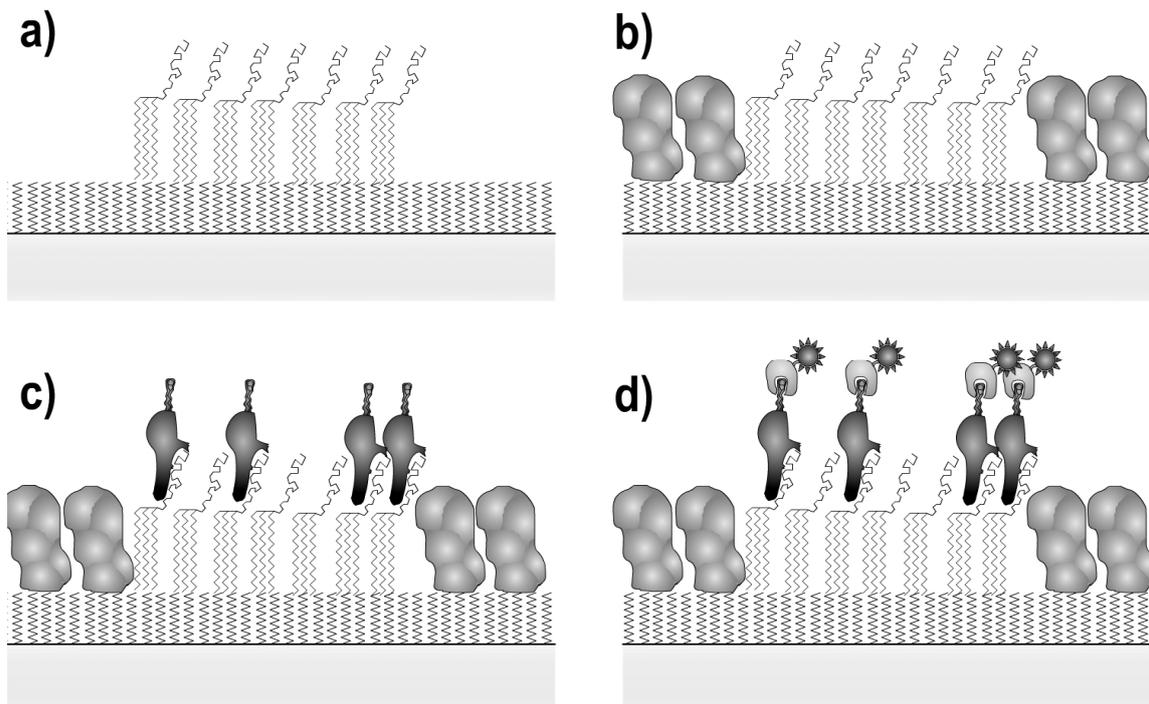
#### 4.3.7 Durchführung eines LIPODOT-Assays

Für einen LIPODOT-Assay wird zuerst ein LIPODOT-Transfer einer LIPODOT-Verbindung auf eine hydrophobe Oberfläche durchgeführt. Danach wird die Oberfläche entsprechend eines Fluorometrischen Immunoassays (Abb.4.11) behandelt. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen dabei ebenfalls denen, die in einem Fluorometrischen Immunoassay verwendet werden.

- Waschen der Oberfläche mit  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$

- Überschichten der Oberfläche mit einer Block-Lösung aus 2% BSA (w/v) und 2% TopBlock (w/v) für 60 min
- 3 x Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  und Trockenblasen mit einem Gasstrahl
- Überschichten mit einer Block-Lösung, die zusätzlich den interagierenden gelabelten Bindungspartner enthält (Rezeptor)
- 3 x Waschen mit physiologischem PBS-Puffer und Trockenblasen mit einem Gasstrahl
- Überschichten mit einer Block-Lösung, die zusätzlich einen Fluorophor enthält, der an das Label bindet
- 3 x Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  und Trockenblasen mit einem Gasstrahl
- Vermessung der Probe mit einem Fluoreszenzmikroskop

Theoretisch könnten auch Rezeptoren verwendet werden, die anstelle des Labels über einen kovalent gebundenen Fluorophor oder ein Enzym verfügen. Daher ist der LIPODOT-Assay prinzipiell mit allen in Kapitel 3.2 beschriebenen Detektionsmethoden kompatibel.



**Abb.4.11: Durchführung eines LIPODOT-Assays**

Nachdem die LIPODOTs (a) auf der hydrophoben Oberfläche mit einem LIPODOT-Transfer erzeugt wurden, wird die Oberfläche geblockt (b). Durch Zugabe eines gelabelten interagierenden Proteins (c) bindet dieses an den LIPODOT. Das Label kann dann mit einem fluoreszent markierten Binder nachgewiesen werden. Der LIPODOT weist nur dann Fluoreszenz auf, wenn das zuerst zugegebene Protein tatsächlich an den LIPODOT bindet.

#### 4.3.7.1 Detektion

Die Detektion der Bindung wurde ausschließlich durch Fluoreszenz durchgeführt. Als Fluorophore wurden QDots, Cy5, Cy3, Rhodamin, Fluorescein sowie S0387 eingesetzt. Die Datenerfassung wurde entsprechend 4.2.2.1 durchgeführt.

#### 4.3.7.2 Auswertung

Die Auswertung wurde mit Metamorph durchgeführt. Hierfür wurden die erfassten Bilder zuerst eingelesen und die Funktionen entsprechend 4.2.2.4 verwendet.

##### Standardprotokoll

- Einlesen des Bildes
- Erkennen der Strukturen (Objekte) mit *Objects*
- Erstellen der Hintergrundmaske mit *Background*
- Bestimmen der Hintergrundfluoreszenz mit *Backintensity*
- Verwerfen der Objekte mit Durchmessern größer als 20  $\mu\text{m}$  und kleiner als 4  $\mu\text{m}$  durch *Sizeexclusion*
- Verwerfen von unförmigen Objekten mit *Structureexclusion*
- Bestimmung der Fluoreszenz der verbleibenden Objekte mit *Intensity*
- Verwerfen von dunkeln Objekten, die gegenüber der Hintergrundfluoreszenz nicht als Signal gewertet werden sollen, mit *Darkness*
- Erfassung der verbleibenden Objekte nach Kreisförmigkeit, Kontrast, Helligkeit und Homogenität mit *Values*
- Berechnen von Durchschnittswerten dieser erfassten Objektwerte, sowie die entsprechenden Standardabweichungen

Die erhaltenen Durchschnittswerte wurden in ein Excel-File exportiert und weiter verwendet. Es konnten maximal bis zu 50.000 Objekte erfasst werden.

## 4.4 Methoden im Teilbereich Diffusionsvorrichtung

### 4.4.1 Einfüllen der Diffusionsmatrizen

#### 4.4.1.1 Agarose

- Erhitzen der Agaroselösung bis zum vollständigen Schmelzen
- Eingießen von 800 µl Agaroselösung (0,5-5%) in eine 12-Well-Platte
- Einsetzen der Diffusionsvorrichtung nach 5 bis 10 min Gelierzeit

#### 4.4.1.2 Gelatine

- Erhitzen der Gelatinelösung auf 60°C
- Eingießen von 800 µl Gelatinelösung (4-15%) in eine 12-Well-Platte
- Einsetzen der Diffusionsplatte nach vollständigem Gelieren der Gelatine

### 4.4.2 Herstellung der Diffusionsvorrichtung

Zur Herstellung\* der Diffusionsvorrichtung wurde eine Aluminiumlegierung mit 99% Al, 0,5% Mg und 0,5% Si verwendet, da diese über eine hinreichende Härte und zugleich geringe Schwermetallbelastung (Zelltoxizität!) verfügte. Außerdem kann diese Legierung bei Bedarf eloxiert werden.

Die Vorrichtung (Abb.4.12) hat eine Höhe von 5 mm und 19 mm Durchmesser. Als Reservoir und Startpunkt für die Diffusion dienen zwei 1 x 10 mm große Schlitz, in die Lösungen mit zu diffundierenden Inhaltsstoffen pipettiert werden können. Im Mittelbereich der Diffusionsvorrichtung ist ein 10 x 10 mm Bereich geöffnet, um nach Einstellung des Diffusionsgradienten darauf Zugriff zu haben oder um vor Ort einen Zellaassay durchzuführen.

In den Bereich der Öffnung kann ein Deckel eingesetzt und verschraubt werden, um eine Membran oder ein Siebdrucknetz zu fixieren.

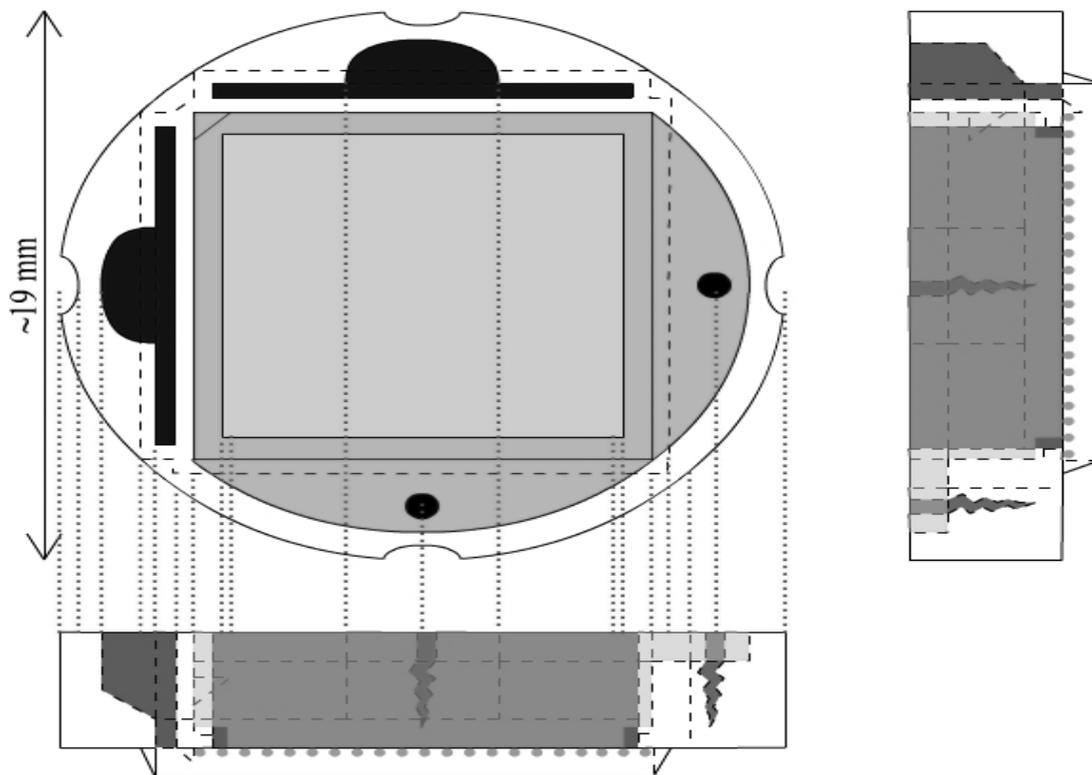
Die Unterseite der Diffusionsvorrichtung besitzt scharfe Grate mit 0,4 mm (Innenbereich) und 0,8 mm (Außenbereich). Beim Aufsetzen auf die Diffusionsmatrix schneiden sie diese ein und verankern so die Vorrichtung in der

---

\* Umsetzung der Entwürfe, CAD-Programmierung und CNC-Fräsen durch Frau Antje Trefftz (Feinmechanik-Werkstatt der Angewandten Physik, Tübingen)

Matrix. Zudem versiegeln sie die Vorrichtung gegenüber der Diffusionsmatrix, damit die einpipettierte Diffusionslösung nicht auslaufen kann und nur in den Zugabeschlitzen in die Matrix einsickert. Die äußeren Grate begrenzen die Diffusion und sorgen so dafür, dass möglichst viel Material in den offenen Mittelbereich diffundiert.

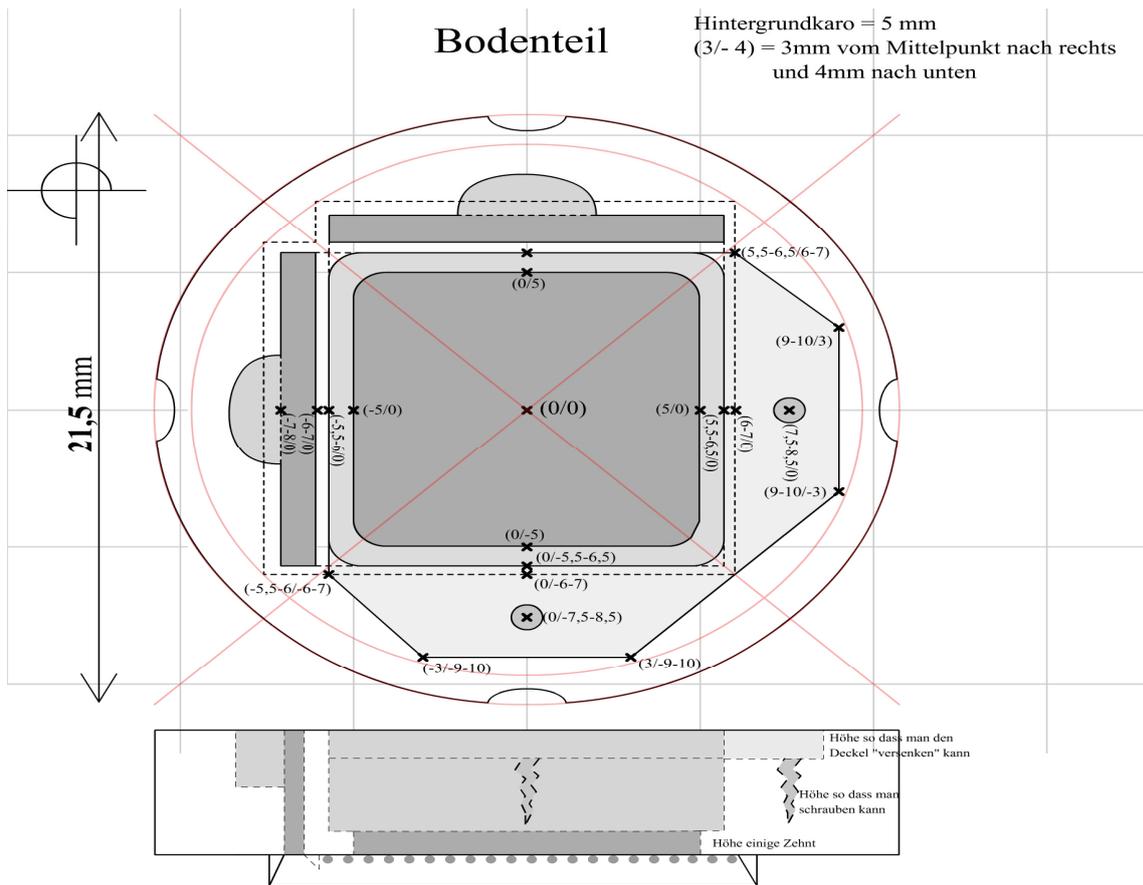
Eine seitliche Nut in der Vorrichtung ermöglicht nach dem Versuch ein Anheben der Vorrichtung aus dem Well der 12-Well-Platte, da die Vorrichtung nahezu nahtlos seitlich mit dem Well abschließt.



**Abb.4.12: Erster Entwurf der Diffusionsvorrichtung in Auf- und Seitenansicht**

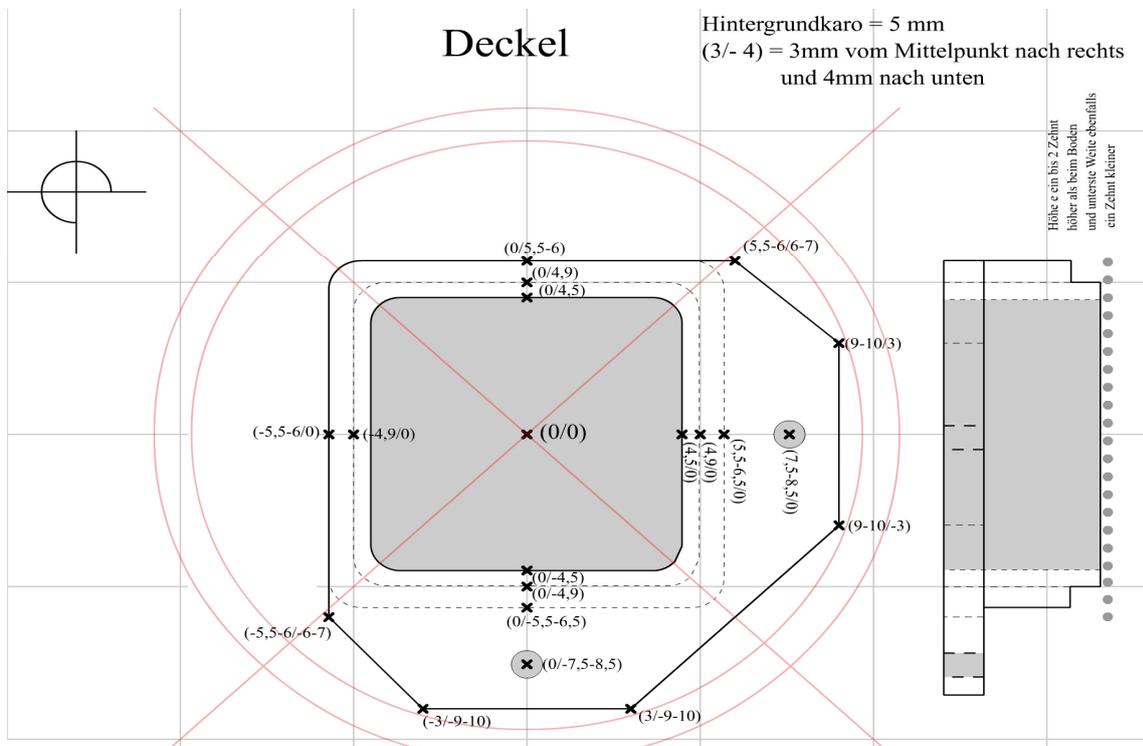
Die Vorrichtung ist 5 mm hoch und passt mit 19 mm Durchmesser in eine 12-Well-Platte. Über zwei Zugabeschlitze (schwarz) können die Diffusionslösungen zugegeben werden. Im Mittelbereich ist ein 10 x 10 mm großer Durchbruch (hellgrau), um Zugriff auf den Gradienten zu erhalten oder darauf Zellen zu pipettieren. Ein Deckeleinsatz (mittelgrau) ermöglicht es, zudem in die Vorrichtung eine Membran oder ein Sieddrucknetz einzuspannen. Der Deckel kann mit Schrauben fest mit der Vorrichtung verschraubt werden (Aufsicht schwarz, Seitansicht dunkelgrau). Die Unterseite der Vorrichtung enthält scharfe Grate, um die Vorrichtung fest in der Diffusionsmatrix zu verankern und den Gradienten seitlich zu begrenzen.

Entsprechend des ersten Prototyps (Abb.4.12) wurde unter Berücksichtigung der technischen Begrenzungen der CAD-Fräse und der Stabilität des verwendeten Materials die Materialstärken und Abmessungen der Diffusionsvorrichtung (Abb.4.13) und des Deckels (Abb.4.14) entsprechend angepasst.



**Abb.4.13: Aufbau der Diffusionsvorrichtung**

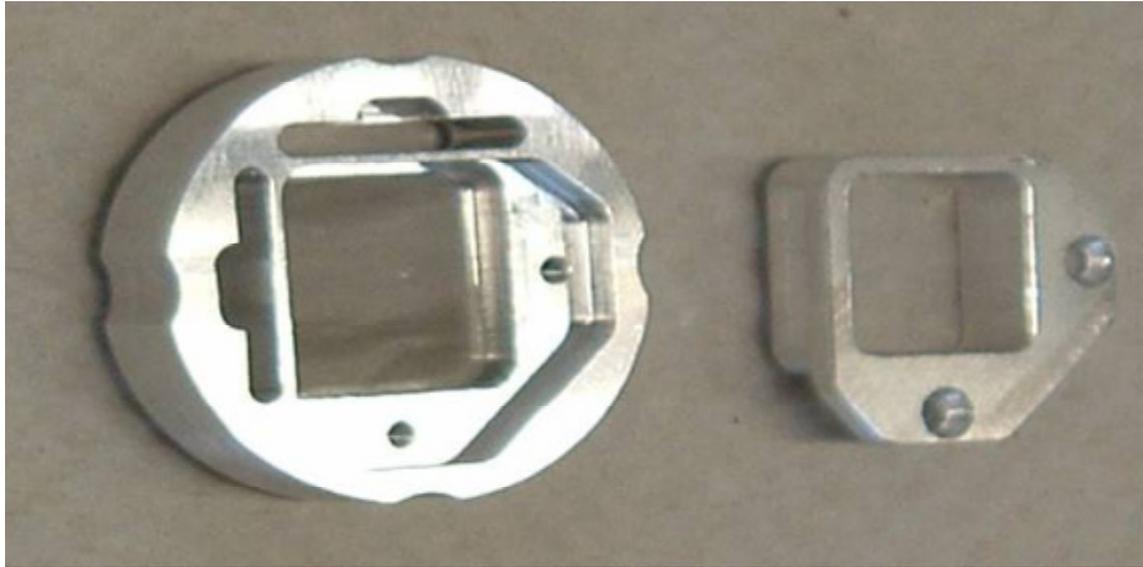
Die Diffusionsvorrichtung wurde aus einer Zylinderscheibe gefräst. Die Ortskoordinaten im Bezug auf den Mittelpunkt sind eingetragen.



**Abb.4.14: Aufbau des Deckels**

Der Deckel wurde aus denselben Zylinderscheiben wie die Diffusionsvorrichtung gefräst. Die entsprechenden Ortskoordinaten in Bezug auf den Mittelpunkt sind eingetragen.

Es wurden ca. 50 Diffusionsvorrichtungen (Abb.4.15) seriell und automatisch gefertigt.

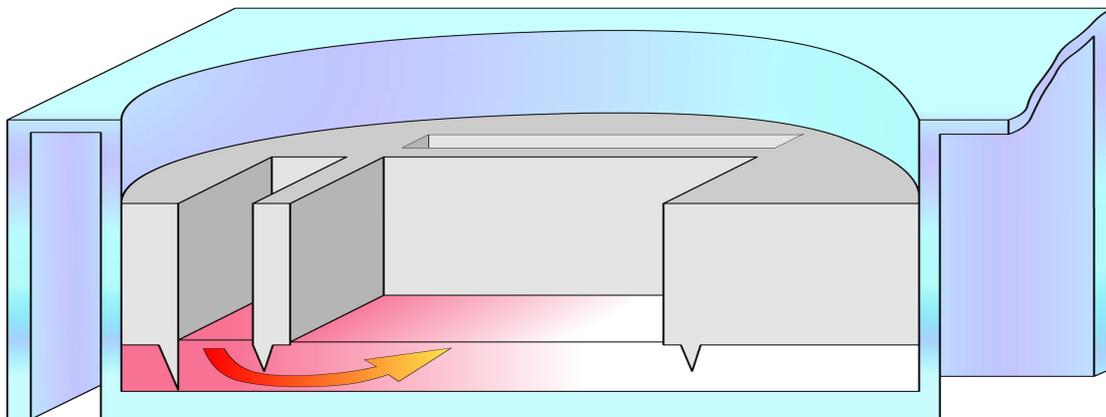


**Abb.4.15: Diffusionsvorrichtung und Deckel**

Entsprechend der Pläne (Abb.4.13 und 4.14) wurden Diffusionsvorrichtungen und dazugehörige Deckel gefräst.

### 4.4.3 Erzeugung eines Gradienten

Nach dem Einsetzen der Diffusionsvorrichtung (Abb.4.16) wurden zwischen 2  $\mu$ l und 20  $\mu$ l Lösung in die Schlitze eingefüllt. Nach dem Einsickern der Lösungen wurde die 12-Well-Platte mit einem feuchten Tuch bedeckt, um ein Austrocknen der Diffusionsmatrix durch Verdunstung zu unterbinden, und dann verschlossen. Die Diffusionszeit betrug bei konstant gehaltener Temperatur zwischen 4 und 120 h.



**Abb.4.16: Entstehung des Gradienten durch Diffusion**

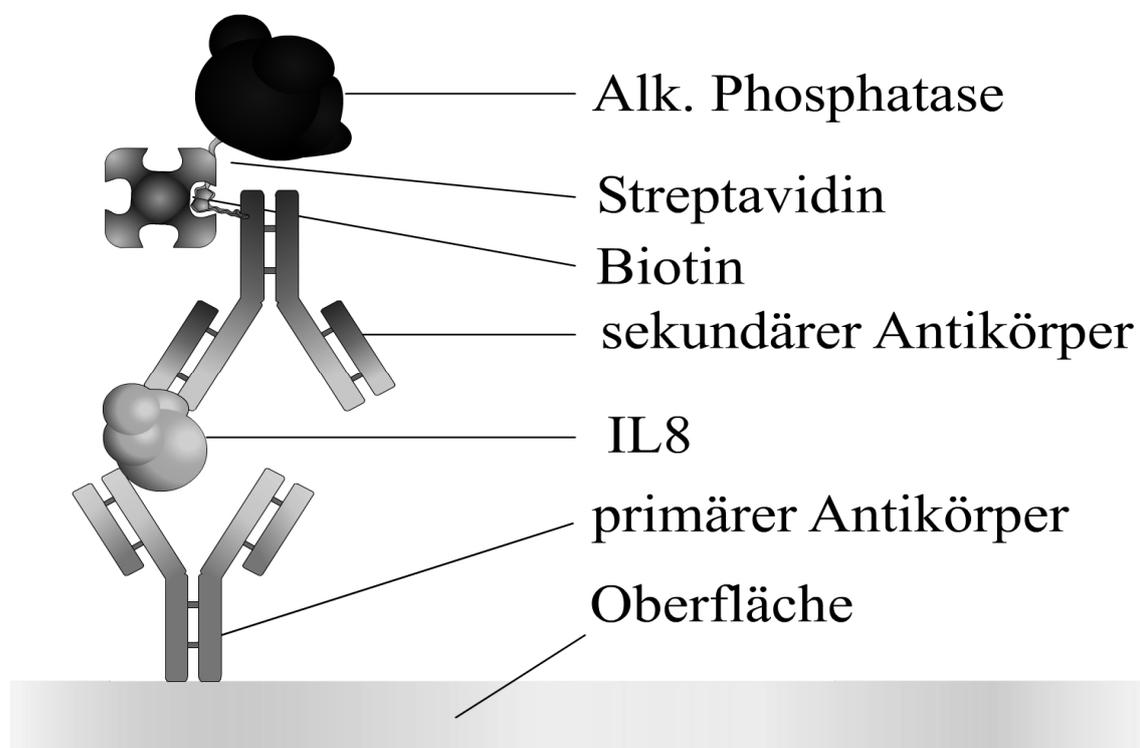
Sobald die Lösungen in die Schlitze pipettiert werden, entsteht ein Gradient durch Diffusion. Der Schlitz dient als Quelle und der Gradient bildet sich senkrecht zur Längsachse des Schlitzes aus.

#### 4.4.4 Nachweis der Zellaktivierung

THP1-Zellen reagieren auf die Stimulation mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> durch Ausschüttung von Interleukin 8 (IL8) ins umgebende Medium. Mittels eines quantitativen ELISAs wurde diese Aktivierung der Zellen vermessen.

##### 4.4.4.1 IL8-ELISA

Der ELISA wurde im Sandwich-Verfahren (Abb.4.17) mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder Alkalischer Phosphatase (AP) durch Substratumsatz photometrisch quantifiziert.



**Abb.4.17: Aufbau des IL8-ELISAs mit AP-Detektion**

Die Oberfläche der ELISA-Platten wurde mit primären Antikörpern beschichtet und geblockt. Danach wurde der Zellüberstand zugegeben und das ausgeschüttete IL8 vom Antikörper gebunden. Ein weiterer sekundärer Antikörper (mit Biotin gelabelt) bindet dann an eine andere Stelle des IL8. Abschließend kann dieses Biotin mit einem Streptavidin-gekoppelten Enzym wie Alkalische Phosphatase oder HRP quantifiziert werden, indem man den Substratumsatz des Enzyms photometrisch vermisst.

##### Standardprotokoll

- Beladen der Platten durch 16 h Inkubation mit 100 µl gereinigtem Anti-IL8-Antikörper (1 µg/ml in PBS)
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer

- Blockieren der Oberfläche durch 60 min Inkubation mit 200 µl Blockpuffer (4% BSA in PBS)
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer
- Vorlegen von 50 µl Blockpuffer und Zugabe von 50 µl zu untersuchender Probe bei 60 min Inkubation
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer
- Inkubation für 60 min mit 200 µl biotinyliertem Anti-IL8-Antikörper (1 µg/ml in Blockpuffer)
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer

Es kann sowohl mit Streptavidin-gelabelter Alkalischer Phosphatase als auch mit Meerrettich-Peroxidase detektiert werden.

### Detektion mit Meerrettich-Peroxidase

- Inkubation für 60 min mit 100 µl Streptavidin-gelabelter Meerrettich-Peroxidase (0,25 µg/ml in Phosphatasepuffer)
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer
- Inkubation mit 100 µl MTB-Lösung (unverdünnt) für 5 min
- Stoppen der Reaktion mit 100 µl einer 1 M wässrigen Schwefelsäure
- Detektion eines Aliquots von 150 µl im ELISA-Reader bei 450 nm

### Detektion mit Alkalischer Phosphatase

- Inkubation für 60 min mit 100 µl Streptavidin-gelabelter Alkalischer Phosphatase (0,25 µg/ml in Phosphatasepuffer) oder Antibiotin-Antikörper gelabelt mit Alkalischer Phosphatase (0,5 µg/ml in Phosphatasepuffer)
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer
- Inkubation für 10 min mit ELF-97 Lösung (1:50 Verdünnung der Stammlösung)
- Stoppen der Reaktion mit 0,1 molarer wässriger Schwefelsäure
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer
- Detektion im ELISA-Reader bei 350 nm oder durch quantitative Bildaufnahme in einem Fluoreszenzmikroskop

#### 4.4.4.2 Siebdruck-ELISA

Ein Siebdruck-ELISA wurde nicht in einer Mikrotiterplatte, sondern auf einem Siebdrucknetz in der Diffusionsvorrichtung durchgeführt

##### Standardprotokoll

- Zuschneiden der Siebdrucknetze in Quadrate mit ca. 0,5 cm Kantenlänge für den Einsatz in Mikrotiterplatten oder 1,1 cm für die Verwendung in der Diffusionsvorrichtung
- Reinigen der Siebdrucknetze in Ethanol/Isopropanol/Aceton (1:1:2)
- Beladen der Netze durch 16 h Inkubation mit 100 µl aufgereinigtem Anti-IL8-Antikörper (1 µg/ml in PBS)
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer und Trockenschütteln des Netzes
- Blockieren der Netze durch 60 min Inkubation in Blockpuffer (4% BSA in PBS)
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette
- 3 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer und Trockenschütteln des Netzes

Alternativ kann das Siebdrucknetz in einer Diffusionsvorrichtung oder in einer Mikrotiterplatte verwendet werden.

##### Anwendung in einer Mikrotiterplatte

- Blocken der Mikrotiterplatte für 60 min mit 250 µl Blockpuffer (4% BSA in PBS)
- 3 x Waschen der Platte mit je 250 µl Waschpuffer
- Einlegen des vorbehandelten Netzes in ein Well der Platte
- Inkubation für 60 min mit IL8-haltiger Lösung (100 µl zu untersuchende Probe mit 100 µl Blockpuffer)
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes
- Einlegen des Netzes in ein weiteres Well
- Inkubation für 60 min mit 200 µl biotinyliertem Anti-IL8-Antikörper (1 µg/ml in Blockpuffer)

- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes

### Anwendung in einer Diffusionsvorrichtung

- Einlegen des vorbehandelten Netzes in die Diffusionsvorrichtung
- Aufsetzen und Verschrauben des Deckels
- Einsetzen der Diffusionsvorrichtung in ein mit Agarose vorbefülltes Well einer 12-Well-Platte
- Einpipettieren der Diffusionslösungen in die Zugabeschlitze
- Bedecken der 12-Well-Platte mit einem feuchten Tuch und luftdichtes Verschließen der Platte
- Lagern der Platte bei Raumtemperatur für 3 bis 120 h bis zur Einstellung des Gradienten
- Inkubation für 1 bis 6 h mit 400 µl Zellsuspension im Mittelbereich der Diffusionsvorrichtung mit einer Zelldichte von 600.000 Zellen pro ml
- Entnahme und Öffnen der Diffusionsvorrichtung
- Entnahme des Siebdrucknetzes und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes
- Einlegen des Netzes in ein mit BSA geblocktes Well einer 12-Well-Platte
- Inkubation für 60 min mit 400 µl biotinyliertem Anti-IL8-Antikörper (1 µg/ml in Blockpuffer)
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes

Wie beim Sandwich-ELISA in Kapitel 3.2.1 kann nun entweder mit Streptavidin-HRP oder einem AP-gelabelten Antibiotin-Antikörper weitergearbeitet werden. Je nach Größe des Netzes wird eine 96-Well-Mikrotiterplatte oder eine 12-Well-Platte verwendet, wobei die Wells mit BSA-Lösung vorinkubiert werden.

Die benötigten Mengen für die größeren Netze (Anwendung in der Diffusionsplattform) werden für den Detektionsschritt in Klammern angegeben.

#### Detektion mit Meerrettich-Peroxidase

- Inkubation in einem Well für 60 min mit 200 µl (400 µl) Streptavidin-gelabelter Meerrettich-Peroxidase (0,25 µg/ml in Phosphatasepuffer)
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes
- Inkubation mit 100 µl (300 µl) MTB-Lösung (unverdünnt) für 5 min
- Stoppen der Reaktion mit 100 µ einer 1 molaren wässrigen Schwefelsäure
- Detektion von 150 µl Überstand im ELISA-Reader bei 450 nm

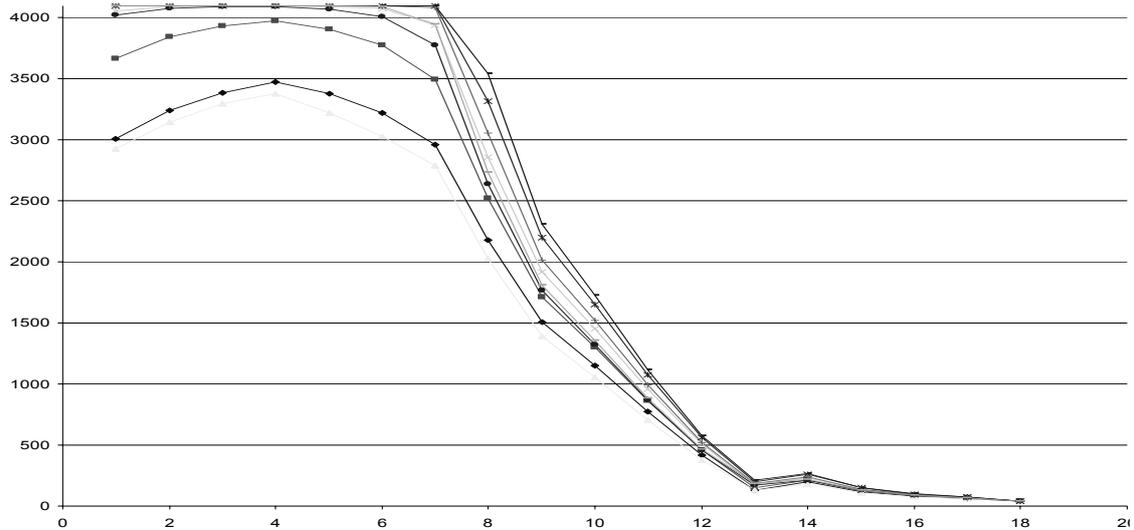
#### Detektion mit Alkalischer Phosphatase

- Inkubation für 60 min mit 100 µl (300 µl) Antibiotin-Antikörper gelabelt mit Alkalischer Phosphatase (0,5 µg/ml in Phosphatasepuffer)
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes
- Inkubation für 3 bis 10 min mit ELF-97-Phosphat Lösung (1:50 Verdünnung der Stammlösung)
- Stoppen der Reaktion mit 0,1 molarer wässriger Schwefelsäure
- Entnahme des Netzes mit einer Pinzette und 3 x Waschen mit Waschpuffer
- Trockenschütteln des Netzes
- Detektion der Fluoreszenz auf der Netzgitteroberfläche im ELISA-Reader bei 350 nm oder durch quantitative Bildaufnahme in einem Fluoreszenzmikroskop

### **4.4.5 Auswertung der Gradienten**

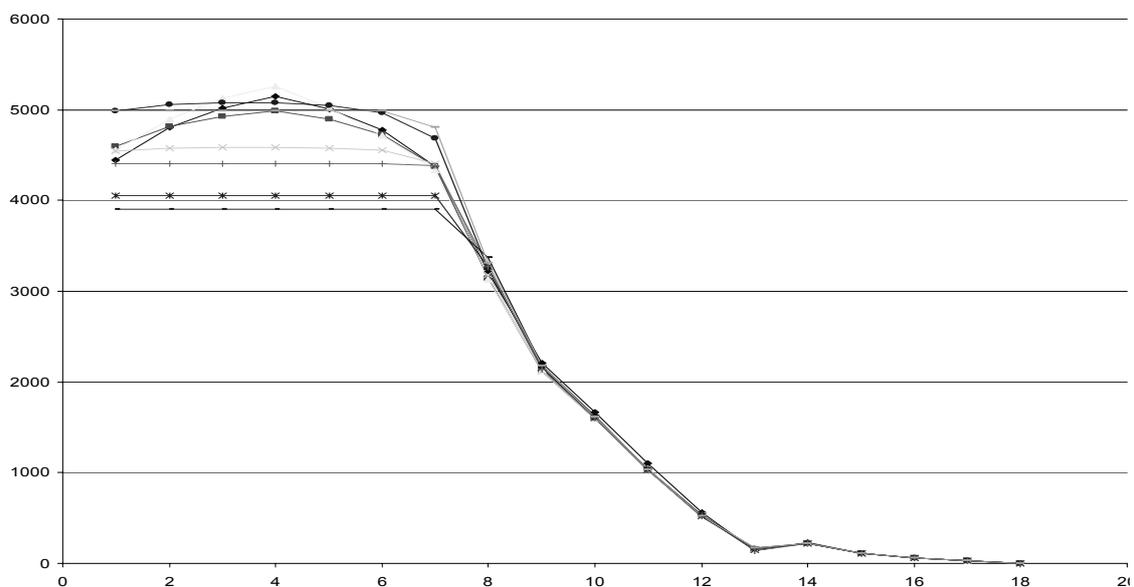
#### **4.4.5.1 Auswertung von Bildern**

Alle Bilder wurden mit Image Pro Plus ausgewertet, indem in jedem der Bilder je neun Messzonen (9-Zonen-Messung) mit 100 x 100 Pixel Größe auf die mittlere Pixelintensität vermessen wurde (Abb.4.18). Um eventuelle Inhomogenitäten in der Ausleuchtung des Fluoreszenzaufnahme auszugleichen, wurden Bilder eines homogen fluoreszenten Substrats aufgenommen und Kalibrationswerte berechnet, womit man die einzelnen Zonen-Intensitäten ineinander umrechnen konnte. Die mittlere Zone wurde stets als Referenzwert 1 gesetzt.



**Abb.4.18: Nicht kalibrierte Primärdaten einer Bildreihe**

Die Intensitäten der einzelnen Messzonen wurden für jedes Bild einzeln aufgetragen.

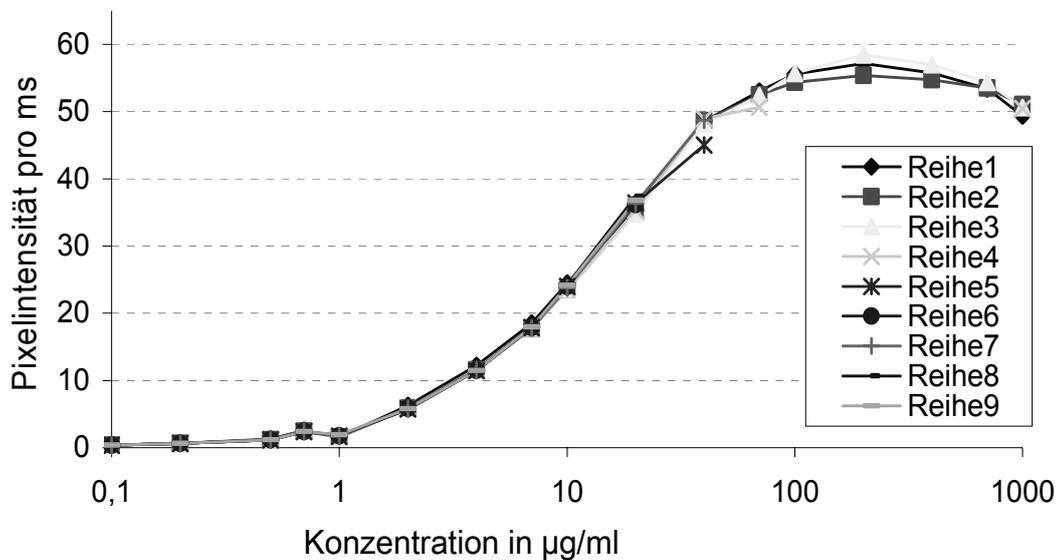


**Abb.4.19: Kalibrierte Daten der Bildreihe aus Abb.4.18**

Die Kalibrierung der Messzonen gegeneinander zeigte, dass nahezu identische Kurven generiert wurden. Abweichungen entstanden nur bei „gesättigten“ Werten, wenn die Primärwerte höher als 4096 waren (waagrechte Linien, Bild 1-7).

Mit dieser Kalibrierung wurden die einzelnen Bilder dann vermessen und entsprechend ihrer Position im Gradienten eine ortsabhängige Intensitätskurve erstellt (Abb.4.19). Die verwendete CCD-Kamera (PCO Computer Optics, Kelheim, Deutschland) arbeitete mit 12 Bit Pixeltiefe und lieferte damit eine maximale Intensität von 4095. Daher wurden nur Primärwerte bis maximal 3250 (80% der Maximalsättigung) verwendet. Nach der Kalibrierung wurden die Bilder

den entsprechenden Konzentrationen zugeordnet und die erzeugte Intensität pro Pixel und Millisekunde Belichtungszeit berechnet (Abb.4.20).



**Abb.4.20: Zugeordnete Konzentrationen zur Bildreihe Abb.4.19**

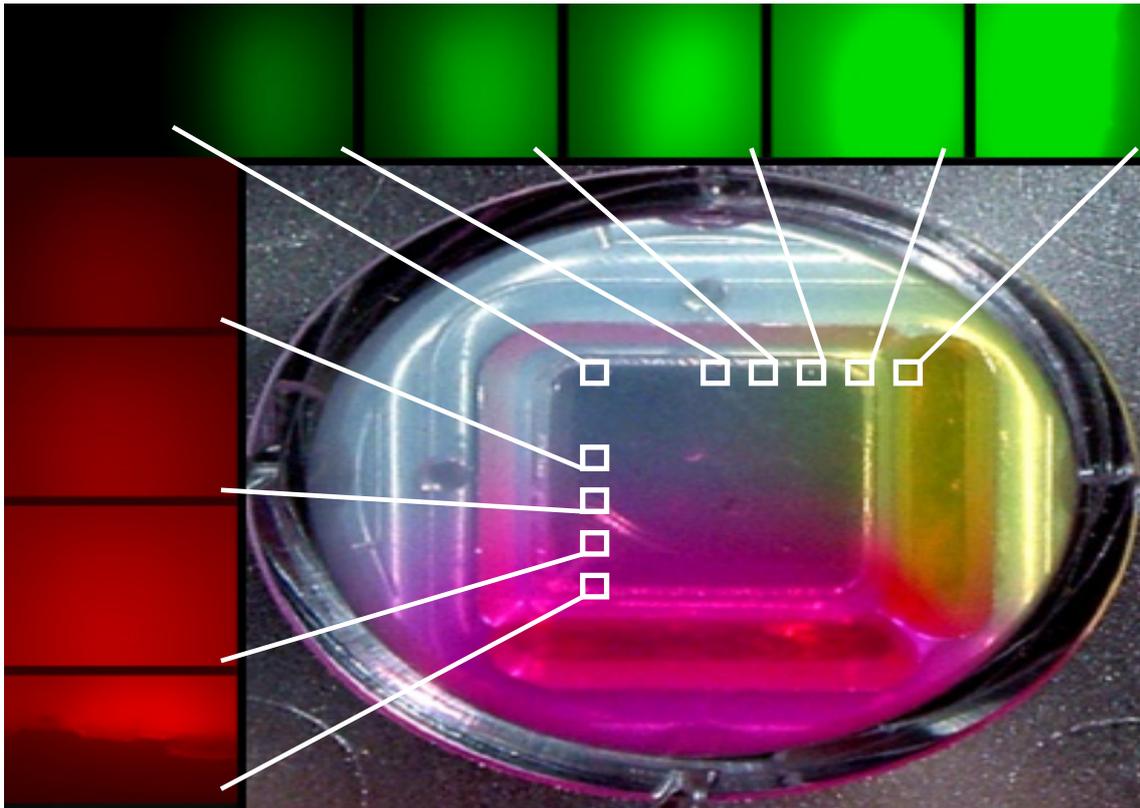
Nach Kalibrierung und Löschung der gesättigten Werte wurden die Bilder den Konzentrationen zugeordnet. Die Intensitäten wurden auf 1 ms Belichtungszeit zurückgerechnet.

Durch Variation der Belichtungszeit war es so möglich über 6 Größenordnungen hinweg den Gradienten zu vermessen. Das erhaltene Kamerasignal wurde entsprechend der Aufnahmezeit mit dem Dunkelstrom verrechnet.

#### 4.4.5.2 Auswertung eines Gelgradienten

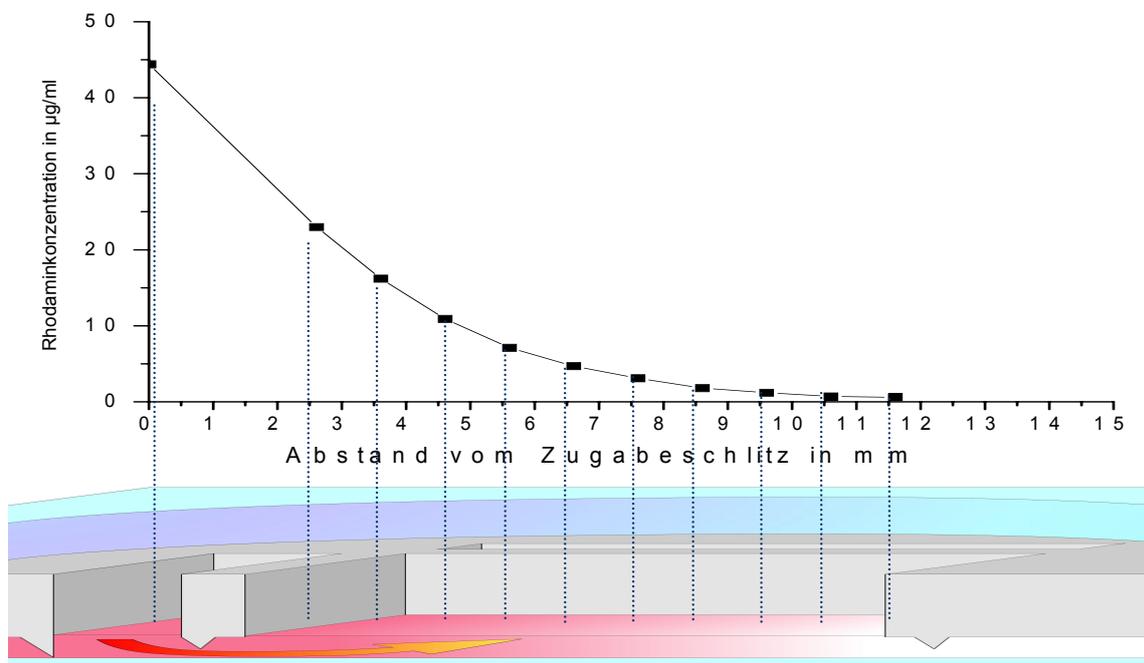
Für Bilder von Gelen wurde das Mikroskop zuerst auf die Oberfläche des Gels scharf gestellt und dann der Fokus 200 µm in das Gel hineinerschoben. In dieser Tiefe wurden dann die Bildaufnahmen gemacht.

Der xy-Tisch des Mikroskops wurde in die linke untere Ecke des abzurasternden Bereichs gefahren und die aktuelle Position auf (0/0) gesetzt. Dann wurden mit dem Rasterprogramm die Abstände und die Anzahl der Bilder pro Reihe und Spalte festgelegt. Die Bilderfassung und Speicherung erfolgt dann vollautomatisch. Die Namen der Bilddateien enthielten die jeweilige Position des Bildes im Raster, wodurch die genaue Lage im Gradienten (Abb.4.21 und Abb.4.22) zugeordnet werden konnte.



**Abb.4.21: Bildaufnahme eines Gelgradienten**

Die Bildaufnahme erfolgte automatisch. Einzelne Bildpositionen oder abzukursterendes Gebiet, mit Angabe des Bildabstandes und der Zahl der Bilder, wurden vor dem Start eingegeben.



**Abb.4.22: Beispiel eines zugeordneten Konzentrationsgradienten**

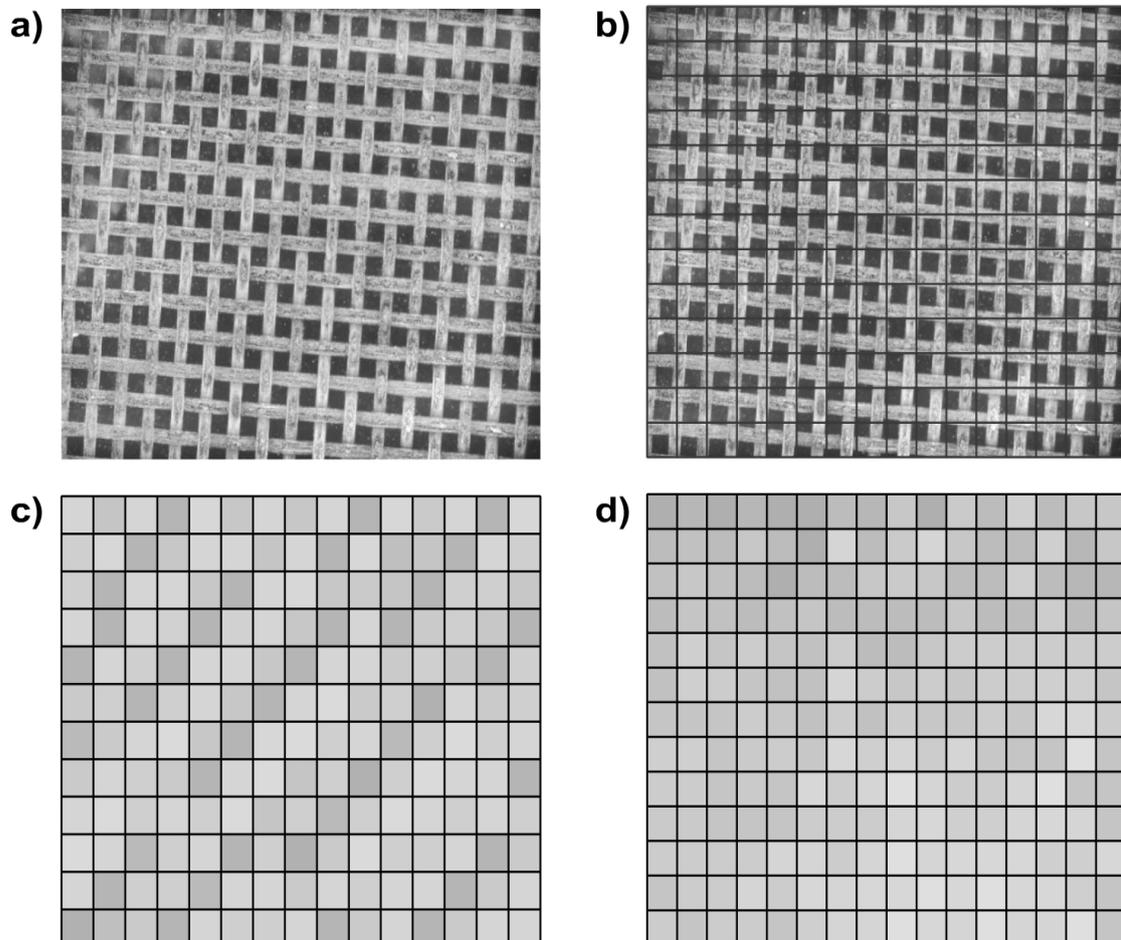
Entsprechend der Namen der Bilddateien konnte jeder Position eine Konzentration im Gradienten zugeordnet werden.

Die Bilder wurden dann entsprechend Kapitel 4.5.5.1 mit der 9-Zonen-Messung ausgewertet und die Werte in ein Excelfile übertragen.

#### 4.4.5.3 Auswertung eines Netzgradienten

Wurde ein Gradient der auf einem Siebdrucknetz erzeugt, dann wurde dieses Netz planar zwischen zwei Objektträgern eingespannt und im Fluoreszenzmikroskop sowohl ein Fluoreszenzbild, als auch ein Durchlichtbild aufgenommen.

Um den Gradienten zu erfassen, wurde die Einheitszelle des Gitters anhand des Durchlichtbildes mit einem Raster-Suchalgorithmus bestimmt. Dieser zerlegt das Gitter in Einheitszellen und bestimmt das Intensitätssignal dieser Zellen. Stimmt die projizierte Einheitszelle nicht mit der wirklichen Einheitszelle überein so entsteht ein Moiré-Muster. Der Algorithmus\* variiert die Einheitszelle so lange bis dieser Moiré-Effekt minimiert ist (Abb.2.23).

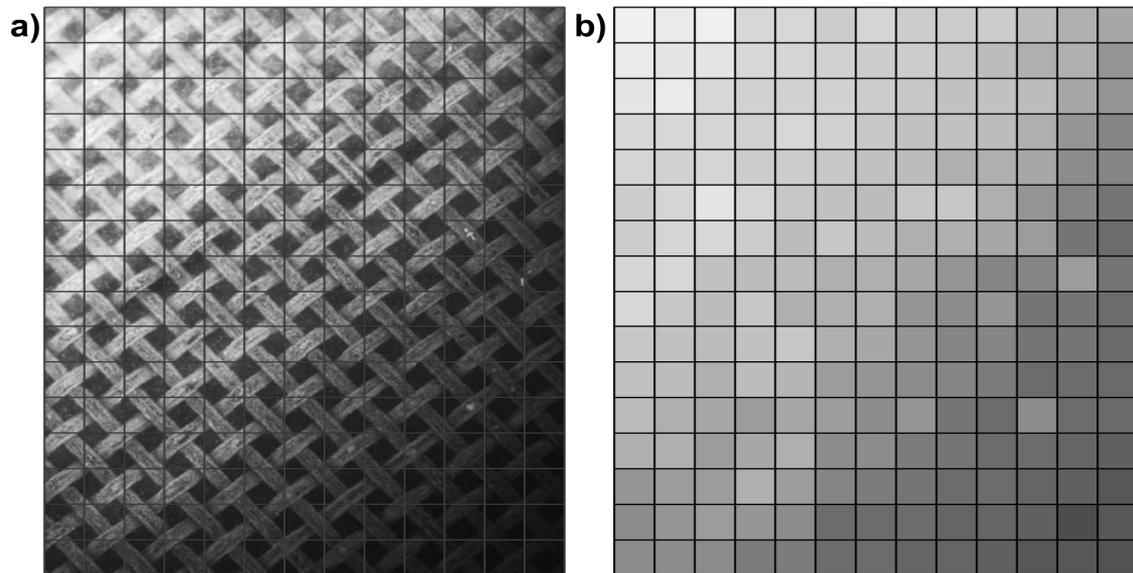


**Abb.4.23: Anwendung des Einheitszellenalgorithmus (programmiert von F. Wilks)**

Der Algorithmus zerlegt das Bild (a) in Einheitszellen (b) und ermittelt das Helligkeitsintegral (c+d). Ist die angenommene Einheitszelle zu groß (c) oder zu klein, entsteht stets ein Moiré-Muster, das durch regelmäßige „Maserung“ ins Auge sticht. Bei einem homogen ausgeleuchteten Bild erzeugt nur eine Einheitszelle des Gitters auch ein homogenes Signal. Nach Ermitteln der Einheitszelle wird das Netz orts aufgelöst ausgewertet (d) und man erhält ein homogenes Signal.

\* Programmierung nach entsprechenden Vorgaben durch Frank Wilks

Mit der so erhaltenen Einheitszelle wurde dann das Fluoreszenzbild (Abb.4.24) ausgewertet und die Werte in ein Excelfile transferiert.



**Abb.4.24: Auswertung eines Gradienten**

Nach Ermittlung der Einzelzelle wurde die Fluoreszenz (a) des Netzes ausgewertet und die mittlere Pixelhelligkeit in Form einer Matrix (b) abgebildet.

## 4.5 Methoden im Teilbereich Ubiquitinligand

Insgesamt wurden 4 unterschiedliche Messmethoden verwendet. Die Bindung des Ubiquitin-Liganden fand bei den FCS-Messungen knapp innerhalb des Detektionsbereiches statt und wurde erst durch die RIfS-Messungen hinreichend bestätigt. ITC-Messungen wurden zum Vergleich des hier identifizierten Binders mit Literaturwerten <sup>[18;337]</sup> durchgeführt.

Abschließend konnte mittels HCSQ-NMR die Interaktionsfläche von Ubiquitin mit dem Liganden identifiziert werden.

### 4.5.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die FCS-Messungen wurden in 3-fach Bestimmung entsprechend 4.2.2.3 durchgeführt. Gesättigte Lösungen aller Verbindungen wurden mit PBS-Puffer hergestellt und mit einem identischen Volumen an Puffer verdünnt. Die so erzeugten Stammlösungen wurden für alle folgenden Messungen verwendet.

### 4.5.2 Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (RIfS)\*

Für die kovalente Anbindung auf die Transduceroberfläche wurden Cystein-haltige Peptide synthetisiert.

#### 4.5.2.1 Herstellung der Transducer

Vor der Messung wurden die Peptide kovalent auf die Lichtwellenleiter (Transducer) gebunden.

#### Standardprotokoll

- Waschen des RIfS-Lichtwellenleiters mit 6 N NaOH für 1 min
- Mehrfaches Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>18MΩ</sub>

---

\* Durchführungen der Messungen durch Dr. Bernd Möhrle und Goran Markovic (Arbeitskreis Prof. Dr. Gauglitz, Tübingen)

- Ultraschall-Behandlung mit einer Lösung aus Schwefelsäure/30% Wasserstoffperoxid (3:2) zur Aktivierung der Oberfläche
- Mehrfaches Waschen mit  $H_2O_{18M\Omega}$  und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Silanisierung mit GOPTS für 60 min
- Waschen in wasserfreiem Aceton und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Kupplung mit einer wässrigen AMD-Lösung für 12 h
- Mehrfaches Waschen mit  $H_2O_{18M\Omega}$  und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Inkubation der Oberfläche mit 6-Maleinimidokaprinsäure-N-succinimidylester in wasserfreiem DMF (200mg/ml) für 12 h in einer Inkubationskammer, die zuerst mit Schutzgas geflutet und dann mit DMF-Dampf gesättigt wurde.
- Mehrfaches Waschen mit DMF und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Inkubation der Oberfläche mit Cystein-haltigem Peptid in wasserfreiem DMF (200 mg/ml) für 12 h in einer Inkubationskammer, die zuerst mit Schutzgas geflutet und dann mit DMF-Dampf gesättigt wurde.
- Mehrfaches Waschen mit DMF und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Licht- und staubfreie Lagerung der Transducer bis zur Verwendung

### 4.5.2.2 Durchführung einer RfS-Messung

Für die Messung wurde eine Durchflusszelle verwendet.

#### Standardprotokoll

- Einlegen des Transducers und verschließen der Durchflusszelle
- Äquilibrierung des Transducers für 30 min mit dem verwendeten Puffer
- Einleiten der Ovalbuminlösung und Messung der unspezifischen Interaktion
- Einleiten der Hochsalzlösung zur Regenerierung
- Einleiten des verwendeten Puffers bis zur Äquilibrierung
- Wiederholtes Einleiten von Ubiquitinlösungen mit unterschiedlicher Konzentration und Messung. Jeweils gefolgt von Regenerierung und Äquilibrierung

Die Messdaten wurden in ein Origin-File übertragen.

### 4.5.3 Mikroarrays

Auf den Mikroarrays wurden Alanin-Scans und X-Scans, des als Ubiquitinbinder identifizierten Peptids über eine N-terminal gekoppeltes Cystein immobilisiert.

#### 4.5.3.1 Herstellung der Mikroarrays

##### Standardprotokoll

- Waschen des Glaträgers mit  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$
- Ultraschall-Behandlung mit einer Lösung aus Schwefelsäure/30% Wasserstoffperoxid (3:2) zur Aktivierung der Oberfläche
- Mehrfaches Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Silanisierung mit APTES für 120 min
- Waschen in wasserfreiem Aceton und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Inkubation der Oberfläche mit 6-Maleinimidokapronsäure-N-succinimidylester in wasserfreiem DMF (200 mg/ml) für 12 h in einer Inkubationskammer, die zuerst mit Schutzgas geflutet und dann mit DMF-Dampf gesättigt wurde.
- Mehrfaches Waschen mit DMF und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Herstellen des Mikroarrays durch Absetzen von konzentriertem Cystein-haltigen Peptid in DMF mittels des GESIM Nanoplotter 2.0 auf der Oberfläche
- Mehrfaches Waschen mit DMF und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Licht- und staubfreie Lagerung der Mikroarrays bei 4°C bis zur Verwendung

#### 4.5.3.2 Anwendung der Mikroarrays

Die Bindung von Ubiquitin wurde durch Fluoreszenz detektiert. Hierfür stand ein Fluorescein-gelabelter Antiubiquitin-Antikörper und Fluorescein-gelabeltes Ubiquitin zur Verfügung, die jeweils im Mittel mit einem Fluorescein gelabelt waren.

#### Standardprotokoll für Fluorescein-gelabeltes Ubiquitin

- Überschichten des Mikroarrays mit Blockpuffer für 60 min
- 3 x Waschen mit Waschpuffer und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Fluorescein-gelabeltem Ubiquitin in Blockpuffer für 60 min
- 3 x Waschen mit Waschpuffer und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Vermessen im Fluoreszenzmikroskop

#### Standardprotokoll für ungelabeltes Ubiquitin

- Überschichten des Mikroarrays mit Blockpuffer für 60 min
- 3 x Waschen mit Waschpuffer und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Ubiquitin in Blockpuffer für 60 min
- 3 x Waschen mit Waschpuffer und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Inkubation mit Fluorescein-gelabeltem Antiubiquitin-Antikörper
- 3 x Waschen mit Waschpuffer und Trockenblasen mit einem Gasstrom
- Vermessen im Fluoreszenzmikroskop

### **4.5.4 Isothermale Kalorimetrie (ITC)\***

Für die Messungen wurden Cystein-haltige und fluoreszente Peptide synthetisiert. Die Messungen wurden im Reinraum mit einem Thermal Activity Monitor TAM2277 und einer eingebauten 500  $\mu\text{l}$  Hamilton-Spritze sowie einem 650  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäß durchgeführt.

#### Standardprotokoll

- Lösen von Ubiquitin (1-40  $\mu\text{M}$ ) in PBS
- Lösen des Peptids (20-40  $\mu\text{M}$ ) in PBS
- Vorlegen einer der beiden Lösungen im Reaktionsgefäß
- Befüllen der Hamilton-Spritze mit der jeweils anderen Lösung
- Thermale Äquilibrierung bis eine konstante Basislinie gemessen wird
- Wiederholte Zugabe eines Tropfens (10-20  $\mu\text{l}$ ) aus der Hamilton-Spritze in das Reaktionsgefäß und Vermessung des Temperaturverlaufs

---

\* Durchführung der Messung durch Frau Karin Wöllner (Arbeitskreis Prof. Dr. Gauglitz, Tübingen)

- Auswertung mit der mitgelieferten Software DIGITAM 4.1

Die Messungen wurden kalibriert und korrigiert anhand von identisch durchgeführten Messungen, in denen die Ubiquitin-Lösung bzw. die Peptid-Lösung „nur“ gegen PBS-Puffer vermessen wurden.

#### **4.5.5 Kernresonanz-Messungen (HSQC-NMR)\***

Es wurde ein Bruker DRX 600 Spektrometer mit einem Kryoprobenkopf für [<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H]-Heteronukleare-Einzel-Quanten-Korrelations-Messungen (HSQC) verwendet. Die Störungen der chemischen Verschiebung wurden mit Spektralweiten von 8.333 Hz (<sup>1</sup>H) und 2.189 Hz (<sup>15</sup>N) und einer Auflösung von 14.859 komplexen Datenpunkten aufgenommen.

Die [<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H]-HSQC-Spektren von Ubiquitin in Gegenwart von Peptid wurden stets gegen Spektren mit identisch behandeltem Ubiquitin ohne Peptid referenziert.

Es wurde stets 150 µM Ubiquitin in 150 mM PBS-Puffer, pH 6,8 vermessen und im Falle einer Zugabe von Peptid ein 20-facher Peptidüberschuss erzeugt.

---

\* Durchführung der Messungen durch Dr. Stefan Freund (Arbeitskreis Prof. Dr. Fersht, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, England)

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse und Resultate für die drei Themen-Teilbereiche getrennt dargestellt:

- Entwicklung, Herstellung und Anwendung von LIPODOT-Arrays
- Entwicklung und Anwendung der Diffusionsvorrichtung
- Identifizierung eines Ubiquitin-interagierenden Peptids

Zu Beginn jedes Kapitels wird zuerst die grundsätzliche Idee bzw. die Modellvorstellung des Aufbaus skizziert und die wesentlichen technischen Erfordernisse aufgezeigt. Deren Entwicklung wird in den Unterkapiteln dann jeweils ausführlich besprochen.

### 5.1 LIPODOT-Array und SMA

Folgende Namensdefinitionen werden in diesem Teilbereich verwendet.

Ein **LIPODOT** ist eine meist kreisförmige Struktur (DOT) auf einer hydrophoben Oberfläche, die ihrerseits durch hydrophobe bzw. lipophile Interaktion (LIPO) auf dieser Oberfläche fixiert ist.

Eine **LIPODOT-Verbindung** ist ein Molekül, das in der Lage ist, sich über hydrophobe Wechselwirkungen auf einer hydrophoben Oberfläche zu verankern und besitzt üblicherweise eine Komponente, die eine molekulare Wechselwirkung eingehen kann, und damit als Interaktionspartner verwendet werden kann.

Ein **Statistisches Mikroarray (SMA)** ist ein Mikroarray, das im Gegensatz zu üblichen Mikroarrays keine (zumeist rechteckige) periodische Ordnung besitzt, sondern eine rein statistische (aber noch quasiperiodische) Anordnung der chemischen Komponenten besitzt.

### 5.1.1 Modellvorstellung des LIPODOT-Transfer

Bisherige Mikroarraytechniken sind dadurch limitiert, dass man die interagierenden Moleküle einzeln vor Ort synthetisiert oder an diesen Ort bringt. Der Zeitaufwand dieses Vorgehens ist proportional zur Anzahl der unterschiedlichen Verbindungen und der Anzahl der Spots auf dem Mikroarray. Die hier entwickelte Methode ist unabhängig von der Anzahl der Verbindungen oder der generierten Spots.

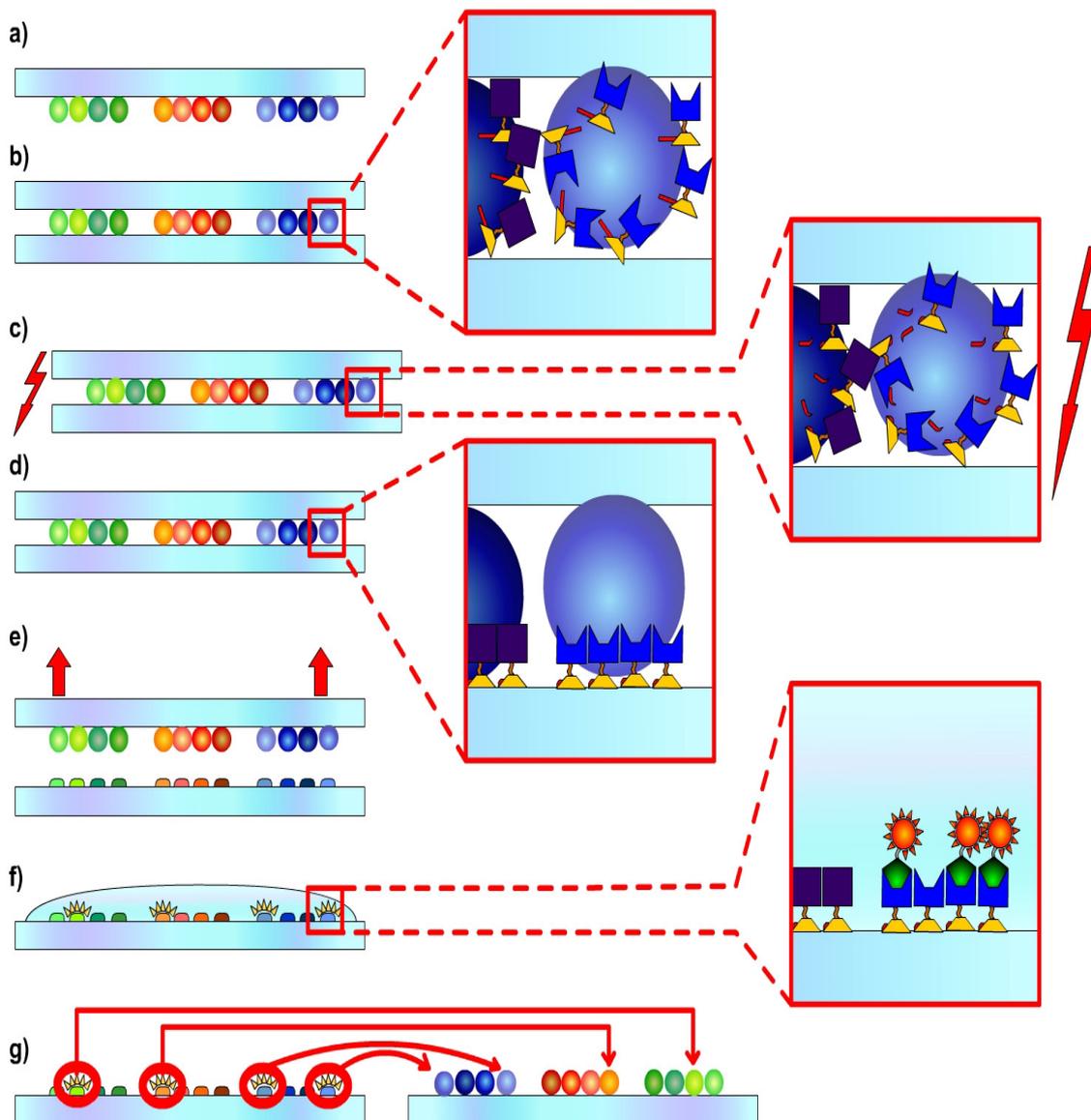
#### 5.1.1.1 Grundkonzept der Transfertechnik

Auf Polymerträgern (Beads) wird zuerst eine Verbindungskollektion nach der Split-Mix-Methode (one bead – one compound – Konzept) aufgebaut. Die Synthesebeads werden zu einer Monolayer auf einem planaren Träger, der **Carrier Plate** (Abb.5.1a), angeordnet und dort immobilisiert. Die Anordnung selbst ist rein statistisch. Es ist jedoch möglich, eine partielle Ortsauflösung der Beads zu erreichen, indem einzelne Bereiche der Carrier Plate mit jeweils nur einer Teilkollektion beschichtet werden.

Die Beads werden befeuchtet und in Kontakt (Abb.5.1b) mit einem Träger, der **Assay Plate**, gebracht auf den die synthetisierten Verbindungen übertragen werden. Die Verbindungen werden durch einen äußeren Trigger (Abb.5.1c) vom Bead freigesetzt und diffundieren in den Flüssigkeitsfilm<sup>[338]</sup> um die Beads. Sobald sie in Kontakt mit der Trägeroberfläche kommen, verankern sie sich selbstständig<sup>[189;339]</sup> zu einer homogenen Monolayer (Abb.5.1d). So erzeugt jedes Bead an seiner Kontaktstelle genau einen **Dot** mit jeweils einer Verbindung und alle Beads übertragen ihre Einzelverbindung zeitgleich. Hierdurch kann man von einem one bead – one compound – one dot – Konzept sprechen. Jedem Spot kann sein erzeugendes Bead und damit die Einzelverbindung zugeordnet werden (Abb.5.1g). Die Carrier Plate wird dann von der Assay Plate getrennt (Abb.5.1e) und für einen weiteren Druck einer weiteren Assay Plate eingesetzt. So können von einer Carrier Plate mehrere Kopien hergestellt werden. Die Assay Plate selbst wird für Untersuchungen auf molekulare Interaktionen (Abb.5.1f), beispielsweise mit Rezeptoren, Antikörpern oder Enzymen eingesetzt.

Die Carrier Plate wird getrocknet, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden und so die Synthesebeads zu bewahren. Diese können im Idealfall für eine spätere Strukturaufklärung verwendet werden.

Nach Durchführung des Bindungstests auf der Assay Plate können als positiv bewertete Dots auf der Assay Plate mittels einer 1-zu-1-Allokation ihren Erzeugerbeads auf der Carrier Plate zugeordnet werden (Abb.5.1g).



**Abb.5.1: Schematische Darstellung der Übertragungstechnik**

Eine chemische Kollektion wird mittels Festphasensynthese aufgebaut und die monodispersen Beads werden auf einem planaren Träger (Carrier Plate) immobilisiert (a). Die Beads werden mit der Oberfläche der Assay Plate in Kontakt gebracht (b). Durch einen äußeren Trigger werden die Verbindungen freigesetzt (c) und auf die Assay Plate durch den Kontakt übertragen. Die Verbindungen besitzen eine chemische Gruppe, durch die sie sich auf der Assay Plate verankert (d). Nach Abheben der Carrier Plate bleibt ein chemischer „Abdruck“ der Beads auf der Assay Plate zurück (e). Die Assay Plate wird für einen Bindungstest eingesetzt (f) und beispielsweise fluoreszente Abdruckpunkte (Dots) werden ihren entsprechenden Beads zugeordnet (g).

### 5.1.1.2 Umsetzung als LIPODOT-Transfer

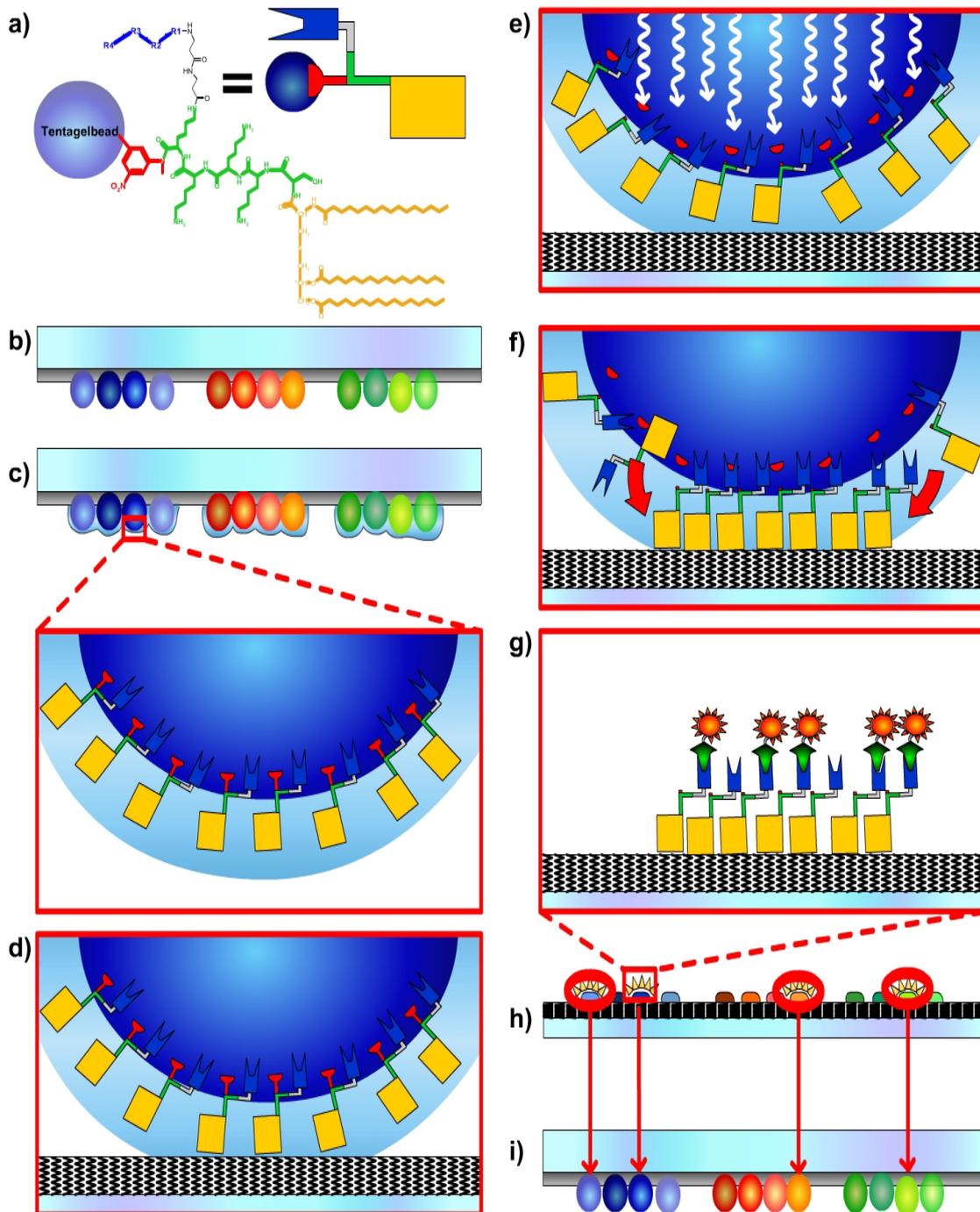
Auf den Polymerträgern wird zuerst eine UV-labile Gruppe (Photolinker) aufgebaut, gefolgt von einer Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Gruppe (Abb.5.2a). Erst danach erfolgt die Synthese der Verbindungen, die auf molekulare Interaktion getestet werden sollen. Mittels Pulverbeschichtung werden die Beads auf der Carrier Plate immobilisiert. Als Carrier Plate wird ein mit Klebstoff beschichtetes Polymer verwendet (Abb.5.2b).

Die hydrophilen Beads werden mit Wasser befeuchtet (Abb.5.2c) und die Carrier Plate mit einer hydrophoben Assay Plate in Kontakt gebracht (Abb.5.2d). Mittels UV-Licht wird die UV-labile Gruppe gespalten (Abb.5.2e) und die Verbindungen von den Beads freigesetzt. Die SK<sub>4</sub>-Gruppe sorgt für eine hinreichende Löslichkeit in Wasser, so dass die Verbindung im Wasserfilm diffundieren kann und nicht auf den Beads verbleibt.

Sobald die Verbindung jedoch auf die hydrophobe Oberfläche trifft, interagiert die Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe, vergleichbar dem Braunschen Lipoprotein, über hydrophobe Wechselwirkungen und verankert sich auf der hydrophoben Assay Plate (Abb.5.2f). Die Verankerung <sup>[340]</sup> führt zu einem Selbstorganisationsprozess, der mit einer Monoschicht (self-assembled monolayer) aus Verbindungen <sup>[276;278]</sup> abgeschlossen ist. Dieser als LIPODOT-Transfer bezeichnete Vorgang ist somit im Grunde genommen ein Phasentransfer, der durch eine photolytische Freisetzung initiiert wird. Die Monolayer besitzt dabei die Ausdehnung des Wassermeniskus auf der Assay Plate und wird als LIPODOT bezeichnet.

Um die Allokation zwischen der Assay Plate und der Carrier Plate zu gewährleisten, werden Beads mit fluoreszenten LIPODOT-Verbindungen beigefügt. Dieses dient als internes Koordinatensystem. Über das Muster der fluoreszenten LIPODOTs und das entsprechende Muster der fluoreszenten Beads ist eine 1-zu-1-Zuordnung (Allokation) zwischen den Beads und den erzeugten LIPODOTs möglich (Abb.5.2i).

Die Carrier Plate mit der Monolayer aus Beads kann nach nochmaligem Befeuchten für die Übertragung auf eine weitere Assay Plate verwendet werden. Auf diese Weise können mehrfache Kopien einer Carrier Plate hergestellt werden. Jede Assay Plate kann wie ein handelsübliches Mikroarray für die Messung molekularer Interaktionen <sup>[341]</sup> verwendet werden (Abb.5.2g+h).



**Abb.5.2: Darstellung der LIPODOT-Technik**

Eine Verbindungskollektion (blau) wird auf Beads (a) aufgebaut. Eine Pam<sub>3</sub>Cys-Lipoaminosäure (ocker) dient später als Ankergruppe und ein SK<sub>4</sub>-Pentapeptid (grün) vermittelt die Löslichkeit. Eine photoreaktive Gruppe (rot) dient zur Freisetzung der Verbindung durch UV-Licht als Trigger. Die Beads werden auf einem planaren klebstoffbeschichteten Polymer (Carrier Plate) immobilisiert (b) und befeuchtet, wodurch sich ein Wasserfilm bildet (c). Dieser erzeugt im Kontakt mit einer hydrophoben Assay Plate an jedem Bead einen Meniskus (d). Durch UV-Licht werden die Verbindungen freigesetzt (e) und diffundieren im Wasserfilm. Beim Kontakt mit der hydrophoben Assay Plate verankern sich die Lipoaminosäuren selbstständig zu einer kreisförmigen Monolayer (f), im Folgenden als LIPODOT bezeichnet. Danach kann ein Bindungstest auf der Assay Plate durchgeführt werden (g) und man ordnet dann die positiven LIPODOTs (h) ihren erzeugenden Beads durch eine 1-zu-1-Allokation zu (i).

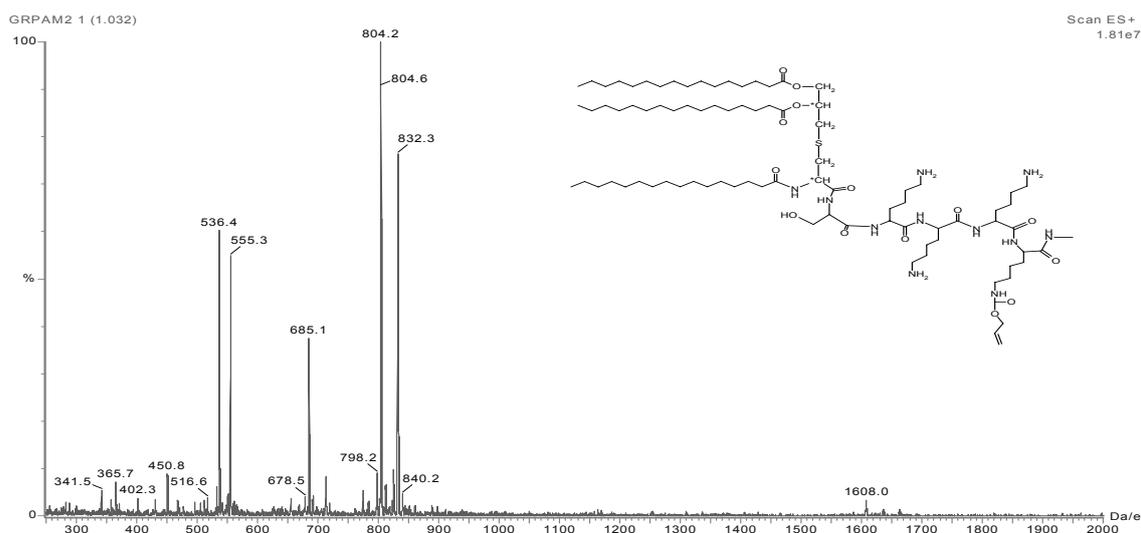
Prinzipiell sind auch andere Ausführungen der Transfertechnik entsprechend 5.1.1.1 denkbar. Jedoch ist die Kombination aus hydrophober Oberfläche und der Verwendung eines Wasserfilms als Diffusionsmedium eine sehr reizvolle Methode. Durch die Hydrophobizität der Assay Plate werden gleichzeitig die Kontaktmenisken des Wasserfilms um die Beads minimal, sie verfließen zudem nicht und es kommt zu einer spontanen hydrophoben Verankerung der Pam<sub>3</sub>Cys-Lipoaminosäure. Diese Kombination aus chemischen Eigenschaften der Verbindung, dem Lösungsmittel und der Assay Plate Oberfläche dient in optimaler Weise der Lösung der Fragestellung.

## 5.1.2 Synthesen

In diesem Kapitel ist eine Auswahl der wichtigsten synthetisierten Verbindungen dargestellt.

### 5.1.2.1 Synthese der Ankerverbindung

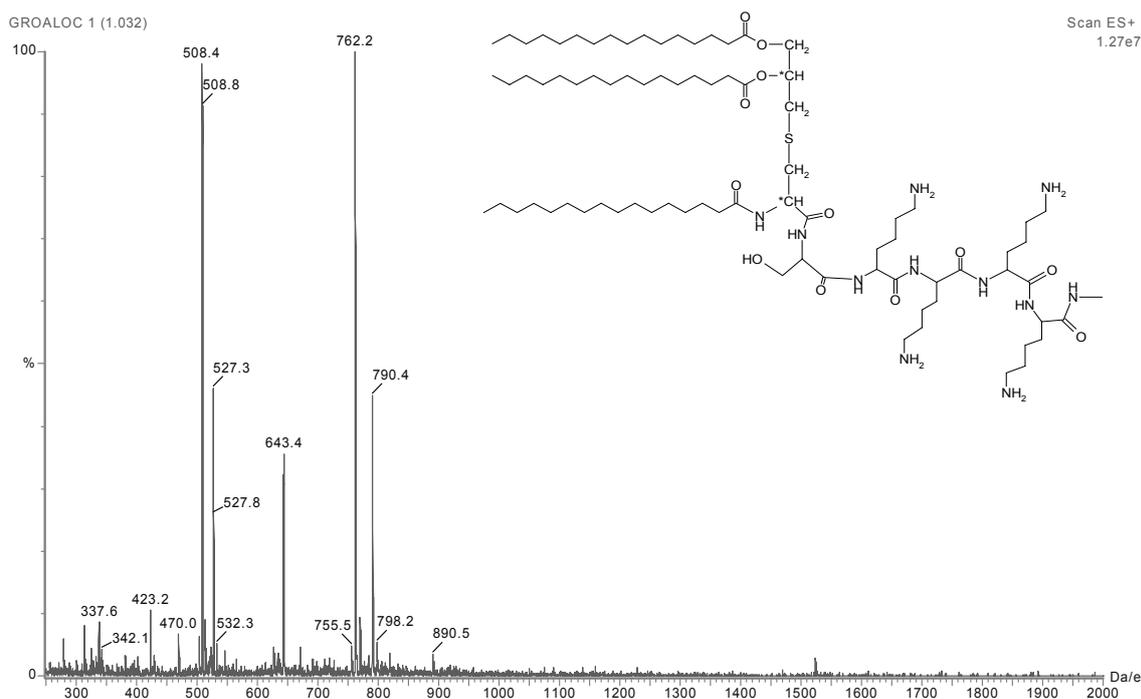
Die Ankerverbindung ist die Basis für alle weiteren Synthesen. Der Aufbau der SK<sub>4</sub>-Pentapeptid erfolgte mittels klassischer Fmoc/Boc-Schutzgruppen-Chemie. Kritische Schritte dieser Synthese waren die quantitative Kupplung von Pam<sub>3</sub>Cys-OH (4.2.1.3) und die quantitative Abspaltung der N<sup>ε</sup>-Aloc-Schutzgruppe vom C-terminalen Lysin (4.2.1.6).



**Abb.5.3: ESI-MS (Conespannung 35V) der Nebengruppen-entschützten Ankerverbindung vor der Aloc-Abspaltung**

Die kalkulierte Masse beträgt 1607,1 D. Dabei entspricht 1608,0 [M+H]<sup>+</sup>; 804,2 [M+2H]<sup>2+</sup>; 536,4 [M+3H]<sup>3+</sup> den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. Die Peaks bei 832,3 und 555,3 entsprechen ebenfalls dem Produkt, jedoch mit tBu-OH-Schutzgruppe am Serin. 685,1 ist ein MS-generiertes Despalmitoyl-Fragment des Produkts.

Daher wurde von jedem Batch jeweils ein Probe analysiert, um eine hinreichende Reinheit (Abb.5.3) für spätere Synthesestufen zu gewährleisten. Direkt vor Beginn der Synthese einer Kollektion wurde die N<sup>ε</sup>-Aloc-Schutzgruppe auf den Beads mit der Ankerbindung entfernt und analysiert (Abb.5.4). Bei hinreichender Reinheit wurden dann z.B. mit Fmoc-Aminosäuren Peptide, Farbstoffe oder andere Testverbindungen aufgebaut.

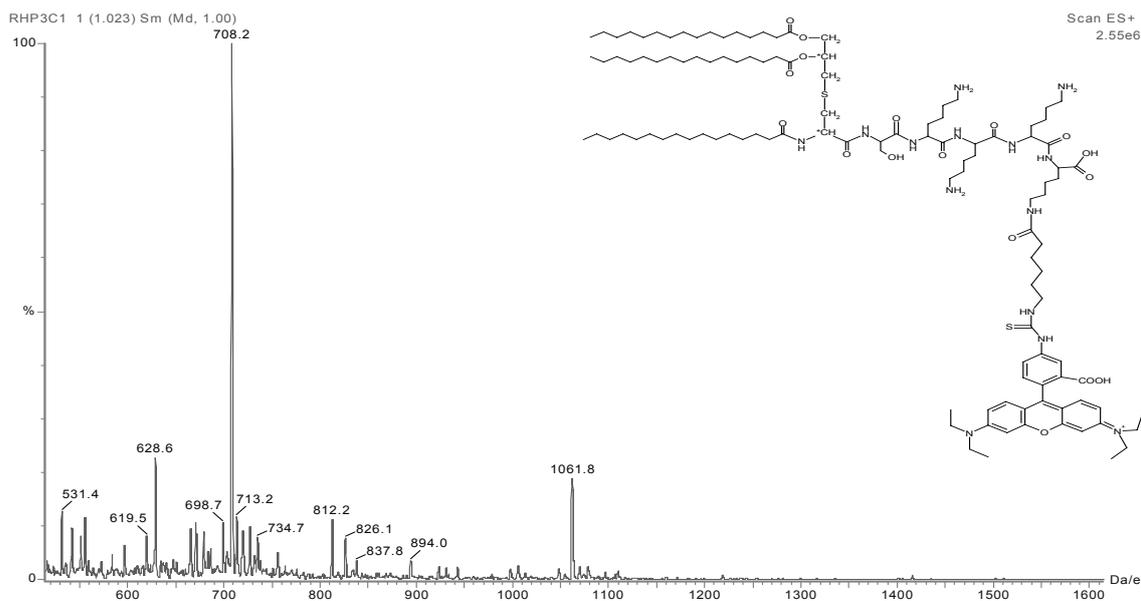


**Abb.5.4: ESI-MS (Conespannung 35V) der Nebengruppen und Aloc-entschützten Ankerbindung**

Die kalkulierte Masse beträgt 1522,6 D. Dabei entspricht 1524,5 [M+H]<sup>+</sup>; 762,2 [M+2H]<sup>2+</sup>; 508,4 [M+3H]<sup>3+</sup> den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. Die Peaks bei 790,4 und 527,3 entsprechen ebenfalls dem Produkt, jedoch mit tBu-OH-Schutzgruppe am Serin. 643,4 ist ein MS-generiertes Despalmitoyl-Fragment des Produkts.

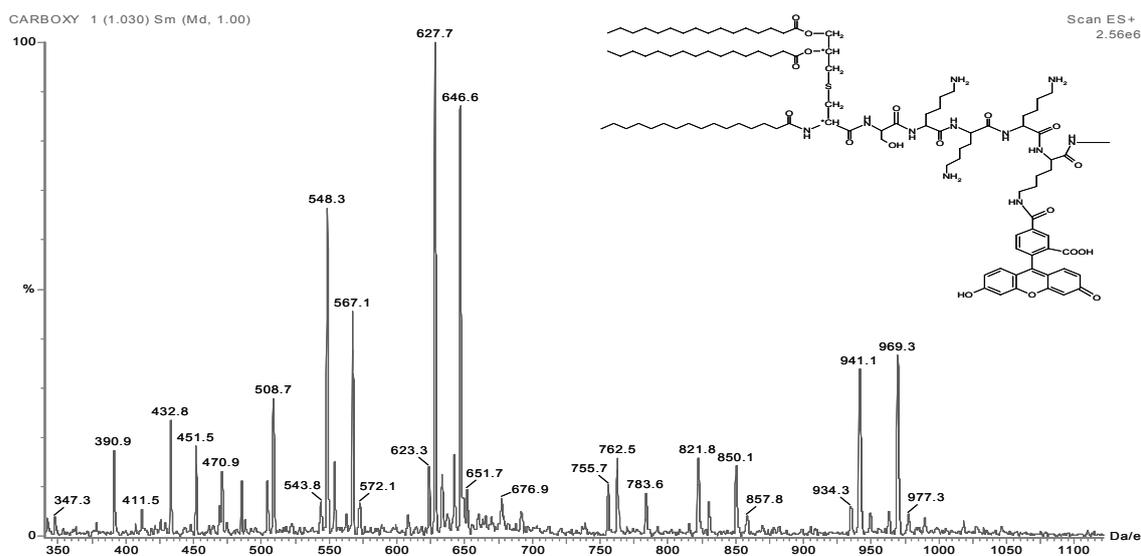
### 5.1.2.2 Synthese „definierter“ Verbindungen

Zu Kontrolle des LIPODOT-Transfers wurden fluoreszente Komponenten benötigt. So kann man nach einem LIPODOT-Transfer mit einem Fluoreszenzmikroskop direkt prüfen, ob entsprechend fluoreszente LIPODOTs auf der Assay Plate Oberfläche generiert wurden. Hierfür wurden Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(Ahx-5/6-Carboxy-Tetramethylrhodamin), **LIPODOT-Rhodamin**, und Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(5/6-Carboxy-Fluorescein)-NHMe, **LIPODOT-Fluorescein**, (Abb.5.6) synthetisiert und analysiert. Es wurden weitere Rhodamin- (Abb.5.5) und Fluoresceinderivate synthetisiert, die jedoch auf der gleichen Ankerbindung basieren.



**Abb.5.5: ESI-MS von Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(Ahx-Isothiocyano-Tetraethylrhodamin) (LIPODOT-Rhodamin)**

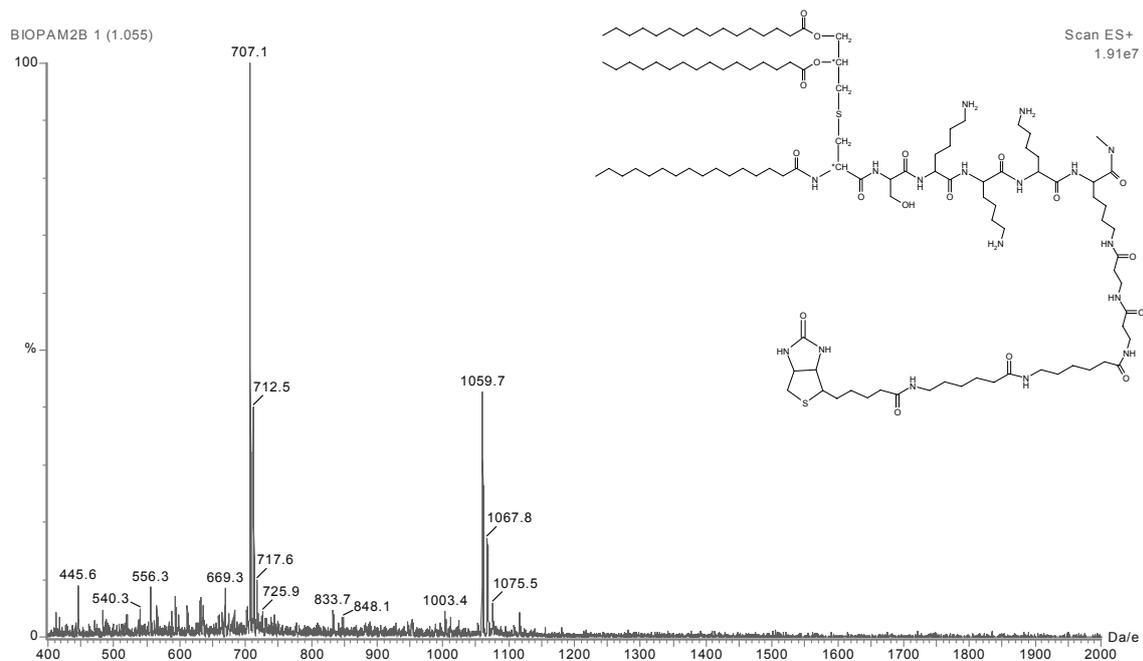
Die kalkulierte Masse beträgt 2124,1 D. Dabei entsprechen 1061,8 [M+2H]<sup>2+</sup>; 708,2 [M+3H]<sup>3+</sup>; 531,4 [M+4H]<sup>4+</sup> den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. 628,6 ist ein dreifachgeladenes MS-generiertes Despalmitoyl-Fragment des Produkts.



**Abb.5.6: ESI-MS von Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(5/6-Carboxy-Fluorescein)-NHMe (LIPODOT-Fluorescein)**

Die kalkulierte Masse beträgt 1881,1 D. Dabei entspricht 941,1 [M+2H]<sup>2+</sup>; 627,7 [M+3H]<sup>3+</sup>; 470,9 [M+4H]<sup>4+</sup> den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. 969,3; 646,6; und 485,3 enthalten noch die tBu-OH-Schutzgruppe am Serin. 821,8; 548,3 und 411,5 ist ein Despalmitoyl-Fragment, ebenso entsprechen 850,1 und 567,1 dem Despalmitoyl-Fragment, besitzen aber noch eine tBu-OH-Schutzgruppe. Trotz dieser unvollständigen Entschützung ist das Derivat für einen LIPODOT-Transfer geeignet.

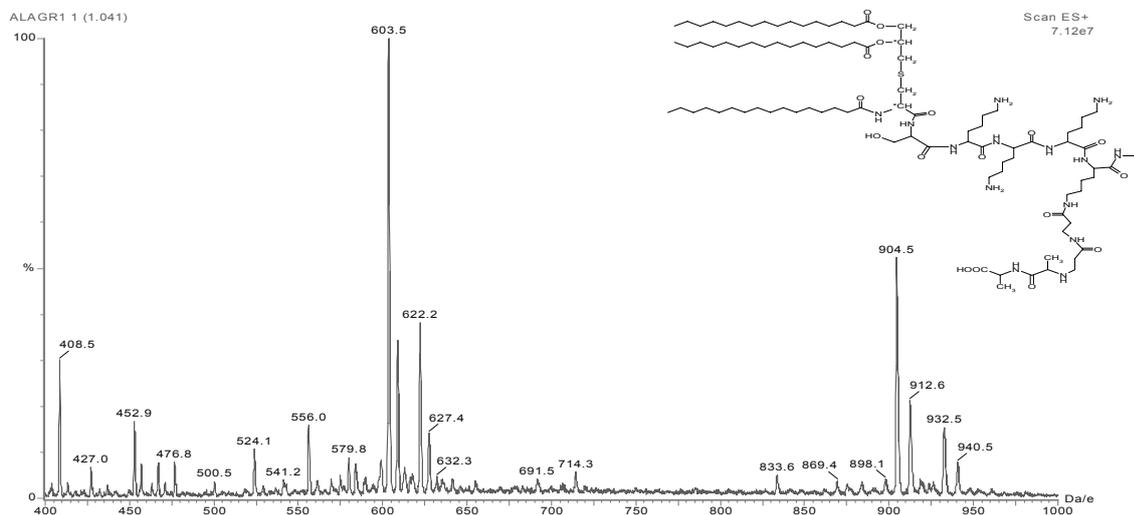
Für erste molekulare Interaktionen mit Antikörpern und Streptavidin wurden unterschiedliche LIPODOT-Biotinderivate wie Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(β-Ala-β-Ala-Ahx-Ahx-Biotin)-NHMe (Abb.5.7) oder Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(Ahx-Ahx-Biotin)-NHMe synthetisiert.



**Abb.5.7: ESI-MS von Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(β-Ala-β-Ala-Ahx-Ahx)-NHMe (LIPODOT-Biotin)**

Die kalkulierte Masse beträgt 2118,1 D. Dabei entspricht 1059,7 [M+2H]<sup>2+</sup>; 707,1 [M+3H]<sup>3+</sup> den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. 712,5 und 1067,8 ist das einfach oxidierte Produkt. 1075,5 und 717,6 ist das zweifach oxidierte Produkt. Die Menge an oxidierten Produkten nimmt mit der Bestrahlungsdauer des UV-Lichts zu.

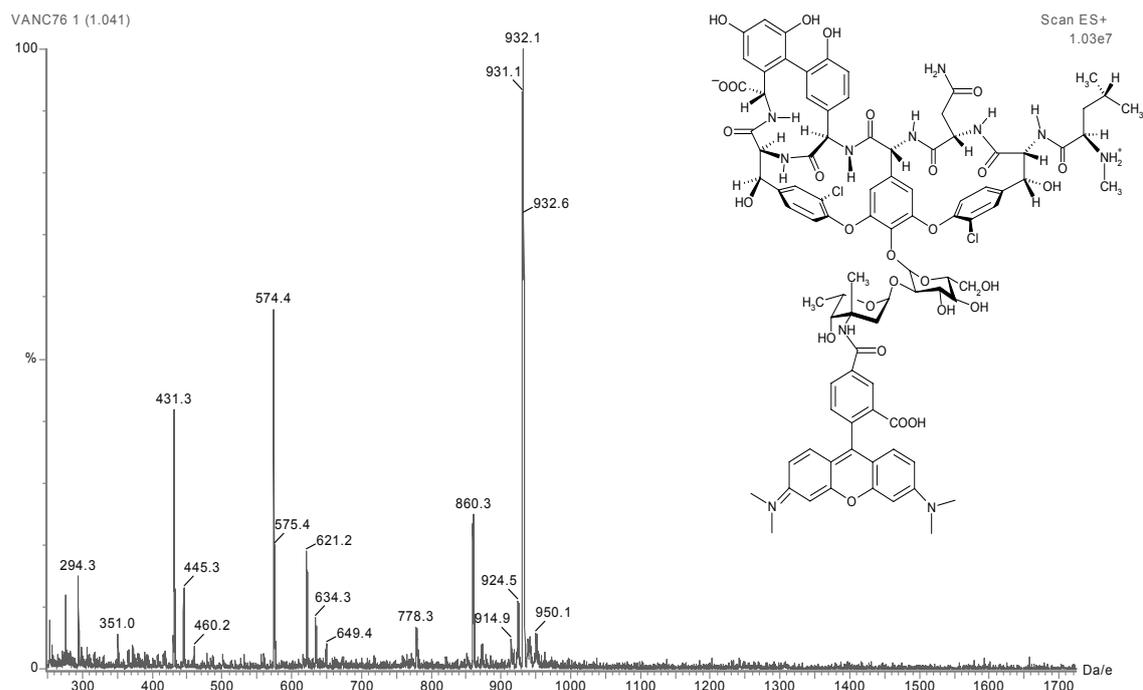
Für weitere Bindungsmessungen wurde zudem ein Vancomycin-TAMRA\* (Abb.5.8) und der zugehörige Bindungspartner Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(β-Ala-β-Ala-D-Ala-D-Ala)-NHMe (Abb.5.9) synthetisiert.



**Abb.5.8: ESI-MS von Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(β-Ala-β-Ala-D-Ala-D-Ala)-NHMe**

Die kalkulierte Masse beträgt 1807,4 D. Dabei entspricht 904,5 [M+2H]<sup>2+</sup>; 603,5 [M+3H]<sup>3+</sup>; 452,9 [M+4H]<sup>4+</sup> den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. 932,5; 622,2 und 467,2 enthalten noch die tBu-OH-Schutzgruppe am Serin. 524,1 ist ein Despalmitoyl-Fragment. Trotz dieser unvollständigen Entfernung der Schutzgruppen ist das Derivat für einen LIPODOT-Transfer geeignet.

\* Hergestellt von Herr Dr. Martin Elbs (Arbeitskreis Priv. Doz. Brock, Tübingen)



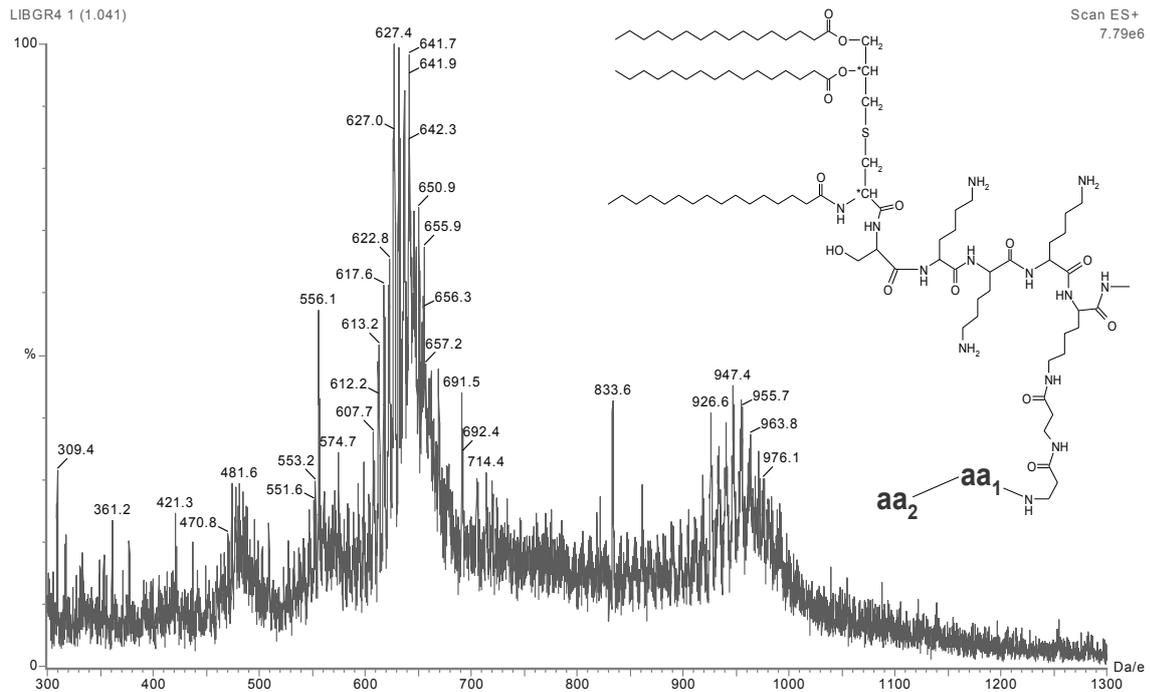
**Abb.5.9: ESI-MS von Vancomycin-TAMRA**

Die kalkulierte Masse beträgt 1861,8 D. Dabei entspricht 931,1  $[M+2H]^{2+}$ ; 621,2  $[M+3H]^{3+}$  den mehrfach geladenen Ionen des Produkts. Eine Verunreinigung mit einer Masse von ca. 1720 D ist auch über Peaks 860,3; 574,4 und 431,3 nachweisbar und konnte strukturell nicht näher charakterisiert werden. Mittels FCS- und Mikroarray-Messungen wurde die Aktivität des Derivats nachgewiesen..

### 5.1.2.3 Dipeptid-Kollektion

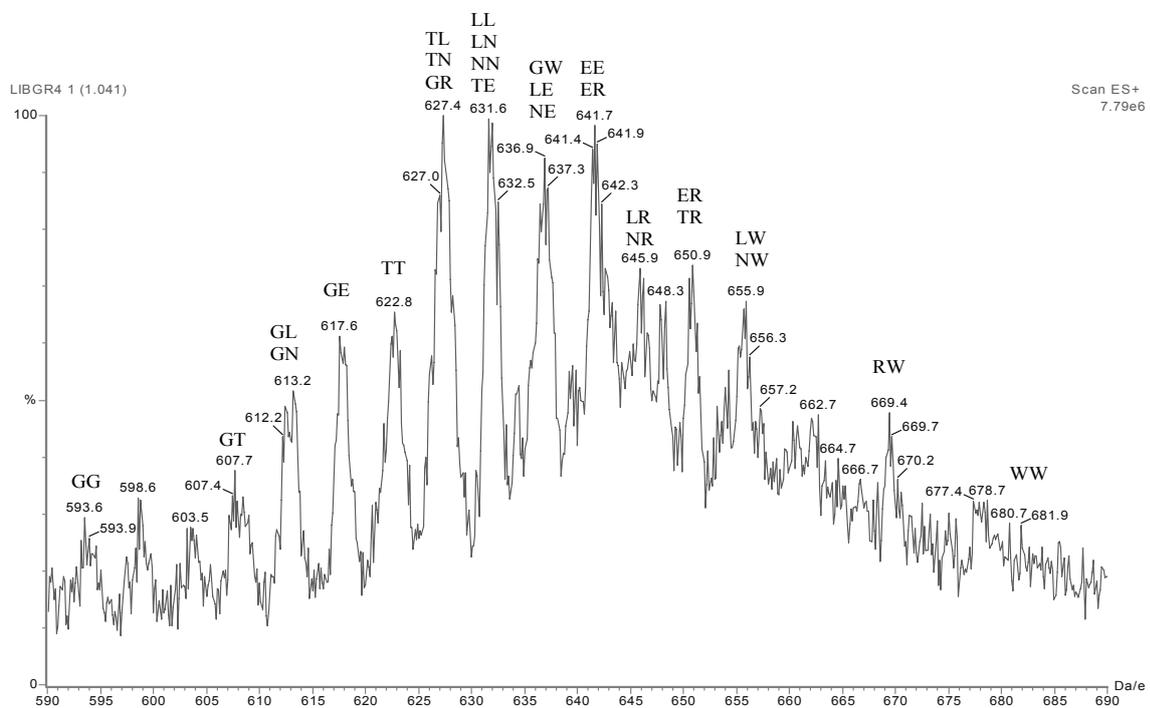
Mit Tentagel-Harz (500 mg) wurde die Logistik für eine Split & Mix-Kollektion mit den proteinogenen 20 Aminosäuren etabliert. Hierzu wurde zuerst auf dem gesamten Harzbatch die Ankerverbindung aufgebaut. Anschließend wurde auf je 20 Reaktoren das Harz in Suspension gleichmäßig verteilt und entsprechend je eine Aminosäure pro Reaktionsgefäß gekuppelt (4.2.1.2). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Harzportionen vereinigt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (4.2.1.5). Identisch hierzu wurde der zweite Split & Mix-Schritt durchgeführt und abschließend alle Schutzgruppen abgespalten (4.2.1.7). Die Beads wurden vereinzelt (4.3.1) und man erhielt insgesamt 572 mg Harz. Bei einer mittleren Masse von ~2000 D und einer Belegung von 0,22 mmol/g Harz liegt rechnerisch die Gesamtausbeute bei ~720 mg. Die 150 mg Materialverlust lassen sich durch die Anlagerung der 20  $\mu\text{m}$  durchmessenden Beads an Oberflächen erklären.

Von der erhaltenen Dipeptid-Kollektion mit der Diversität 400 wurde eine Probe abgespalten (4.2.1.8) und analysiert (Abb.5.10 und Abb.5.11).



**Abb.5.10: ESI-MS der Dipeptid-Kollektion (aa=beliebige Aminosäure)**

Die kalkulierte mittlere Masse beträgt 1892 D. Das Spektrum ist typisch für eine Kollektion. Um die Masse 947 liegen alle  $[M+2H]^{2+}$  und um 632 alle  $[M+3H]^{3+}$  Peaks. Die Verteilung der Peaks hat eine Gaußform. Eine Verunreinigung mit den Peaks 833,6 und 556,1 entspricht einer Gesamtmasse von 1665,2. Dies würde einer Ankerverbindung mit Aloc- und tBu-OH-Schutzgruppe entsprechen.



**Abb.5.11: Vergrößerung des  $[M+3H]^{3+}$ -Peaks aus Abb.5.10**

Die kalkulierte mittlere Masse beträgt 1892 D. Einige der  $[M+3H]^{3+}$ -Peaks wurden für einzelne Aminosäurenkombinationen der Kollektion zugeordnet. Es wurden hierfür die Aminosäuren G,T, N, L, E, R, W ausgewählt. G ist die leichteste Aminosäure und W die schwerste. N und L entsprechen der mittleren Masse einer Aminosäure. Die Höhe der Peaks stimmt mit der Häufigkeit der möglichen Aminosäurenkombinationen (Isobare) überein.

Es ist davon auszugehen, dass bei der Synthese weiterer Kollektionen die Gesamtmasse der Beads deutlich langsamer zunimmt, als zu erwarten wäre. Die Verluste an Beads durch Absorption an Oberflächen lassen sich dabei kaum minimieren. Daher empfiehlt es sich stets, mit entsprechend großen Mengen an Syntheseharz zu arbeiten.

Bei der Synthese auf 20  $\mu\text{m}$  Beads mussten zudem, im Gegensatz zu den Protokollen mit ähnlichen Synthesebeads von 90 bis 130  $\mu\text{m}$  Durchmesser, verlängerte Inkubationen bei den Wasch- und Kupplungsschritten eingehalten werden.

Nach dieser Maßnahme konnte für alle LIPODOT-Derivate, die nach 4.2.1 synthetisiert wurden, eine entsprechend hohe Reinheit für den LIPODOT-Transfer erreicht werden.

#### 5.1.2.4 $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion

Von der EMC microcollections GmbH wurde entsprechend den Angaben des Kooperationspartners Novartis IST (Wien) eine  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion <sup>[342]</sup> synthetisiert. Hierfür wurde auf 5 g Syntheseharz (Tentagel, 20  $\mu\text{m}$ ,  $\text{NH}_2$ -funktionalisiert, 0,19 mmol/g) zuerst die Ankerverbindung aufgebaut und nach der Abspaltung der Aloc-Gruppe die nun freie  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins mit zwei mal Fmoc- $\beta$ -Ala umgesetzt.

Auf diesem  $\text{Pam}_3\text{Cys-SK}_3\text{K}(\beta\text{-Ala-}\beta\text{-Ala})\text{-NHMe}$  Grundkörper wurde dann eine Tetrapeptid-Kollektion der Form  $\text{Pam}_3\text{Cys-SK}_3\text{K}(\beta\text{-Ala-}\beta\text{-Ala-R}^1\text{-R}^2\text{-R}^3\text{-R}^4\text{-NH}_2)\text{-NHMe}$  aufgebaut. Hierbei waren  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^4$  jeweils eine  $\beta^3$ -Homo-Aminosäure und  $\text{R}^3$  eine „gewöhnliche“  $\alpha$ -Aminosäure. Für jede Position wurden je 17 Aminosäuren verwendet. Die  $\beta$ -Homo- und  $\alpha$ -Aminosäuren *Ile*, *His* und **Cys** wurden nicht verwendet. *Ile* wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu *Leu*. *His*, da es bisher als geschütztes Derivat nicht erhältlich ist. *Cys*, da es während der photolytischen Freisetzung Nebenreaktionen eingehen kann.

Für die komplette Kollektion ergibt sich somit eine Diversität von 83.521 ( $17^4$ ) verschiedenen Tetrapeptiden. Die Kollektion wurde durch Split & Mix-Synthese erzeugt. Jedoch wurde nach der Kupplung der Positionen  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  kein Mix-Schritt mehr durchgeführt, sondern in getrennten Reaktionsgefäßen die weiteren Syntheseschritte durchgeführt (Tab5.1).

**Tab.5.1: Nummerierung der LIPODOT-Teilkollektionen**

Eine kombinatorische Kollektion der Form Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(β-Ala-β-Ala-R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>-R<sup>3</sup>-R<sup>4</sup>-NH<sub>2</sub>)-NHMe wurde hergestellt. Die Nummerierung erfolgte anhand der beiden N-terminalen Aminosäurepositionen.

R <sup>4</sup>	A	D	E	F	G	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
D	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
E	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
F	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
G	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
K	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
L	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
M	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
N	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
P	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
Q	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
R	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
S	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221

Es wurden 289 (17<sup>2</sup>) verschiedene Teilkollektionen erzeugt, die durch ihre beiden N-terminalen Aminosäuren charakterisiert werden (Tab.5.1) und je 289 (17<sup>2</sup>) unterschiedlichen Verbindungen enthalten. Diese Kollektion wurde für Messungen molekularer Bindungen an ein Protein (Target) verwendet.

### 5.1.3 Oberflächenmodifizierungen

Zu Beginn der Doktorarbeit waren hydrophobe Oberflächen mit einem Kontaktwinkel von mehr als 95° kommerziell noch nicht erhältlich. Für die Verankerung der LIPODOT-Verbindungen wird ein möglichst hoher Kontaktwinkel benötigt. Daher wurden zwei Methoden zur Herstellung von hydrophoben Oberflächen evaluiert.

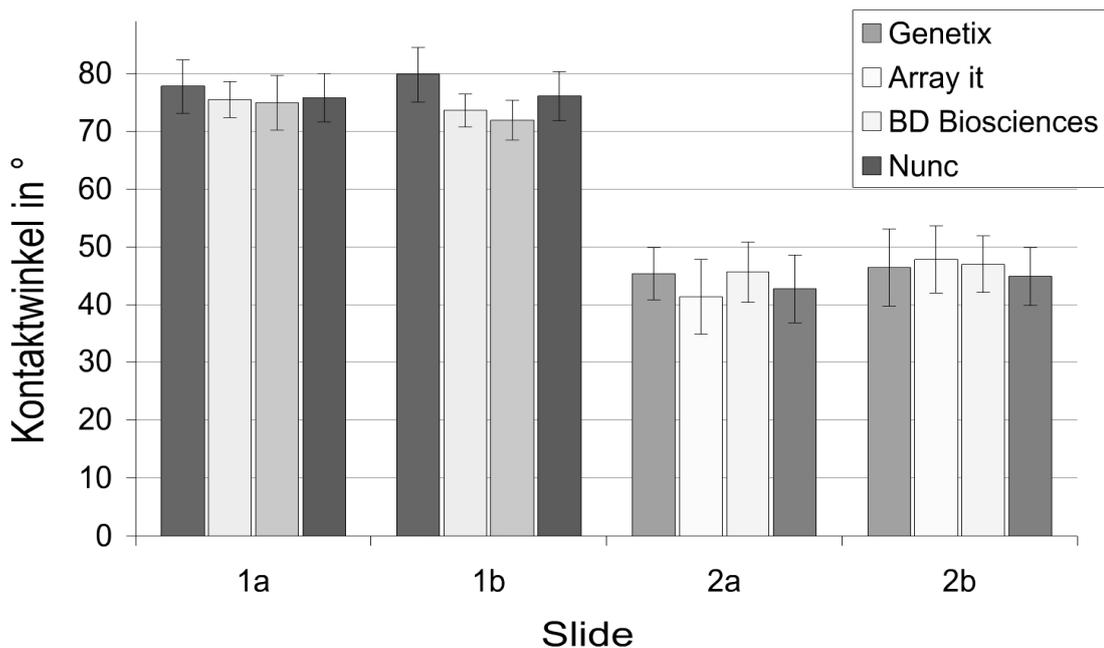
Zum einen sollten kommerziell erhältliche Aminosilanes hydrophobisiert werden, zum anderen sollte mittels einer Silanisierung direkt eine hydrophobe Schicht auf Mikroskopslides aufgebracht werden.

### 5.1.3.1 Funktionalisierung von kommerziellen Aminoslides

Von den Herstellern Nunc, Arraylt, BD Biosciences und Genetix wurden freundlicherweise jeweils 5 Aminoslides aus der Mikroarray-Herstellung kostenlos zur Verfügung gestellt. Keiner der Hersteller konnte Angaben über die Dichte der funktionellen Aminogruppen auf der Oberfläche geben. Die Qualität wird von den Herstellern stets über gleichbleibende Kontaktwinkel geprüft <sup>[332]</sup>, der bei Kontrollmessungen (4.4.4.) bei allen Aminoslides zwischen 27° und 31° liegt.

Die erhaltenen Proben waren unter Schutzgas luftdicht in einem Reinraum verpackt worden und wurden daher direkt vor der Reaktion aus dem Behältnis entnommen.

Entsprechend 4.4.3.1 wurden Modifikationen der Aminoslides mit Säurechloriden und DIC aktivierten Carbonsäuren durchgeführt. Exemplarisch wurden hierfür Hexadecansäure und Dodecansäure ausgewählt (Abb.5.12).



**Abb.5.12: Kontaktwinkelmessungen von hydrophobisierten Aminoslides**

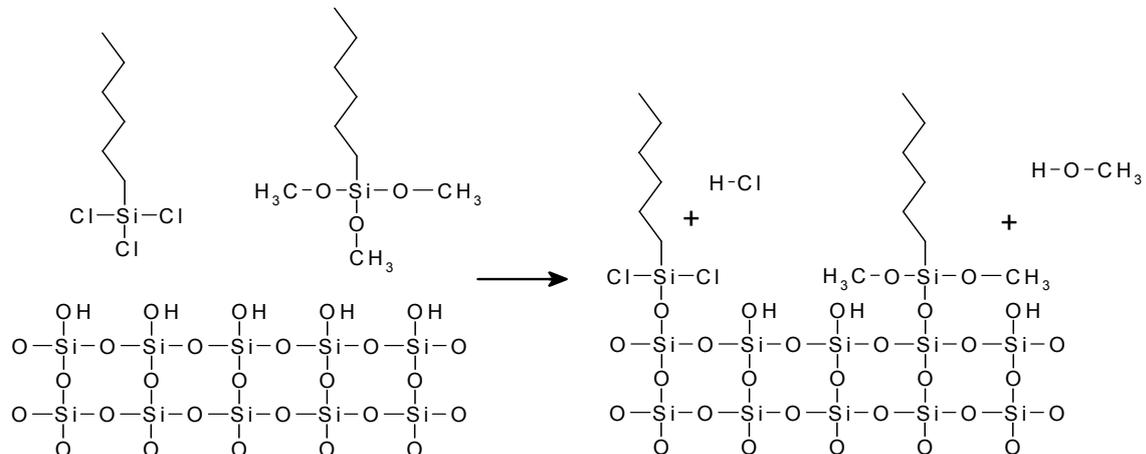
Die Aminoslides wurden mit Säurechloriden, Hexadecansäurechlorid (1a) und Dodecansäurechlorid (1b) und den entsprechenden DIC aktivierten Carbonsäuren, Hexadecansäure (2a) und Dodecansäure (2b) modifiziert.

Mit den Säurechloriden war es möglich Kontaktwinkel zwischen 65° und 90° zu generieren. Die Mittelwerte lagen um die 75°. Mit den aktivierten Carbonsäuren ergaben sich mittlere Kontaktwinkel um 45°.

Geht man vom ursprünglichen Kontaktwinkel der Aminoslides von 30° vor der Modifikation aus, so ist keine der beiden Methoden wirklich zufrieden stellend.

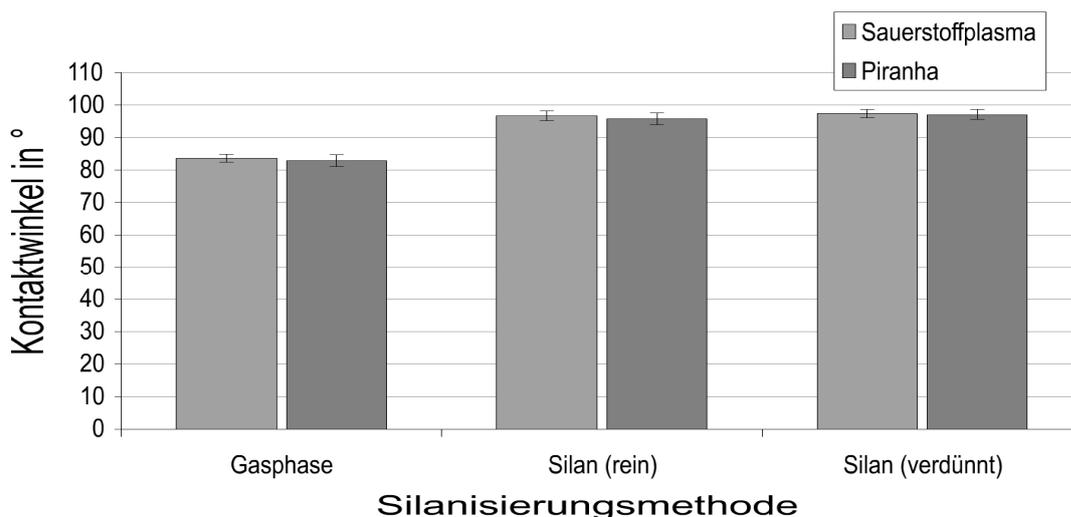
### 5.1.3.2 Erste Silanisierungen

Silanisierungen <sup>[332]</sup> werden für permanente Oberflächenmodifikationen verwendet. Dabei bindet das Silan stets an eine Hydroxy- oder Oxo-Gruppe an (Abb.5.13).



**Abb.5.13: Reaktion von Silanen mit Glas**

Oxide besitzen, wie Glas und unedlere Metalle beispielsweise Aluminium, Titan bis hin zu Chrom. Vor einer Silanisierung muss die Oberfläche jedoch gereinigt werden, um freie Hydroxy-Gruppen zu erzeugen. Als Reinigungsverfahren wurden entweder die physikalisch-chemische Reinigung durch ein Sauerstoffplasma oder die nasschemische Reinigung durch Piranha-Lösung verwendet. Beide Verfahren wurden mit je 3 Gläsern pro Methodenkombination erprobt und die in 4.3.3 beschriebenen Silanisierungsverfahren wurden angewendet (Abb.5.1)



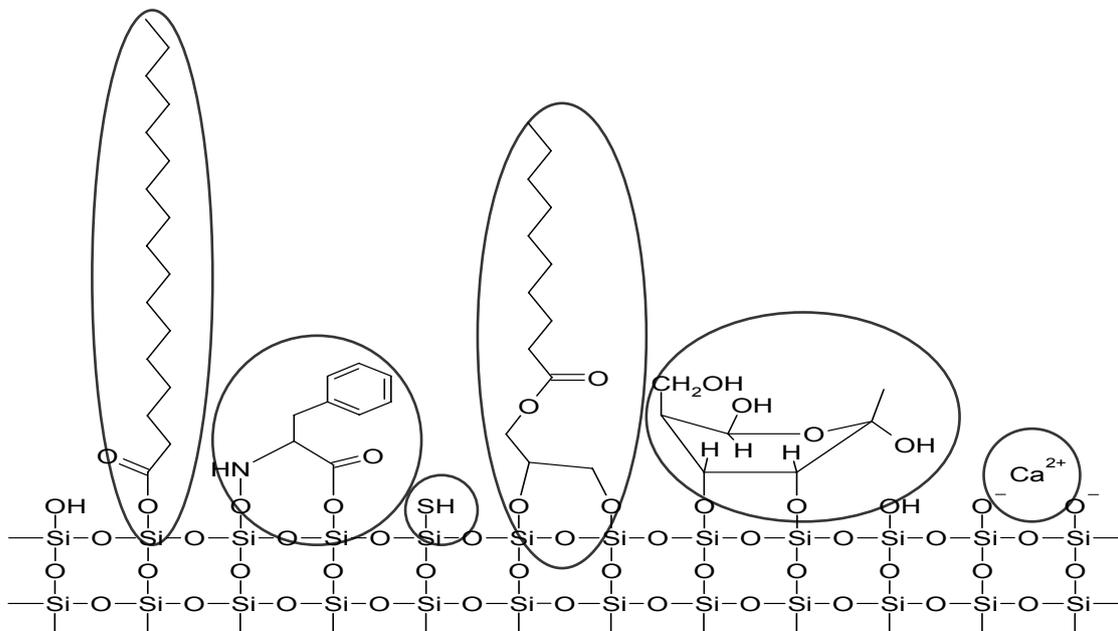
**Abb.5.14: Kontaktwinkelmessungen von zwei Reinigungs- und drei Silanisierungsmethoden**

Die Gläser wurden zuerst entweder mit Piranha oder Plasma gereinigt. Danach wurde die Silanisierung mit Hexadecyl-trimethoxy-silan entweder über Gasphase, mit reinem Silan oder in Toluol verdünntem Silan durchgeführt.

Vergleicht man die Kontaktwinkel mit den Ergebnissen der modifizierten Aminoslides ist klar, dass eine Silanisierung eine deutlich hydrophobere Oberfläche generiert. Weiterhin scheint es keinen Unterschied zwischen den beiden Reinigungsverfahren zu geben. Im Hinblick auf die Durchführung ist jedoch die Reinigung mit Piranha-Lösung im Labor deutlich weniger zeitaufwändig als die Plasmareinigung im Reinraum. Silanisierung über die Gasphase ist aufgrund des niederen Dampfdrucks des Silans deutlich ineffektiver als Flüssigphasensilanisierung. Weiterhin scheint es keinen Unterschied zu machen, ob das Silan unverdünnt oder mit Toluol verdünnt angewendet wurde. Daher wurden alle weiteren Silanisierungen mit Piranha-Lösung und verdünntem Silan durchgeführt.

### 5.1.3.3 Reinigung von Glasoberflächen mit Piranha-Lösung

Hierfür muss die Oberfläche zunächst gereinigt werden, da sich aus der Luft Kontaminanten <sup>[6,343]</sup> ablagern. Diese zumeist organischen Moleküle (Abb.5.15) benötigen zwar Minuten bis hin zu Jahren, um sich kovalent auf die Oberfläche zu binden, doch besetzen sie schon innerhalb von Sekunden die Oberfläche. Daher werden für hochhomogene und hochreine Oberflächen entsprechende Fertigungsstrassen im „weißen Bereich“ eines Reinraumes verwendet.



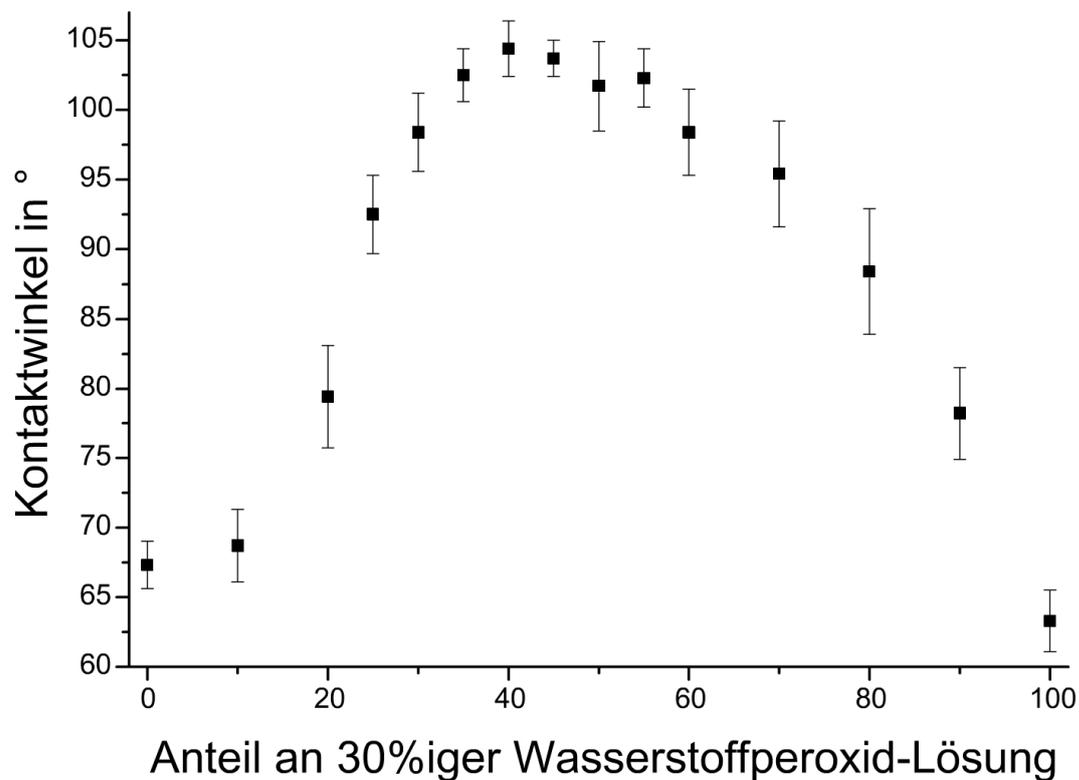
**Abb.5.15: Luftübertragene organische Kontaminationen <sup>[6]</sup>**

Die natürlichen Hydroxy-Gruppen von Gläsern (hier: Siliziumoxid) und Metallen reagieren mit unterschiedlichen zumeist biologischen Molekülen. Hierzu zählen (von links nach rechts) Fettsäuren, Aminosäuren, Schwefelaustausch, Polyalkohole, Zucker und komplexierte Kationen.

Zur Reinigung von Oberflächen von organischen und metallischen Kontaminationen stehen zwei gleichwertige Verfahren zur Verfügung. Bei beiden Verfahren ist der Kontaktwinkel direkt nach der Reinigung bei 10° bis 15°. Ungereinigte Gläser besitzen einen Kontaktwinkel zwischen 60° und 70°.

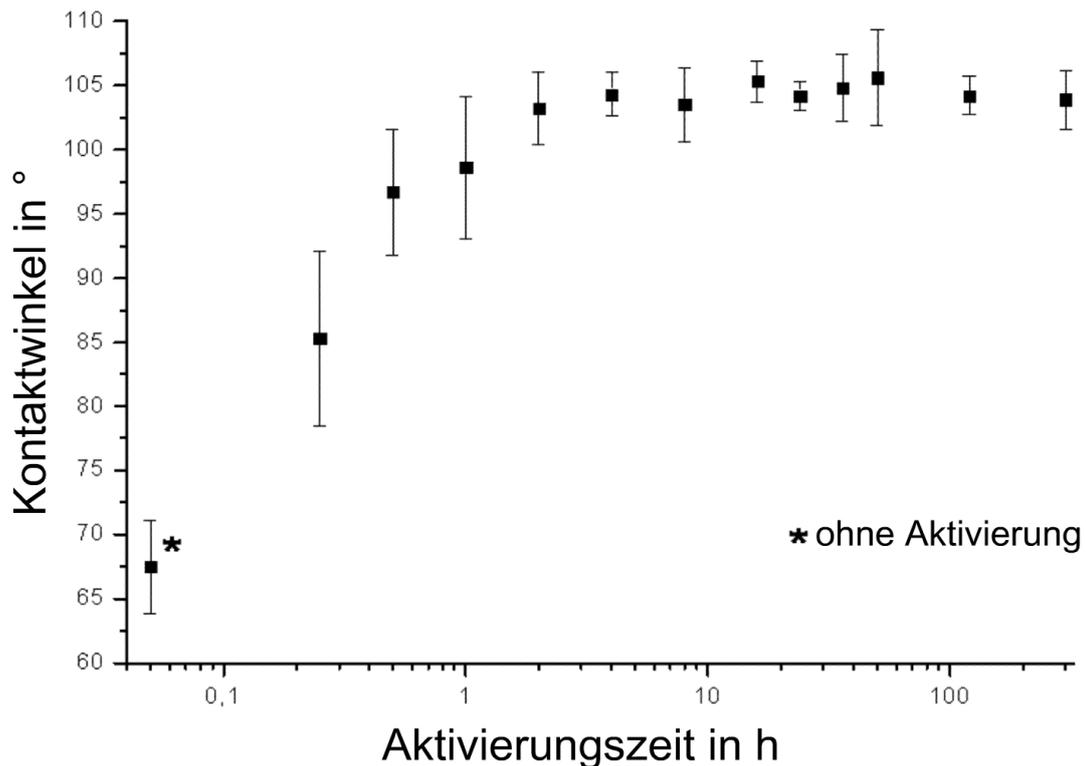
Zur Optimierung des Gesamtprozesses war es notwendig, die Parameter der Piranha-Reinigung in Hinblick auf den Kontaktwinkel zu optimieren.

Für jeden Datenpunkt wurden jeweils zwei Gläser gereinigt, silanisiert und vermessen. Zuerst wurde die Zusammensetzung der Piranha-Lösung variiert (Abb.5.16) und dann die Aktivierungszeit mit der Piranha-Lösung (Abb.5.17)



**Abb.5.16: Optimierung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anteils in der Piranha-Lösung**

Verschiedene Anteile aus Schwefelsäure und 30%iger Wasserstoffperoxidlösung wurden verwendet, um Glasoberflächen zu reinigen. Nach der Silanisierung ergab sich ein optimaler Kontaktwinkel bei einem Anteil von 40% Wasserstoffperoxidlösung. Reine Schwefelsäure oder reines Wasserstoffperoxid zeigten einen Kontaktwinkel, der ungereinigtem silanisierendem Glas entspricht.



**Abb.5.17: Optimierung der Aktivierungszeit mit Piranha-Lösung**

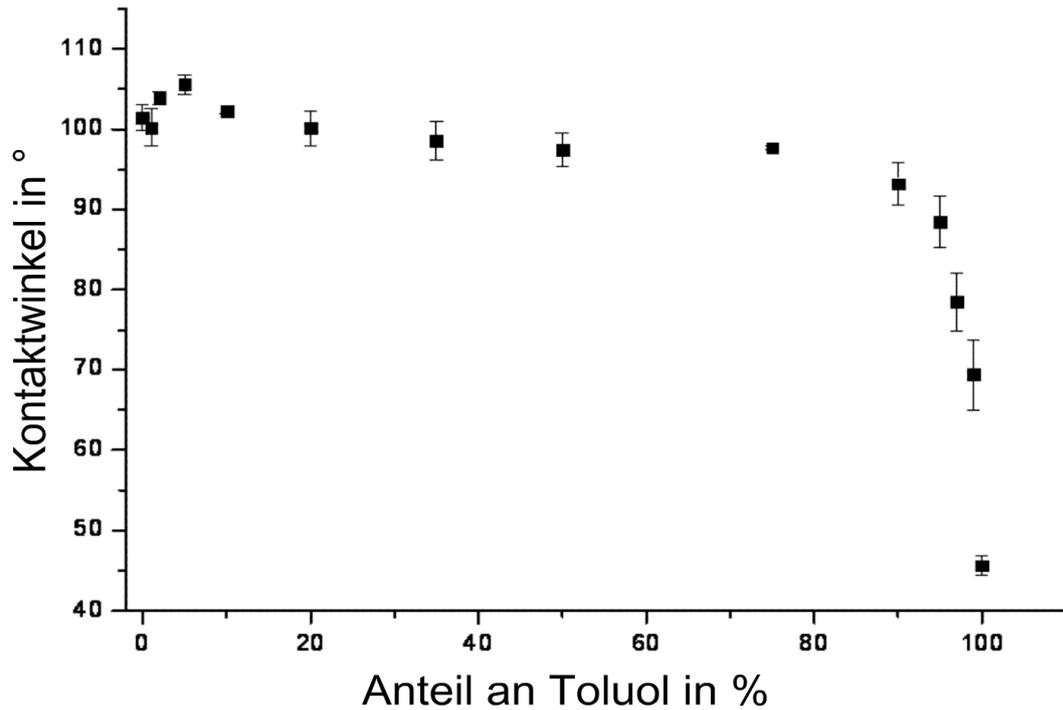
Mit länger werdender Aktivierungszeit erhöht sich nach der Silanisierung auch der Kontaktwinkel. Bereits nach 3 Stunden ist der maximale Kontaktwinkel erreicht.

Damit ergab sich eine optimale Zusammensetzung der Piranha-Lösung aus 12% Wasserstoffperoxid, 60% Schwefelsäure und 28% Wasser. Die minimale Aktivierungszeit wurde zunächst auf 3 h festgelegt. Unter Berücksichtigung späterer Ergebnisse der Silanisierung und Abstimmung einzelner Zeitschritte wurde die Aktivierungszeit auf 24 h verlängert.

#### 5.1.3.4 Optimierung der Flüssigphasensilanisierung

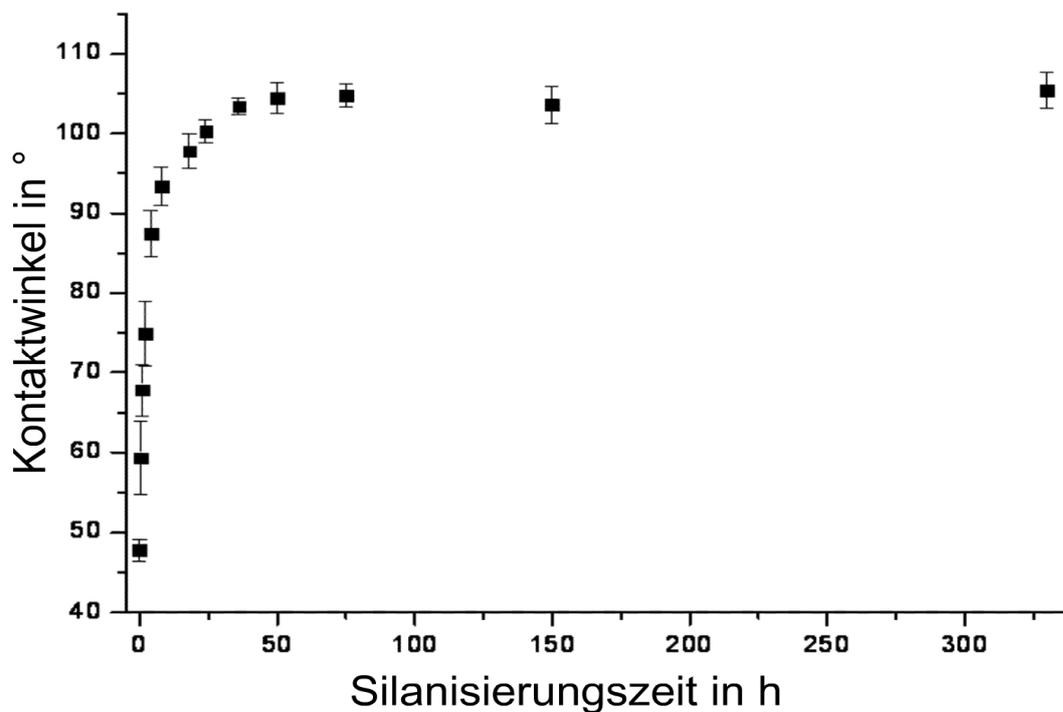
Nach Optimierung der Aktivierung und Reinigung der Glasoberfläche mit Piranha-Lösung wurde die Silanisierungsreaktion genauer untersucht. Hierzu gehört die Handhabung und Lagerung der Oberflächen zwischen Aktivierung und Silanisierung (Abb.5.20) sowie die Silanisierungszeit (Abb.5.19) und Zusammensetzung der Silanisierungslösung (Abb.5.18).

Für jeden Messpunkt wurden nun jeweils 4 Glasträger hergestellt und die Kontaktwinkel vermessen. Für die Silanisierung wurde Hexadecyl-trimethoxy-silan verwendet.



**Abb.5.18: Optimierung der Zusammensetzung der Silanisierungslösung**

Die Silanisierung wurde mit verschiedenen Verdünnungen des Silans mit Toluol für 48 h durchgeführt. Reines Silan erwies sich schon bei diesem Schritt aufgrund seiner Zähigkeit als schwer handhabbar. Ein Toluolanteil von 5% lieferte optimale Ergebnisse.



**Abb.5.19: Optimierung der Silanisierungszeit**

Eine Silanlösung mit 5% Toluolanteil wurden zur Silanisierung bis zu 14 Tagen durchgeführt. Schon innerhalb der ersten 3 Stunden nimmt der Kontaktwinkel deutlich zu. Nach 48 Stunden wurde der „grenzwertig maximale“ Kontaktwinkel erreicht.

Es war offensichtlich, dass das reine Silan aufgrund seiner hohen Zähigkeit nicht direkt anwendbar ist und zudem durch die Luftfeuchtigkeit zur Polymerisation neigt. Schon nach 12 h bildete sich eine trübe fettartige Schicht auf dem Silan. Dies konnte unter Luftabschluss und mit Verwendung von Argon als Schutzgas zwar verringert, aber nicht unterbunden werden. Die Schichtbildung kann durch Zugabe von einigen µl Wasser deutlich beschleunigt werden.

Durch Zugabe von Toluol (Toluen) wird die Mischung wasserabweisend. Ab einem Toluolanteil von 2% bildet sich eine Phasengrenze zu Wasser. Daher wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Kontaktwinkelmessungen stets die Silanisierungslösung mit einem Toluolanteil von 5% angesetzt und für 48 h silanisiert.

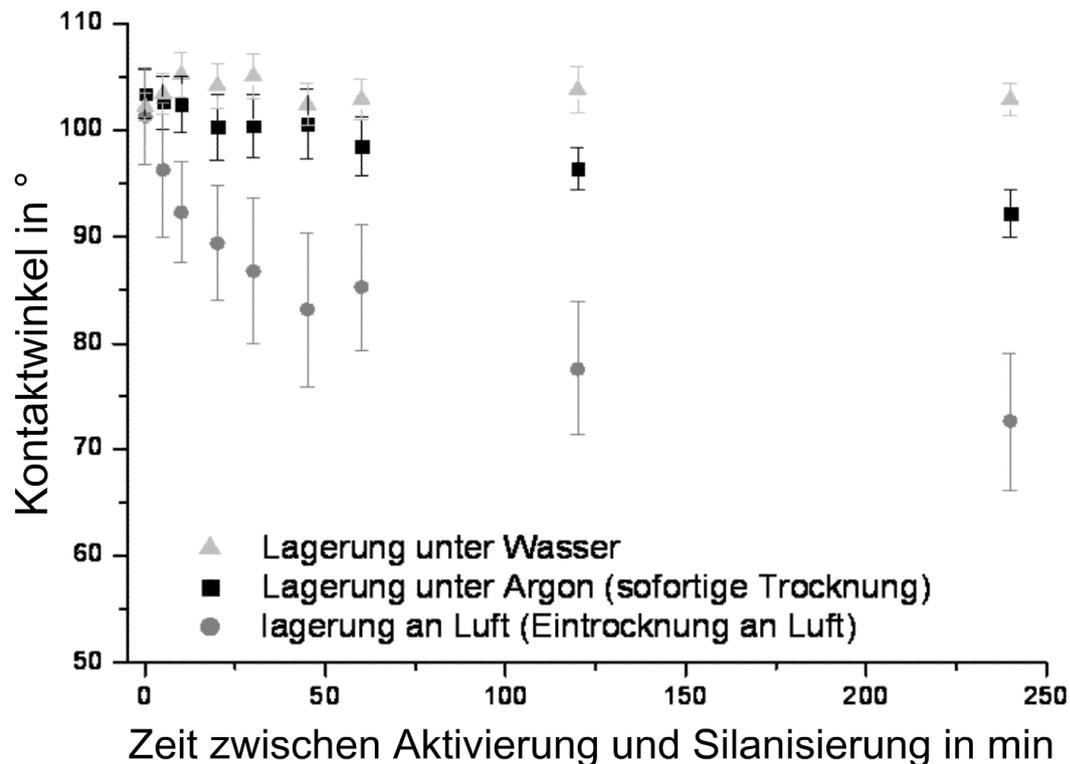
Da die aktivierten Hydroxy-Gruppen der Oberfläche schnell inaktiv wurden oder mit luftübertragenen Kontaminationen abreagierten, wurde abschließend die Handhabung zwischen Piranha-Aktivierung und Silanisierung untersucht. Zwischen der Aktivierung und der Silanisierung muss die Oberfläche gründlichst gereinigt werden, da ein Verschleppen der Schwefelsäure zu einer Polymerisation des Silans führt.

In der Halbleitertechnik werden zwei Verfahren zur Handhabung zwischen nasschemischen Prozessschritten verwendet. Entweder wird der Träger in Flüssigkeit gelagert, um so einen Luftkontakt zu vermeiden und direkt vor dem nächsten Prozessschritt getrocknet, oder der Träger wird gleich physikalisch getrocknet und dann unter Schutzgas oder in einer Reinraumbox bis zum nächsten Prozessschritt gelagert. Für die physikalische Trocknung stehen entweder das Abblasen der Flüssigkeit mit einem Gasstrahl (Trockenblasen) oder ein Trocknen mittels des Marangoni-Effekts zur Verfügung.

Da eine Marangoni-Trocknung nur mit einer entsprechend komplizierten Automatisierung in einer Fertigungsstraße möglich ist, wurde von der Firma Mykrolis eine Waferguard-Gaspistole zur Reinigung und Trocknung von Wafern erworben. Diese Gaspistole erzeugt mit Druckluft ein Strömungsprofil, das besonders effizient Partikel und Flüssigkeitstropfen von Oberflächen entfernt.

Für die Untersuchung der Handhabung wurden die Gläser nach der Aktivierung entweder unter Wasser gelagert und vor der Silanisierung trocken geblasen (Abb.5.20 Dreiecke), direkt getrocknet und unter Argon bis zur Silanisierung gelagert (Abb.5.20 Quadrate) oder mit Wasser gewaschen, ohne Hilfsmittel an der

Luft getrocknet und bis zur Silanisierung ohne Schutzgas (Abb.5.20 Kreise) gelagert.



**Abb.5.20: Abhängigkeit des Kontaktwinkels von der Handhabung**

Mit zunehmender Lagerungszeit der Gläser zwischen Aktivierung und Silanisierung nimmt der Kontaktwinkel der erhaltenen Hydrophobisierung ab. Die Lagerung unter Wasser ergab dabei die höchste Hydrophobizität nach der Silanisierung.

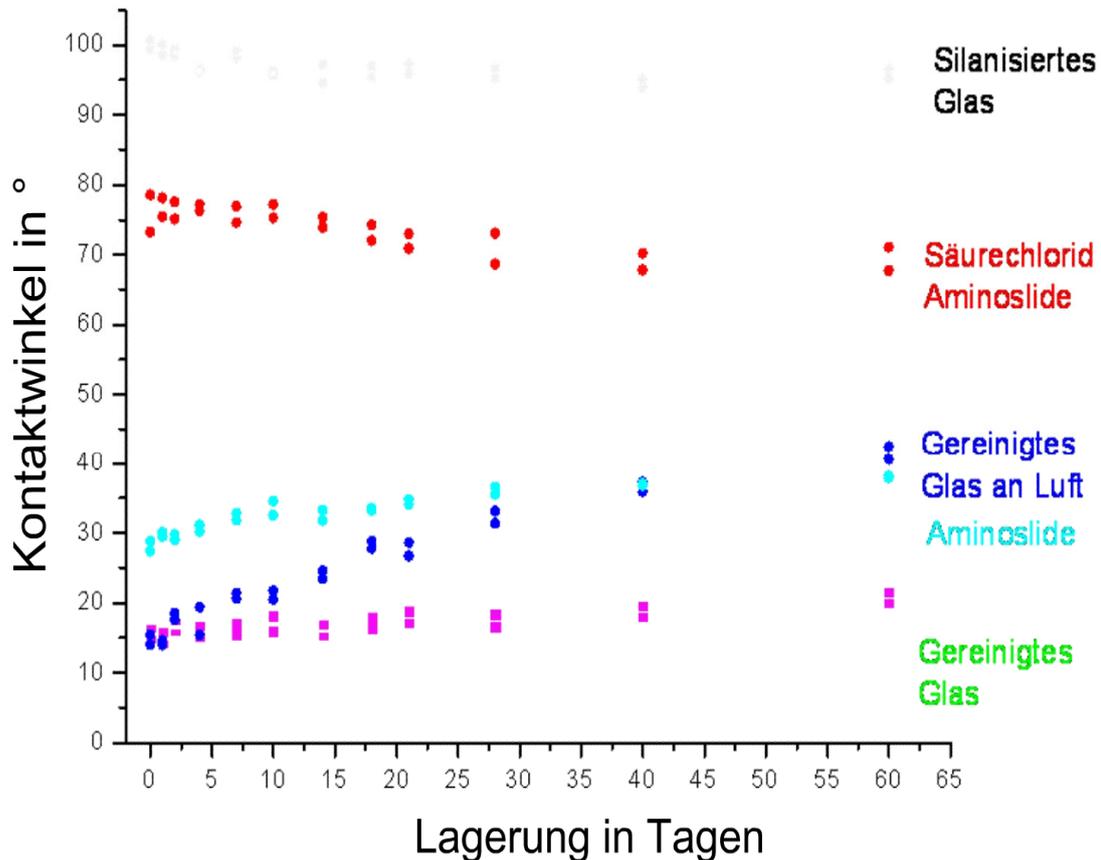
Aus diesen Experimenten wurde das endgültige Protokoll für die Hydrophobisierung und Silanisierung festgelegt.

#### Standardprotokoll für Silanisierung von Gläsern

- 24 h Aktivierung in frisch angesetzter Piranha-Lösung (2 Anteile 30% Wasserstoff-peroxid, 3 Anteile Schwefelsäure)
- 5-10 min Lagerung in Wasser
- je 3 x Waschen mit Wasser, IPA und Aceton
- Trockenblasen mit Waferguard-Pistole
- 48 h Silanisierung (reines Silan mit 5% Toluol)
- je 3 x Waschen mit Toluol, IPA, Ethanol, Wasser und Aceton
- Trockenblasen mit Waferguard-Pistole
- luft-, staub- und lichtgeschützt lagern bis zur Verwendung

### 5.1.3.5 Lagerbeständigkeit der Oberflächen

Zur Prüfung der Lagerbeständigkeit (Abb.5.21) der Oberflächen wurden je 2 Objektträger (Slides) einzelner Oberflächenmodifikationen und Zwischenschritte in einer Reinraumbox unter Stickstoff gelagert.



**Abb.5.21: Veränderung des Kontaktwinkels durch Lagerung**

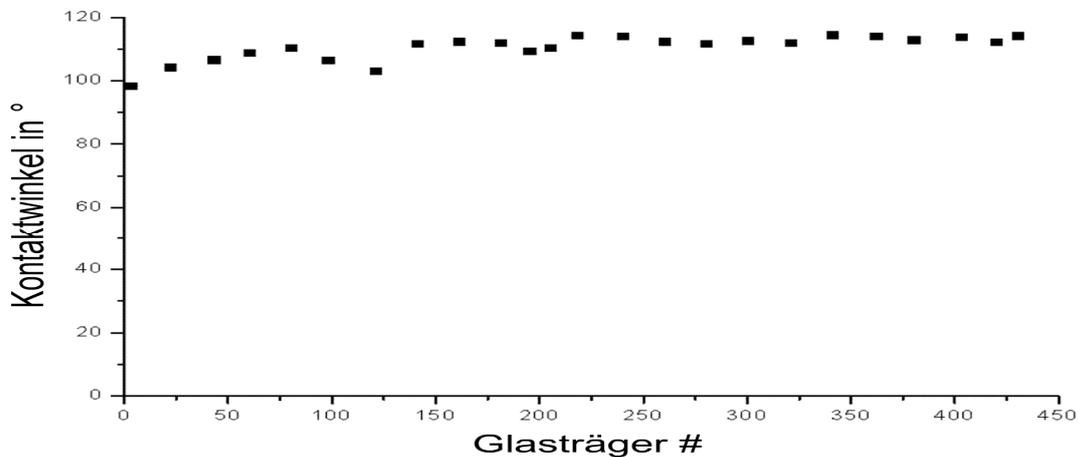
Alle Proben wurden in einer verschlossenen Reinraumbox unter Stickstoff gelagert. Zum Vergleich wurde gereinigtes Glas an Luft (dunkelblau) gelagert. Unabhängig von der Lagerung strebt der Kontaktwinkel stets in Richtung „schmutziges Luftglas“, was einem Winkel von 60° bis 70° entspricht.

Es zeigte sich, dass bei geschützter Lagerung in einer Reinraumbox unter Stickstoff oder Argon der Kontaktwinkel über ca. 2 Monate entsprechend stabil bleibt. Es darf dabei nicht vergessen werden, dass die untersuchten Proben für jede Kontaktwinkelmessung wieder der Raumluft ausgesetzt waren und dass dadurch bei jeder Einlagerung Kontaminanten verschleppt wurden.

Bei einmaliger Wiedereinlagerung ist davon auszugehen, dass in der verschlossenen Reinraumbox nach etwa einer Woche keine Änderung des Kontaktwinkels mehr auftritt und man mit maximal 5° Erniedrigung des Kontaktwinkels pro Monat rechnen kann.

### 5.1.3.6 Qualitätskontrolle selbst hergestellter hydrophober Glasträger

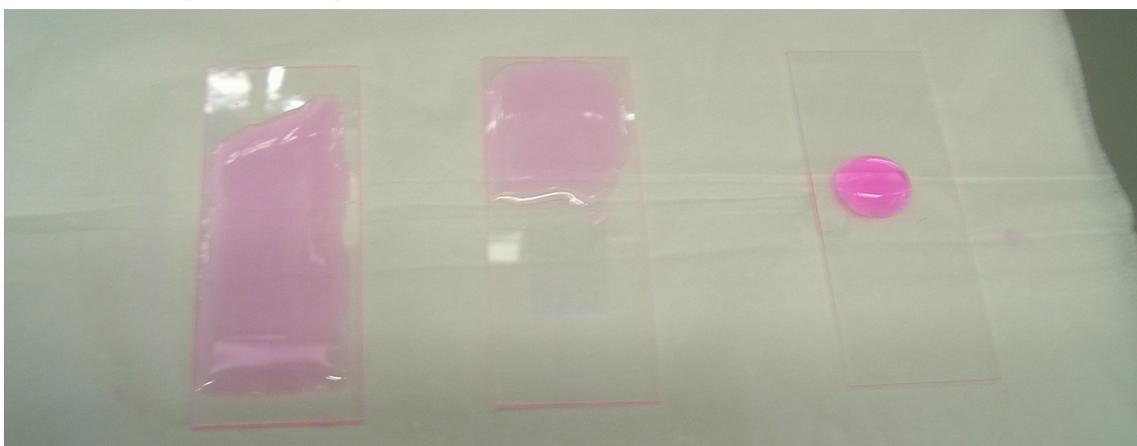
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mehr als 400 hydrophobe Glasträger hergestellt. Für eine Überwachung der Qualität wurde bei jedem 20. Glasträger der Kontaktwinkel vermessen.



**Abb.5.22: Kontrolle des Kontaktwinkels der selbsthergestellten Slides**

Etwa jeder zwanzigste der selbsthergestellten Glasträger wurde auf seine Hydrophobizität mittels Kontaktwinkel untersucht. Nach entsprechender Einübung des Protokolls verbesserten sich stetig die Kontaktwinkel. In dem Zeitraum, in dem die Glasträger 100 bis 140 hergestellt wurden, traten Kontaminationen im Silan auf. Ab Träger 141 wurden diese Kontaminationen ausgeschlossen.

Durch die regelmäßige Überprüfung (Abb.5.22) des Kontaktwinkels konnte gewährleistet werden, dass die Silanisierung fehlerfrei funktionierte. So konnte auch eine Kontamination durch Phenole im Zeitbereich, in dem die Träger 100 bis 140 produziert wurden, entdeckt und unterbunden werden. Die Hydrophobizität konnte schon direkt während der Waschprozesse durch das „Laufverhalten“ der Waschflüssigkeiten abgeschätzt werden (Abb.5.23)



**Abb.5.23: Veranschaulichung der Hydrophobizität**

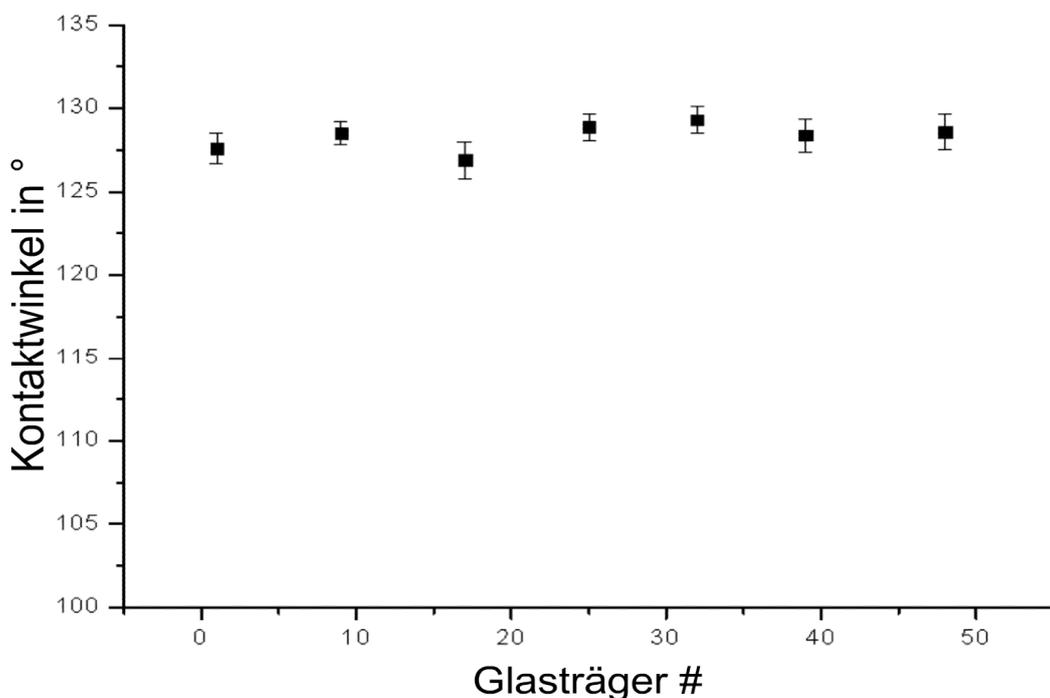
Auf jedes Glas wurde jeweils 1 ml rhodaminhaltige Lösung aufpipettiert. Es wurde ein mit Piranha gereinigtes Glas (links), ein ungereinigtes Glas (mitte) und ein frisch silanisiertes Glas (rechts) verwendet. Weiterhin bemerkenswert ist, dass gereinigte Gläser eine hohe Reflektivität besitzen und silanierte Gläser nahezu nicht reflektieren.

### 5.1.3.7 Qualitätskontrolle der hydrophoben Implen-Slides

Für die Etablierung der LIPODOT-Technik waren die selbstproduzierten hydrophoben Slides ausreichend, zeigten jedoch einen ca. 3 bis 4 mm breiten inhomogenen Rand. Im Rahmen der Kooperation mit Novartis IST (Wien) wurde jedoch eine hydrophobe Oberfläche mit weniger als 1 mm Rand benötigt.

Bei Herstellern von Mikroarray-Trägern waren 2004 keine hydrophoben Träger erhältlich, die für Fluoreszenzmessungen verwendbar waren. Zudem betrug der höchste lieferbare Kontaktwinkel  $95^\circ$  (TOPAS-Kunststoff, Nunc).

Ende 2005 konnten bei der Firma Implen 50 experimentelle hydrophobe Oberflächen erworben werden, die einen Kontaktwinkel (Abb.5.24) von  $125^\circ$  bis  $130^\circ$  aufwiesen und damit eine noch bessere Verankerung der LIPODOT-Verbindungen gewährleisteten.



**Abb.5.24: Kontrolle des Kontaktwinkels der Implen-Slides**

Von sieben der 50 gelieferten hydrophoben Implen-Slides wurden Kontaktwinkel bestimmt.

### 5.1.4 Bead-Monolayer

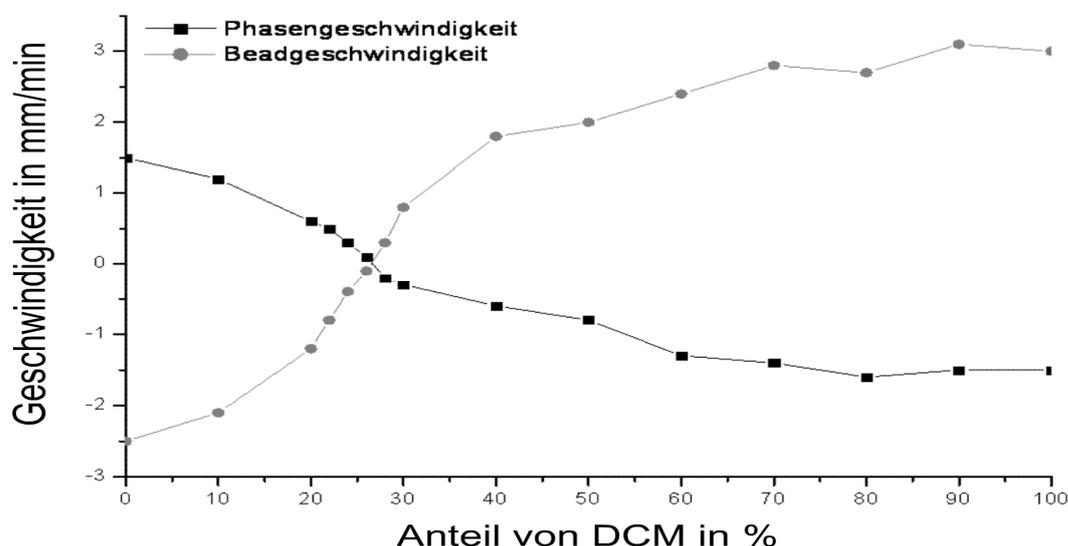
Als Bestandteil des LIPODOT-Transfers wird eine Carrier Plate benötigt, auf der die Synthesebeads immobilisiert sind. Dabei ist eine Monolayer aus monodispersen Synthesebeads Grundvoraussetzung für einen homogenen Transfer. Jede „Unebenheit“, die über die Monolayer hinausragt, sorgt für eine

inhomogene Druckverteilung und damit Inhomogenitäten bei den Wassermenisken während des Transfers. Damit werden die erzeugten LIPODOTs ebenfalls inhomogen oder entstehen überhaupt nicht, falls kein Kontakt zwischen Assay Plate und Carrier Plate zustande kommt.

Es wurden insgesamt 3 Methoden zur Erzeugung von Monolayern evaluiert.

#### 5.1.4.1 Langmuir-Blodgett-Filme

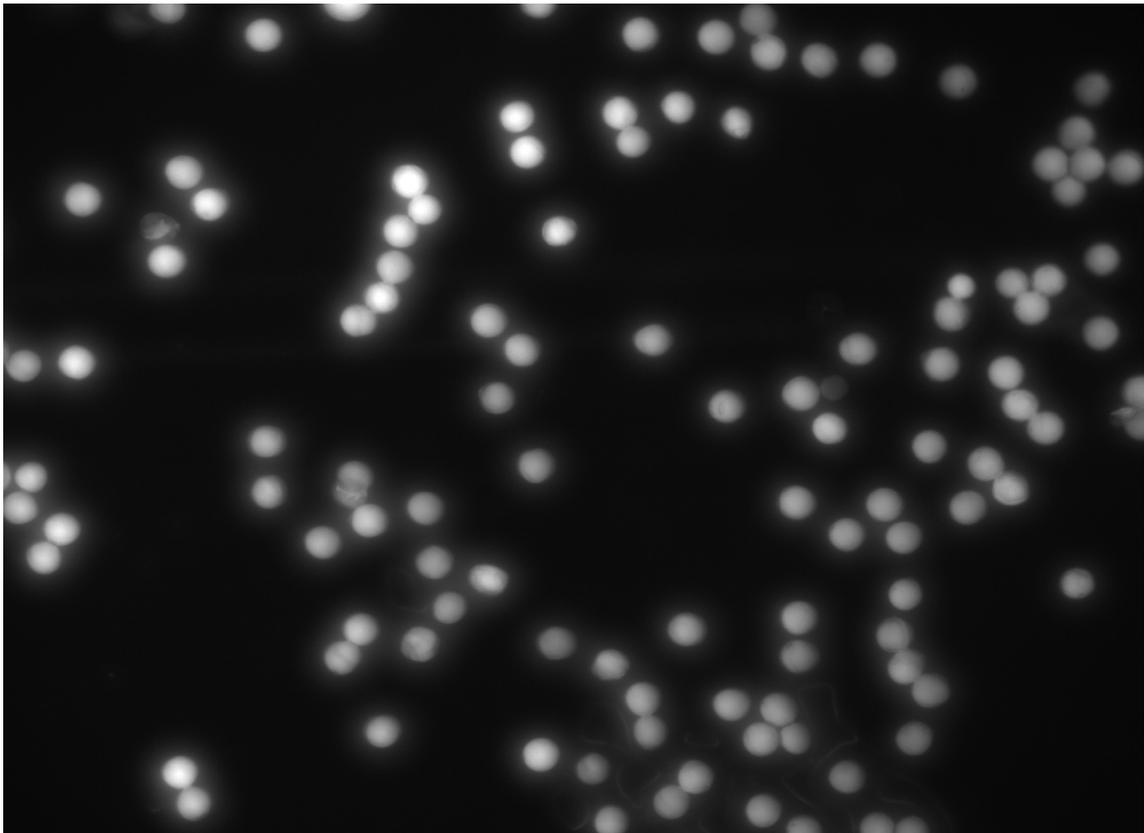
Zur Erzeugung von Langmuir-Blodgett-Filmen benötigt man eine Suspension, in der die Mikropartikel „schweben“. Diese Schwebdichte (Abb.5.25) wurde mit unterschiedlichen DCM/DMF-Gemischen ermittelt.



**Abb.5.25: Bestimmung der Schwebdichte durch Sinkgeschwindigkeiten**

DCM, DMF und 20 µm Beads wurden in einem 10 cm hohen Volumen durchmischt. Die Absinkgeschwindigkeit der Beads wurde anhand der Höhe der klaren Phase nach 5, 15 und 30 min bestimmt (rote Linie, negative Werte bedeuten ein Absinken). Nach 60 min wurden 100 µl aus der Bead-haltigen Phase entnommen und in der Mitte eines Steigrohres mit identischer DCM/DMF-Mischung als Tropfen eingebracht. Die Geschwindigkeit der Tropfenmitte wurde entsprechend vermessen und invertiert aufgetragen um den Schnittpunkt zu bestimmen (schwarze Linie, negative Werte bedeuten ein Aufsteigen). Der Schwebepunkt ist bei einem DCM-Anteil von 27% erreicht.

Bei einer Mischung aus 27% DCM und 73% DMF wurde die Schwebdichte von 20 µm Beads erreicht. Durch diese Schwerelosigkeit in Lösung kann der Phasen-Transfer der Beads an die Glasoberfläche leichter stattfinden. Ob sich jedoch eine Monolayer bildet, hängt stark von der Adhäsion der Mikropartikel zur Oberfläche ab. Es zeigte sich im Verlauf mehrerer Beschichtungsversuche, dass es nicht möglich war eine dichte Bead-Monolayer herzustellen (Abb.5.26).



**Abb.5.26: Langmuir-Blodgett-Film aus 20 µm Beads**

Nur einzelne Beads haften auf der Oberfläche und können durch stringentes Waschen auch von dieser entfernt werden.

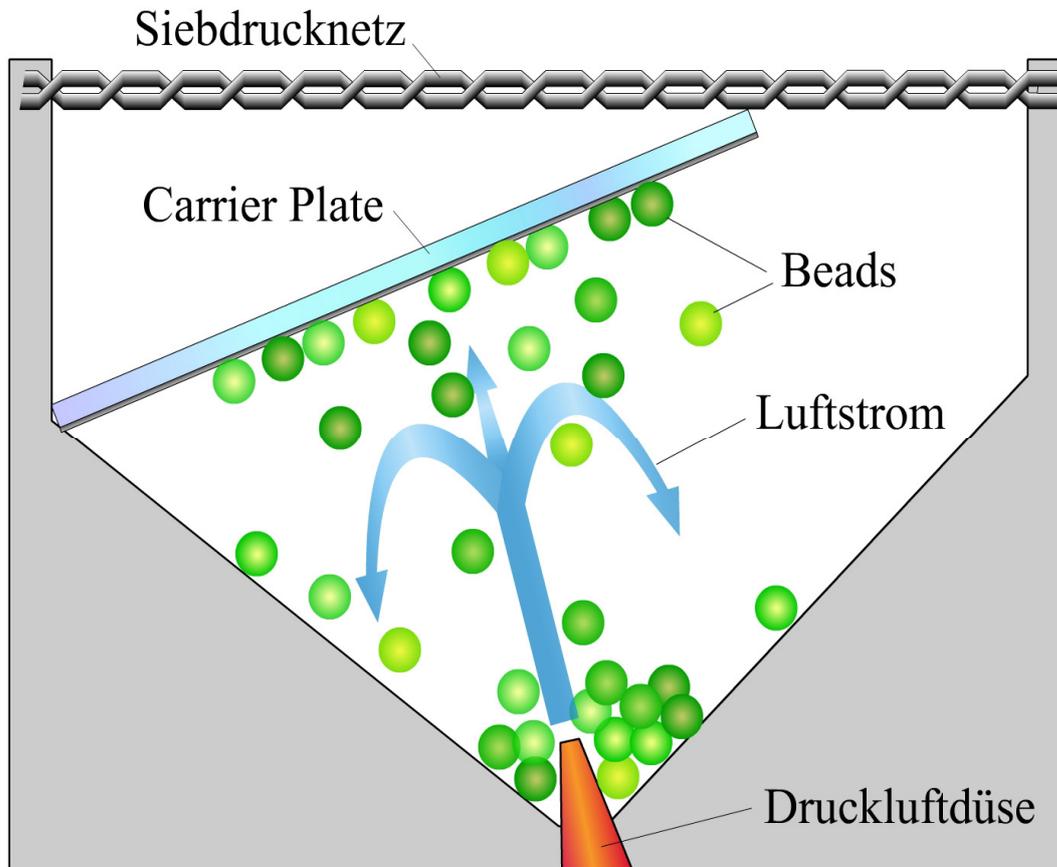
Es zeigte sich zudem, dass die Beads kaum Adhäsion auf der Glasoberfläche zeigten, unabhängig davon ob hydrophobe, hydrophile oder geladene Glasoberflächen verwendet wurden. Es ist anzunehmen, dass die Beads aufgrund ihrer Größe durch Scherkräfte nicht auf der Oberfläche verbleiben.

Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Beschichtung und der unzureichenden Immobilisierung der Beads auf den Oberflächen wurde diese Technik nicht weiter verfolgt, zumal je nach Verbindungskollektion eine andere Schwebbedichte resultiert.

#### 5.1.4.2 Pulverbeschichtung klebstoffbeschichteter Glasträger

Es wurde eine einfache „Pulverbeschichtungsanlage“ aufgebaut (Abb.5.27). Mittels einer Druckluftdüse wird ein Überdruck erzeugt, der aus dem Bead-reservoir die Synthesebeads aufwirbelt. Diese treffen auf den klebstoffbeschichteten Träger und beschichten ihn gleichmäßig. Nur Beads, die in die Klebstoffschicht eindringen, bleiben darauf haften. Die restlichen Beads fallen in

das Reservoir zurück. Ein Siebdrucknetz mit 10  $\mu\text{m}$  Maschenweite hinter dem Träger verhindert das Austreten der Beads.



**Abb.5.27: Aufbau der Pulverbeschichtungsanlage**

Mit Stickstoff werden die Beads aus dem Reservoir aufgewirbelt. Diese treffen auf den Träger und beschichten diesen. Ein Siebdrucknetz ermöglicht das Abströmen der Luft und hält die Beads zurück.

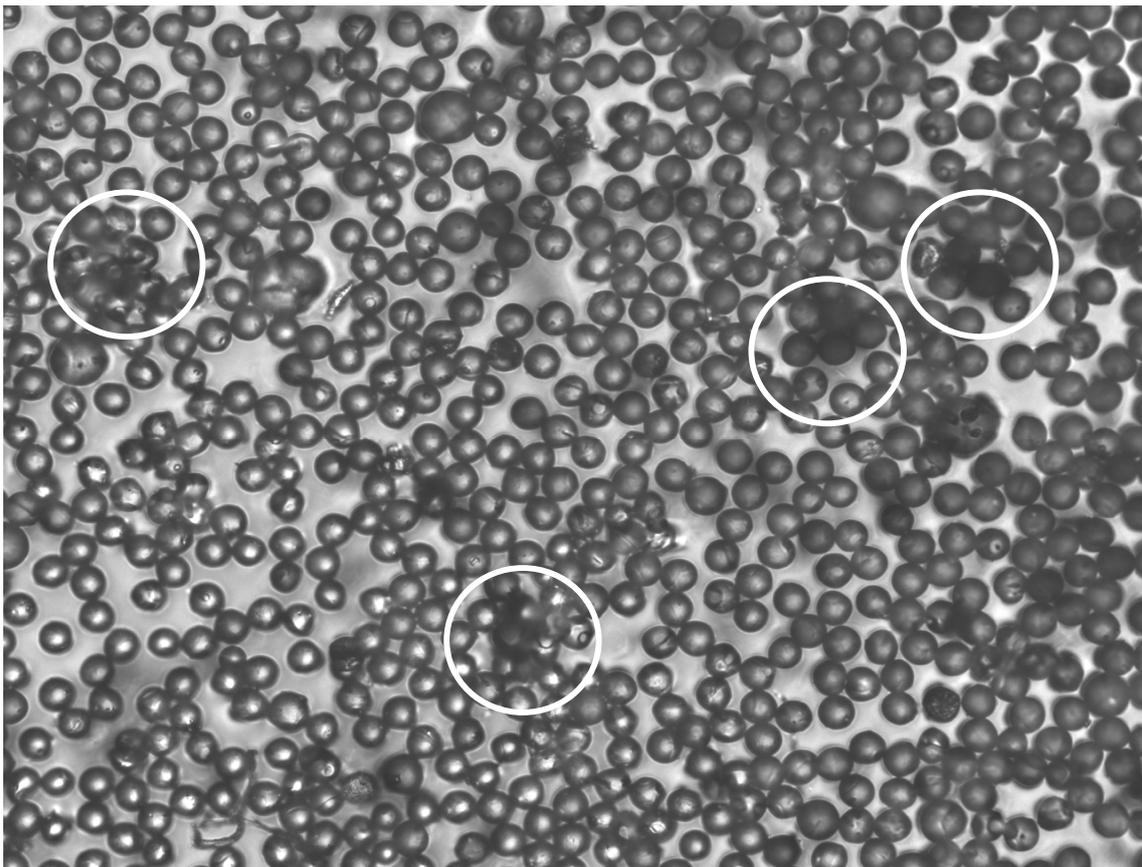
Es wurden sowohl UV-initiierbare als auch Zwei-Komponenten-Klebstoffe\* untersucht. Die Klebstoffe wurden aufgrund ihrer geringen Eigenfluoreszenz, der Aushärtungszeit im Minutenbereich und ihrer hohen Adhäsion und Klebekraft gegenüber Glas und Kunststoffen wie amorphes Polystyrol und Polypropylen ausgewählt. Die für die Pulverbeschichtung notwendige Klebstoffschicht wurde anfänglich durch Spincoating-Belackung auf planare Träger aufgebracht. Hierfür wurden von Panacol und von Arcure freundlicherweise entsprechende Kunststoff-Klebstoffe zur Verfügung gestellt. Mit 700 bis 800 rpm konnten alle diese Klebstoffe zu Schichten von 8 bis 10  $\mu\text{m}$  Dicke aufgebracht werden. Diese Klebstoffschichten wurden unter UV-Initiierung innerhalb der von den Herstellern angegebenen 20 bis 60 min ausgehärtet.

\* Klebstoffproben wurden von den Firmen Panacol und Arcure zur Verfügung gestellt.

So sollte es möglich sein die Beads, die hauptsächlich aus Polystyrol bestehen, auf einer Glasoberfläche zu verkleben. Die Flüssigklebstoffe wurden mit Spincoating auf Glasoberflächen zu einer 5 bis 10  $\mu\text{m}$  dicken Schicht aufgeschleudert. Innerhalb von 5 min wurde dann die Pulverbeschichtung durchgeführt (Abb.5.28).

Überraschenderweise war es nicht möglich, die so verarbeiteten Klebstoffe auszuhärten, nachdem sie mit den 20  $\mu\text{m}$  Beads beschichtet waren. Weder der UV-initiierte noch der Zwei-Komponenten-Klebstoff härteten in der vorgegebenen Zeit aus. Zuerst wurden hier chemische Kontaminationen durch die Beads selbst in Betracht gezogen. Doch selbst durch extensives Waschen der Beads vor der Beschichtung war es nicht möglich, die Klebstoffe auszuhärten.

Eine gewaschene Beadprobe wurde an Panacol versandt und dort wurde gezeigt, dass selbst Klebstoffe, die innerhalb von 10 s aushärten sollten, auch nach Tagen keine Aushärtung zeigten <sup>[344]</sup>.



**Abb. 5.28: Pulverbeschichteter Glasträger mit einer Spincoat-Klebstoffschicht (Panacol)**

Die Dicke der Klebstoffschicht betrug 9,4  $\mu\text{m}$ . Es wurde eine Beaddichte von ca. 55% einer hexagonal dichtesten Kugelpackung erreicht. Allerdings bildeten sich auch Multilayerschichten und Beadkluster (weiße Kreise).

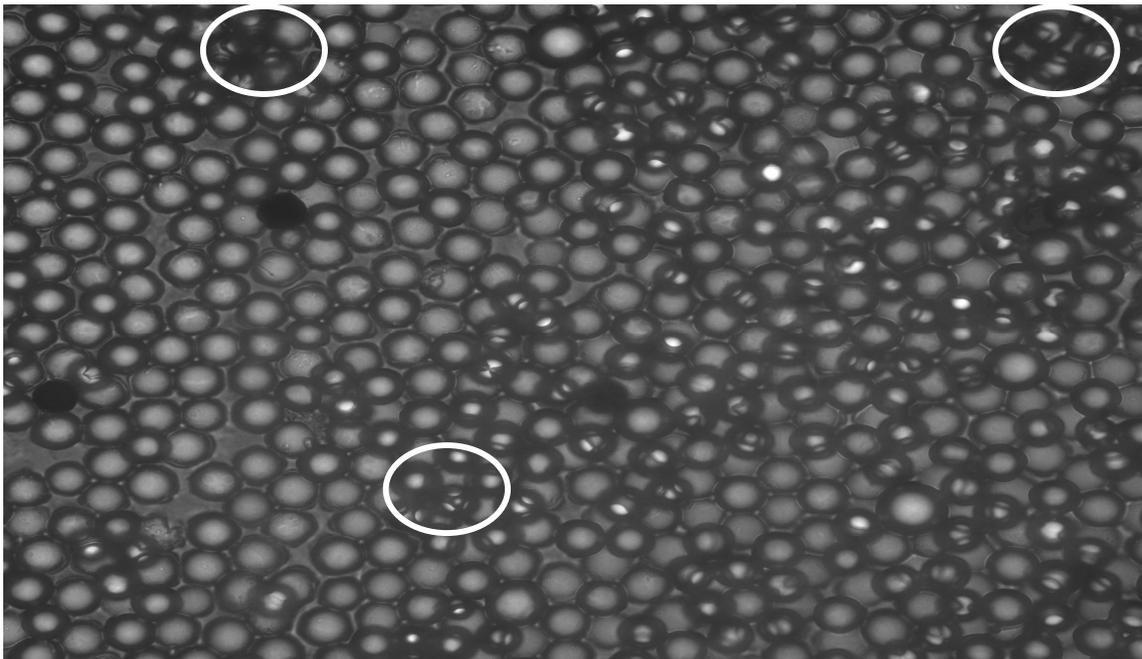
Chemische Kontaminationen konnten allerdings ausgeschlossen werden, indem aus klebstoffversetzten Beads der Klebstoff ausgepresst wurde. Dieser ausgepresste Klebstoff härtete, entsprechend der technischen Angaben, innerhalb von 15 min aus. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die amorphe mikrostrukturierte Oberfläche der Beads ein Aushärten unterbindet bzw. extrem verlangsamt und somit dieser Ansatz nicht zum gewünschten Ergebnis führt indem beispielsweise die für die Polymerisation benötigten Radikale innerhalb des Polymers eine zu starke räumliche Trennung erfahren.

Da mit einem aushärtenden Klebstoff nicht die gewünschte Immobilisierung der Beads erreicht werden konnte, wurden alternativ sogenannte „latente“ Klebstoffe verwendet. Hierzu gehören vornehmlich zähflüssige Öle, die mit einem Lösungsmittel auf die Oberfläche aufgesprüht werden und nach dem Verdampfen eine klebrige Schicht bilden. Anwendung findet dieses Verfahren bei nahezu allen Klebestreifen und Klebebändern.

Unter Berücksichtigung von Zellkompatibilität, Eigenfluoreszenz, Polymerstabilität auf mechanische Belastung und wässrige Lösungen sowie Klebfähigkeit und Dicke der Klebstoffschicht wurde für alle Experimente **Tesafilm „white“** (Beiersdorf) eingesetzt, dessen Klebstoffschicht zwischen 10 und 12  $\mu\text{m}$  dick ist. Tesafilm „clear“ und „crystal clear“ konnten aufgrund hoher Eigenfluoreszenz nicht verwendet werden.

### 5.1.4.3 Pulverbeschichtung von Tesafilm

Besitzt ein Material eine permanente „Klebrigkeit“ wie der Klebstoff eines Klebestreifens, so spricht man von einem latenten Klebstoff. Zumeist ist es ein zähflüssiges Öl, das über extreme adhäsive Eigenschaften verfügt. Durch die hohe Adhäsion des Klebestreifens konnte schon mit der ersten Beschichtung eines Tesafilms ein deutlich besseres Ergebnis (Abb.5.29) als in 5.1.4.2 erreicht werden.



**Abb. 5.29: Pulverbeschichteter Tesafilm direkt nach der Beschichtung**

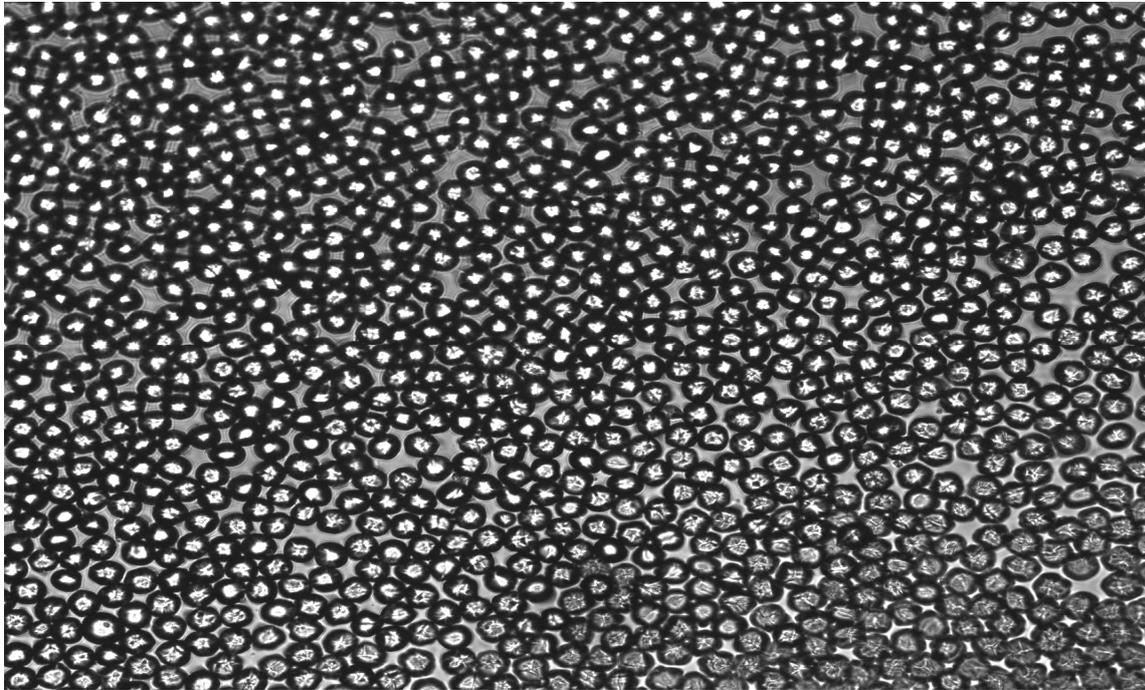
Es wurden fast 95% der Dichte einer hexagonal dichtesten Packung erreicht. Exemplarisch sind einige Multilayerbeads und Beadcluster mit einem weißen Kreis markiert.

Einzig in Hinblick auf Eigenfluoreszenz konnten aufgehellte Tesafilme wie „Tesafilm Clear“ und „Tesafilm Crystal Clear“ nicht verwendet werden. Nur der „naturtrübe“, unbehandelte „Tesafilm white“ zeigte kaum Eigenfluoreszenz, die sich zudem unter UV-Licht komplett bleichen ließ. Für alle weiteren Beschichtungsversuche wurde daher „Tesafilm white“ mit  $0,5 \text{ J/cm}^2$  UV-Licht in einem Stratalinker gebleicht.

Zur Entfernung der Multilayerbeads und Beadcluster wurde die beschichtete Probe, entsprechend Kapitel 4.3.2.4, „gekämmt“. Hierzu wird ein Metallgrat mit leichtem Druck über die Oberfläche geführt, was die Multilayerbeads abschert und die Beads aus der Monolayer zugleich im Klebstoff fixiert. Beim Kämmvorgang wird der Kamm (Metallgrat) nach einigen Millimetern angehoben, fast auf die Ursprungsposition zurückgesetzt und wieder in die ursprüngliche Richtung

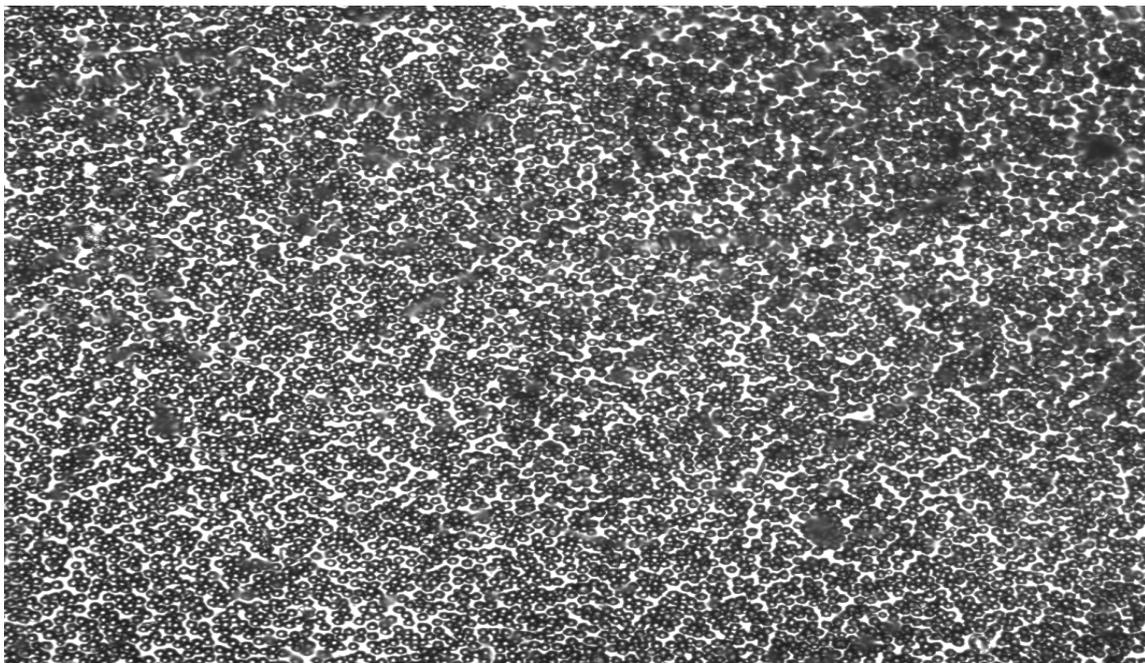
geschoben. Dabei wird innerhalb eines Kämmvorganges jede Position etwa 15 bis 20 Mal überfahren.

Nach jedem Kämmen wurde das Ergebnis mikroskopisch überprüft. Zumeist reichten zwei bis drei Kämmvorgänge aus, um die beschichtete Oberfläche in eine Monolayer umzuwandeln (Abb.5.30 und Abb.5.31).



**Abb.5.30: Nahaufnahme eines pulverbeschichteten Tesafilms nach dem Kämmen**

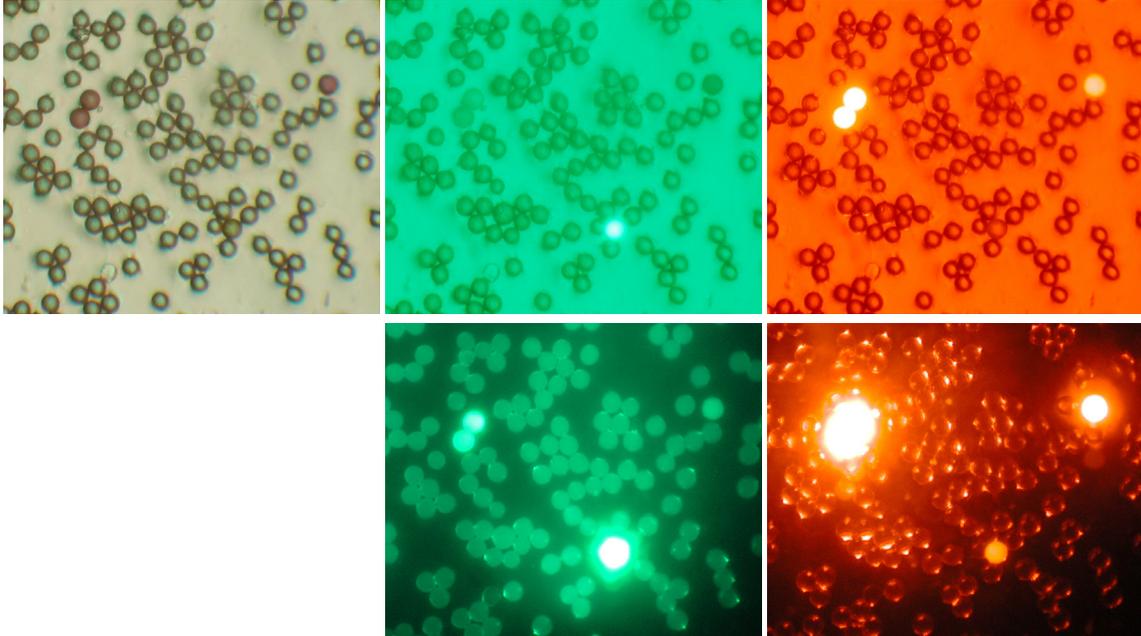
Die Probe aus Abb.5.29 wurde gekämmt und es sind kein Bead-Multilayer mehr sichtbar. Eine hochdichte Bead-Monolayer wurde erzeugt.



**Abb. 5.31: Pulverbeschichteter Tesafilm nach dem Kämmen**

Auch im Übersichtsbild (2,6 x 2,0 mm) der Probe aus Abb.5.30 sind kein Bead-Multilayer zu entdecken (Die trüben „Flecken“ sind Beschädigungen in der Klebstoffschicht).

Für Untersuchungen der Fluoreszenz wurde eine Mischung aus Beads mit 98% LIPODOT-Ankerverbindung, 1% LIPODOT-Rhodamin und 1% LIPODOT-Fluorescein hergestellt. Die Mischung wurde zu einer Bead-Monolayer (Abb.5.32) mit geringer Dichte ausgebracht und auf Fluoreszenz untersucht.



**Abb. 5.32: Bead-Monolayer mit geringer Dichte und fluoreszenten Beads**

Anregung mit Weißlicht (obere Reihe) und der Fluoreszenzwellenlänge (untere Reihe). Durchlicht (linke Spalte), Fluoresceinkanale (mittlere Spalte) und Rhodaminkanal (rechte Spalte). Man sieht 3 „rote“ Rhodaminbeads (ein Paar auf 10 Uhr, Einzelbead bei 2 Uhr), die im Rhodaminkanal extreme Fluoreszenz zeigen und im Fluoresceinkanale noch deutlich heller strahlen als die umgebenden Beads. Weiterhin ist ein Fluoresceinbead (5 Uhr) sichtbar, welches im Fluoresceinkanale die stärkste Fluoreszenz zeigt und im Rhodaminkanal ebenfalls ein starkes Signal (wahrscheinlich Streulicht) produziert.

Unter Verwendung von zusätzlichem Weißlicht (obere Reihe) können die fluoreszenten Beads den einzelnen Kanälen besser zugeordnet werden. Interessanterweise zeigen die Beads mit der Ankerverbindung im Fluoresceinkanale (mitte unten) ein Verhalten wie streuende Kugeln, im Rhodaminkanal (rechts unten) wie transparente Kugeln.

Somit konnte die erforderliche Bead-Monolayer mit Pulverbeschichtung und anschließendem Kämmen hergestellt werden.

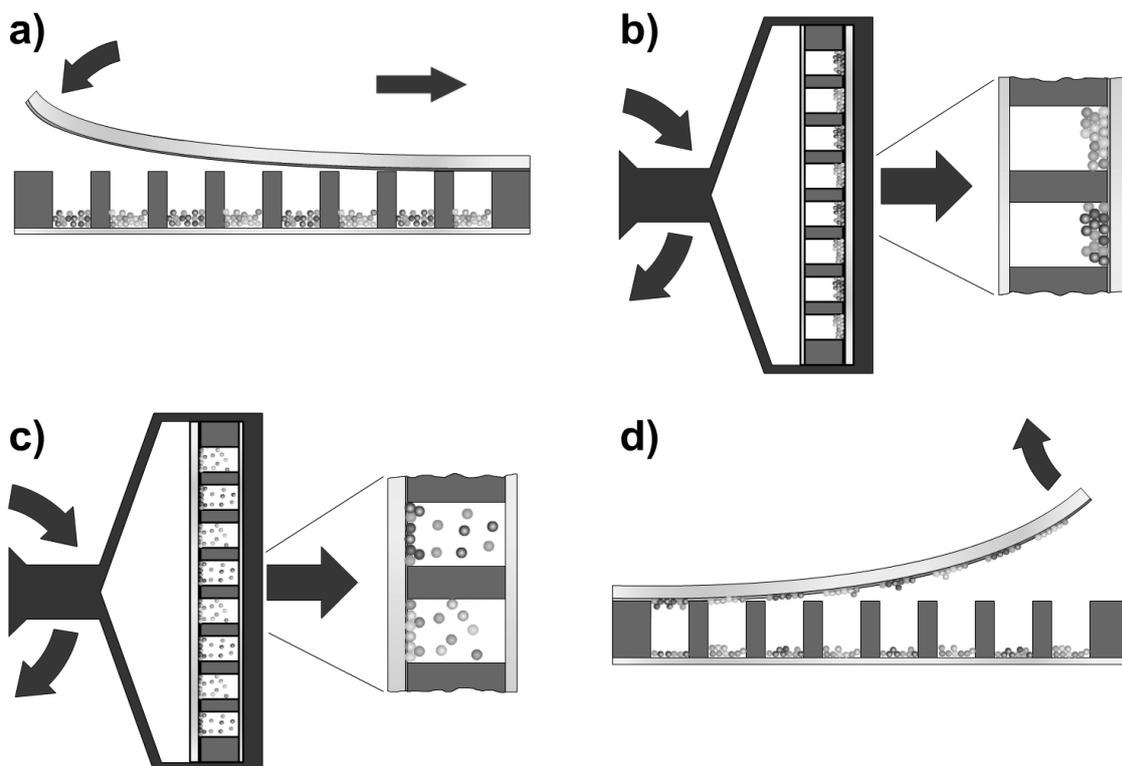
Durch entsprechende Einstellung des Mikroskops und der Bildaufnahme war es möglich, zwischen den einzelnen fluoreszenten Beads zu unterscheiden und diese, je nach Fluorophor, einzeln anzuregen.

#### 5.1.4.4 Zentrifugal-Pulverbeschichtung

Bei der bisherigen Pulverbeschichtung wurde stets die komplette Trägerfläche beschichtet. Für die Übertragung mehrerer Kollektionen ist ein Verfahren zur ortsaufgelösten Erzeugung einer Bead-Monolayer notwendig. Eine solche

Kompartimentierung kann entweder vor oder während der Beschichtung stattfinden, indem die Bereiche, die nicht beschichtet werden sollen, abgedeckt werden. Dabei darf die Klebstoffschicht jedoch nicht beschädigt werden, damit spätere Beschichtungen in diesen Bereichen noch möglich sind.

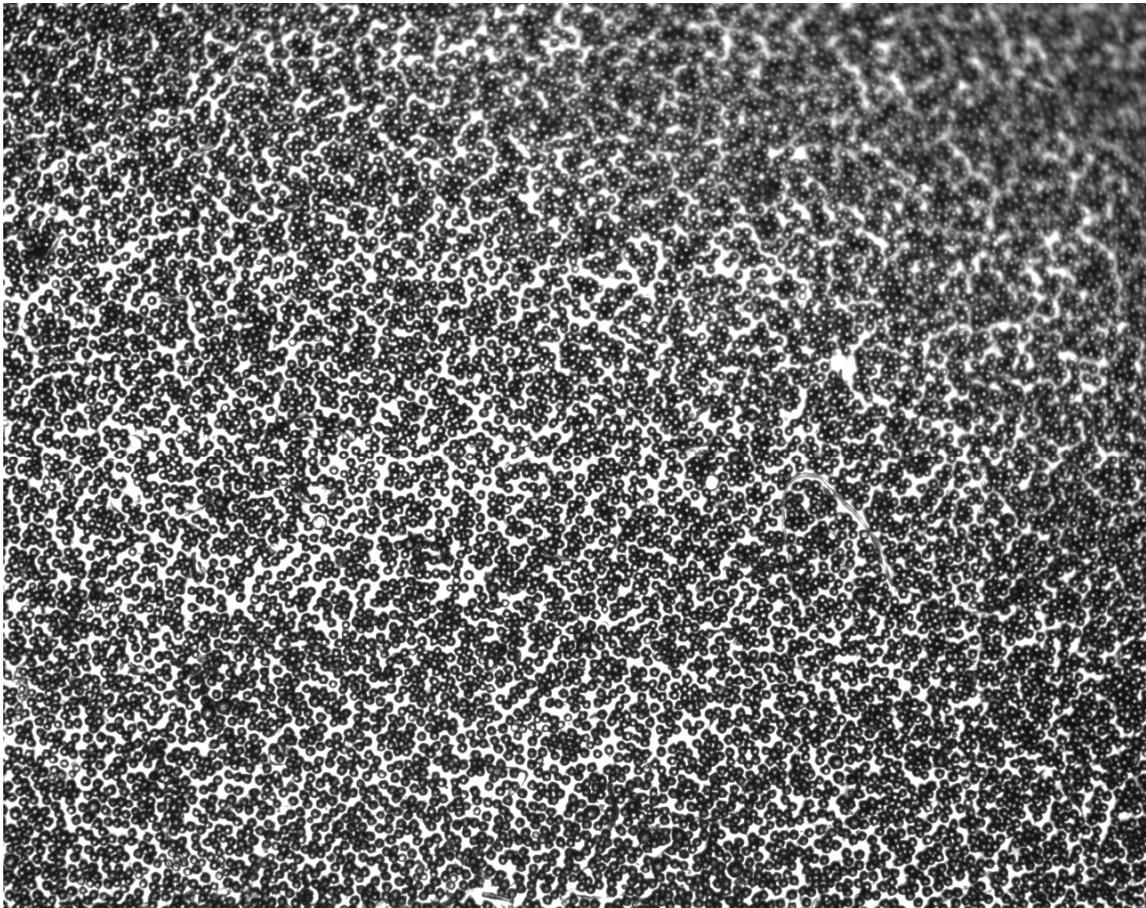
Am einfachsten ließ sich dabei die Kompartimentierung mit einer Mikrotiterplatte erzeugen. In die einzelnen Wells wird eine kleine Menge der Synthesebeads gegeben und der Tesafilm über die Platte geklebt (Abb.5.33a). Danach wird die Mikrotiterplatte zentrifugiert, wodurch die Beads mit hoher Kraft in die Klebstoffschicht des Tesafilms gedrückt werden (Abb.5.33b). Die Mikrotiterplatte wird dann gewendet und nochmals zentrifugiert. Durch dieses „Zurück-Zentrifugieren“ lösen sich Multilayerbeads, Beadkluster und Beads, die nur schwach in der Klebstoffschicht verankert sind (Abb.5.33c). Man erhält so eine Beadschicht, die stark im Klebstoff verankert ist. Nach dem Abheben der Carrier Plate (Abb.5.33d) sollte durch den Kämmprozess eine kompartimentierte Monolayer entstehen



**Abb. 5.33: Schematische Darstellung der Zentrifugal-Pulverbeschichtung**

In verschiedene Wells einer Mikrotiterplatte wird je eine Kollektion aus Synthesebeads gegeben und der Tesafilm über diese geklebt (a). Zunächst wird die Mikrotiterplatte so zentrifugiert, dass die Beads in den Tesafilm gedrückt werden (b), dann wird die Platte gewendet und die Beads durch nochmaliges Zentrifugieren bei geringerer Drehzahl wieder in die Wells zurückbefördert (c). Der so beschichtete Tesafilm (Carrier Plate) wird abgezogen (d) und gekämmt, wodurch eine kompartimentierte Monolayer entsteht.

Es zeigte sich, dass die Methode ebenfalls zur Herstellung einer Bead-Monolayer tauglich war (Abb.5.34), jedoch nicht die extreme Dichte der Pulverbeschichtung erreichte.



**Abb. 5.34: Mit Zentrifugaltechnik beschichteter Tesafilm nach dem Kämmen**

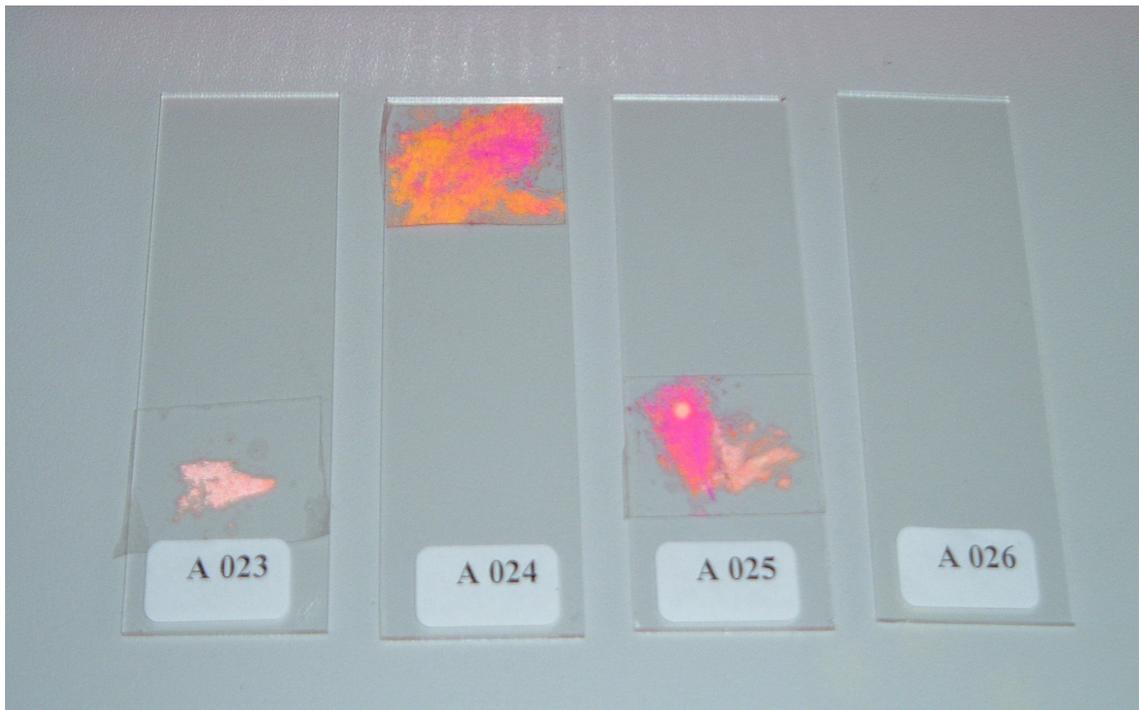
Ein Übersichtsbild (2,6 x 2,0 mm) entsprechend Abb.5.31. Die Bead-Monolayer besitzt eine etwas geringere Dichte im Vergleich zur Pulverbeschichtung.

### 5.1.5 Carrier Plate Herstellung

Auf einer Carrier Plate wurden entweder eine oder mehrere Verbindungskollektionen in Form von Synthesebeads immobilisiert.

#### 5.1.5.1 Carrier Plates der ersten Generation

Es wurden etliche Carrier Plates hergestellt. Die erste Serie von Carrier Plates wurde mit einer Mischung aus LIPODOT-Rhodamin, LIPODOT-Fluorescein und unbehandelten Tentagelbeads beschichtet. Sie dienten zur Etablierung des Pulverbeschichtungsverfahrens, des ersten LIPODOT-Transfers und des Mikroskopaufbaus. Die Größe der Carrier Plates betrug dabei üblicherweise 0,5 bis 4 cm<sup>2</sup> (Abb.5.35) bis hin zur Größe einer Mikrotiterplatte (Abb.5.36).



**Abb. 5.35: Beispiele kleiner Carrier Plates**

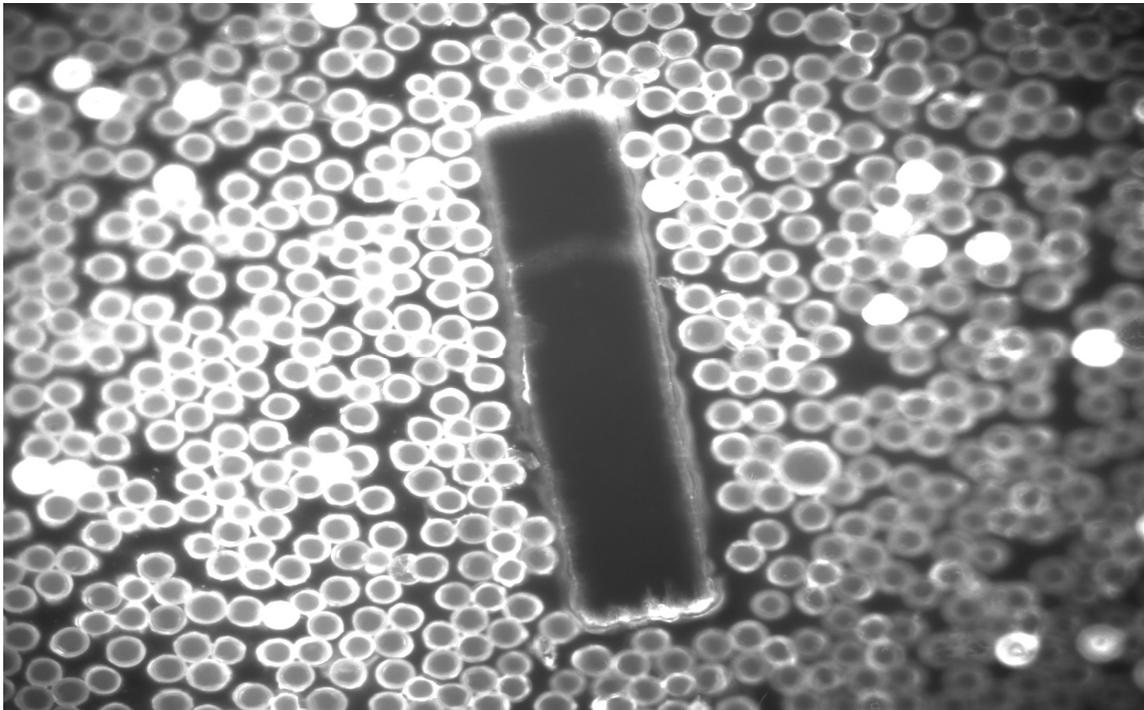
Einzelne Carrier Plates wurden mit verschiedenen Beadmischungen (unbehandelt = weiß, LIPODOT-Fluorescein = orange, LIPODOT-Rhodamin = pink) beschichtet und ein LIPODOT-Transfer auf hydrophobe Oberflächen wurde durchgeführt. Inhomogenitäten bei den Bead-Monolayer wurden bewusst erzeugt, um diese Strukturen nach dem Transfer schneller wiederfinden zu können.



**Abb. 5.36: Carrier Plate in der Größe einer Mikrotiterplatte**

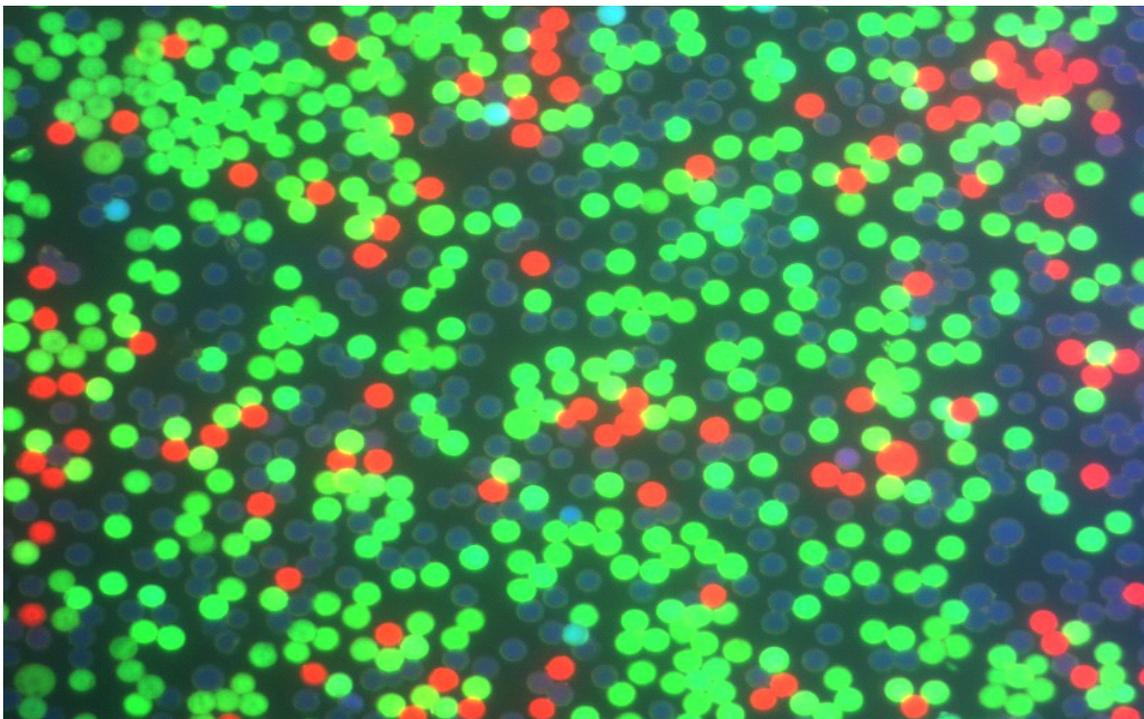
Um die Größenunabhängigkeit der Beschichtungstechnik zu zeigen, wurden zwei Carrier Plates in der Größe von Mikrotiterplatten hergestellt. Prinzipiell ist die Größe der Carrier Plate nur durch die Größe der Beschichtungskammer und des erhältlichen Trägers limitiert.

Die Carrier Plates wurden auf Verunreinigungen überprüft (Abb.5.37). Das Kämmen selbst entfernte die meisten Kontaminationen. Des Weiteren wurde das Mikroskopsystem auf die Aufnahme von Carrier Plates optimiert (Abb.5.38).



**Abb. 5.37: Carrier Plate mit einer Haarkontamination**

Trotz der Kontamination durch ein Haar erzeugte der Kämmprozess auch im direkten Umfeld um das Haar einen Monolayer. LIPODOT-Rhodamin Beads erscheinen in dieser Aufnahme als weiße Kreisflächen.



**Abb. 5.38: 3-Kanal-Aufnahme einer Carrier Plate**

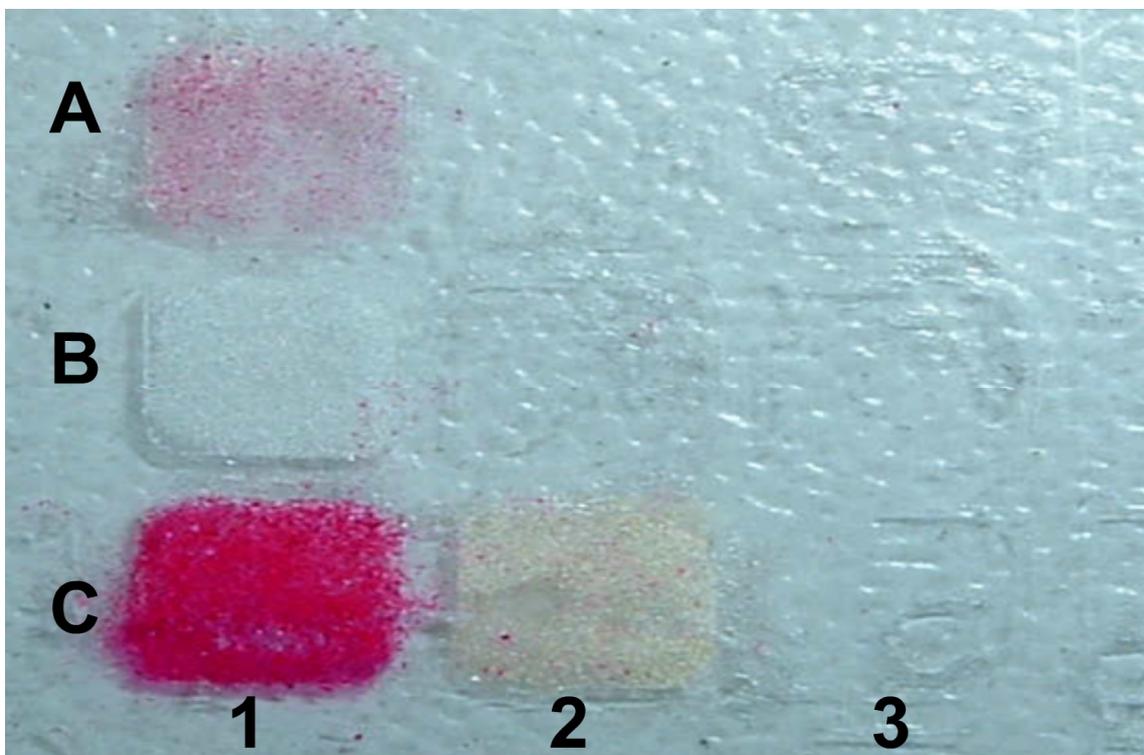
Fluorescein (grün) und Rhodamin (rot) liefern ein starkes Signal. Durch Anregung mit UV-Licht strahlen alle Beads in einem schwachen Blauton.

Für 3-Kanal-Aufnahmen wurden zuerst alle Beads mit UV-Licht zu unspezifischer Fluoreszenz, die durch den Polystyrolkern entsteht, angeregt. Diese erzeugt ein schwaches Signal (Aufnahmezeit ~200 ms) im Blaukanal. Fluorescein liefert ein starkes Signal im Grünkanal (Aufnahmezeit ~20 ms) und Rhodamin ein extrem starkes Signal im Rotkanal (Aufnahmezeit ~4 ms).

Nach der Etablierung des LIPODOT-Transfers wurden diese Carrier Plates für die Optimierung des Transfers, der Block-Protokolle, der Bindungsmessungen und für die Etablierung der Allokation verwendet.

### 5.1.5.2 Carrier Plates der zweiten Generation

Diese Carrier Plates wurden mit der Zentrifugal-Pulverbeschichtung kompartimentiert. Jeweils 4 bis 16 unterschiedliche Beadmischungen wurden in je ein Well der Mikrotiterplatte (Abb.5.39 bis Abb.5.41) eingefüllt und dann wurde mit Zentrifugal-Pulverbeschichtung und anschließendem Kämmen die entsprechende Carrier Plate hergestellt. Es wurde dabei die Homogenität der Bead-Monolayer der einzelnen Kompartimente und die Kompartimentgrenzen untersucht, und der Kämmprozess auf deren Homogenität optimiert.



**Abb. 5.39: Kompartimentierte Carrier Plate**

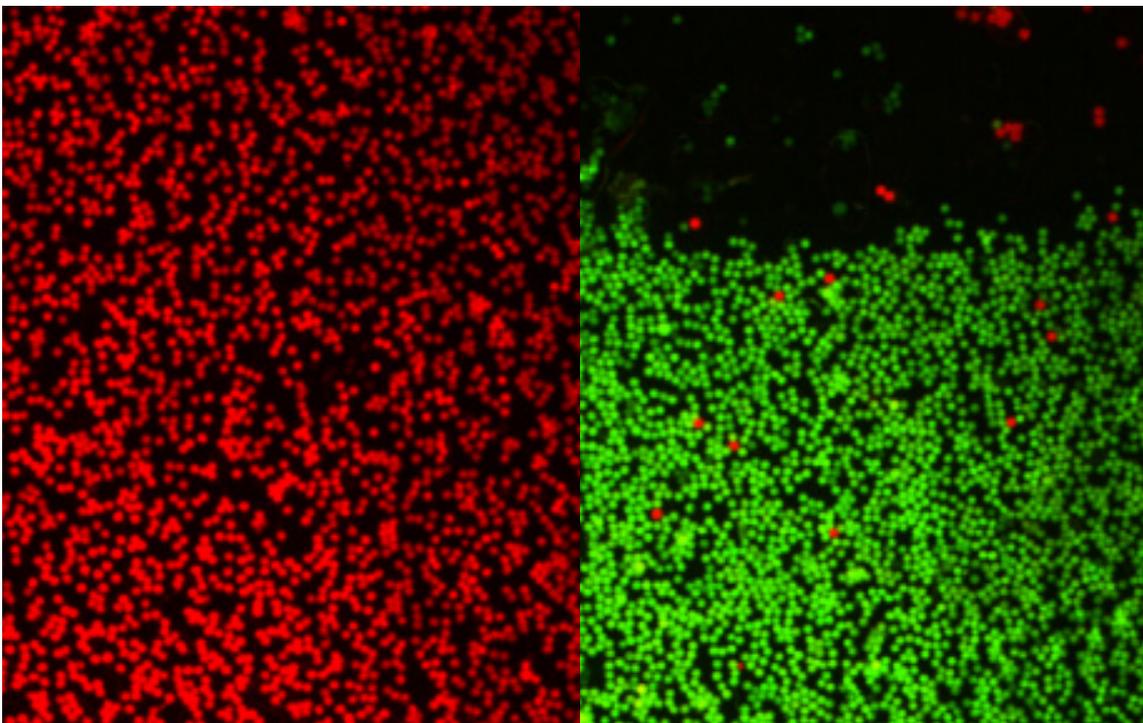
Durch Zentrifugal-Pulverbeschichtung wurden 4 Kompartimente beschichtet. 100% LIPODOT-Rhodamin (C1), LIPODOT-Ankerverbindung 100% (B1), 30% Rhodamin und 70% Ankerverbindung (A1) sowie 10% Fluorescein und 90% Ankerverbindung (C2).



**Abb.5.40: Kompartimentierte Carrier Plates mit identischen Verdünnungsreihen**

Rhodaminbeads wurden mit nativen Synthescharzbeads „verdünnt“. 100% (A1), 50% (B1), 20% (C1), 10% (A2), 8% (B2), 5% (C2), 2% (A3), 1% (B3), 0,5% (C3), 0% (D3). Des Weiteren wurden 100% Fluorescein (D2) und 10% (D1) aufgetragen.

Die rechte Carrier Plate wurde schon dem kompletten Zentrifugal-Pulverbeschichtungsverfahren unterzogen und besitzt eine geringere „Farbstärke“ als die linke Platte, die nur ein Mal zentrifugiert wurde.



**Abb. 5.41: Mikroskopaufnahmen der rechten Carrier Plate aus Abb.5.40**

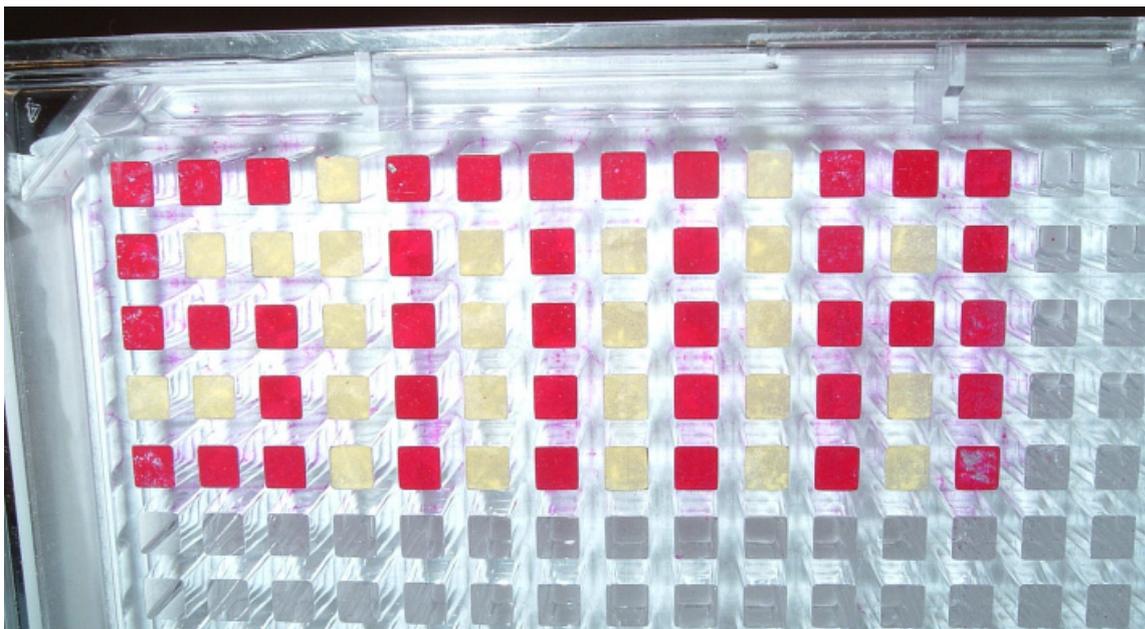
Im Bereichs A1 mit 100% Rhodaminbeads (linke Aufnahme) sind keine Kontaminationen durch andere Beads zu sehen. Jedoch konnten im Bereich D2 mit 100% Fluorescein (rechte Aufnahme) einige Rhodaminkontaminationen nachgewiesen werden.

Um Kreuzkontaminationen während des Kämmstschritts zu vermeiden, wurde stets nur eine Reihe von Kompartimenten gekämmt und danach der Metallgrat mit Druckluft gereinigt. Ebenso wurde nach der Beschichtung ein Reinigungsschritt mittels Druckluft eingeführt, der die Beaddichte zwar erniedrigt, jedoch auch Kreuzkontaminationen nahezu unterbindet.

Mikroskopische Auszählungen einzelner Bilder und Vermessung der Kompartimente ergaben, dass zwischen 18.000 bis 22.000 Beads pro Kompartiment auf der Carrier Plate immobilisiert wurden.

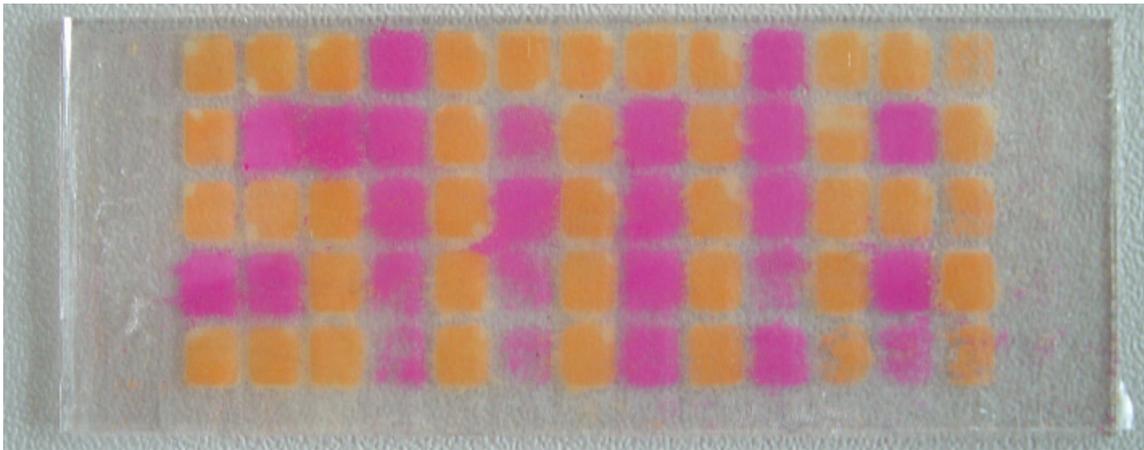
### 5.1.5.3 Carrier Plates der dritten Generation

Die Carrier Plates der dritten Generation wurden für die hochparallele Vermessung molekularer Interaktionen von über 50 Teilkollektionen (nach 4.3.2.3) eingesetzt. Üblicherweise umfassten sie 60 bis 65 Kompartimente (Abb.5.42) und bedeckten somit nahezu ein komplettes Mikroskopslide (25 x 75 mm). Bei 20.000 immobilisierten Beads pro Kompartiment ergeben sich so 1,3 Millionen Beads pro Carrier Plate und damit später entsprechend viele LIPODOTs pro Assay Plate. Für die ersten Carrier Plates dieser Generation wurden Rhodamin- und Fluoresceinbeads in Mikrotiterplatten gefüllt (Abb.5.42). Die erzeugten Carrier Plates (Abb.5.43) wurden zur Entwicklung der Transferapparaturen verwendet.



**Abb. 5.42: Mit Fluorescein- und Rhodaminbeads befüllte Mikrotiterplatte**

Der SMA-Schriftzug aus 5 x 13 Kompartimenten diente zur Etablierung eines LIPODOT-Transfers im Format der Carrier Plates der 3. Generation und zur Entwicklung der Transferapparaturen.



**Abb. 5.43: Carrier Plate mit 5 x 13 Kompartimenten**

Aufnahme der Carrier Plate direkt nach einem Transfer  
 Der einsetzende Trocknungsprozess ist an den helleren Kanten der orangenen Quadrate zu erkennen. Die Carrier Plate enthält 25 Rhodamin- und 40 Fluorescein-Kompartimente und damit ca. 0,5 Millionen Rhodamin- und 0,8 Millionen Fluoresceinbeads.

Eine weitere Carrier Plate (Abb.5.44) mit 5 x 13 Kompartimenten wurde aus 10 verschiedenen Beadmischungen erzeugt. Sie diente zur genauen Einstellung des Transferapparates für den LIPODOT-Transfer in Bezug auf Belichtungszeit, Befeuchtungszeiten, Trocknungszeit, Transferdruck und Transferdruckdauer. Diese Carrier Plate zeigte eine Bead-Monolayer mit einer Beaddichte von ca. 180.000 pro  $\text{cm}^2$  und wurde analog zu den Carrier Plates der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion hergestellt. Diese Carrier Plate (Abb.5.45 und Abb.5.46)) wird im Folgenden als Grundeinstellungs-Carrier Plate bezeichnet. Sie wurde direkt vor dem LIPODOT-Transfer der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion zur Ermittlung der Prozessparameter verwendet.



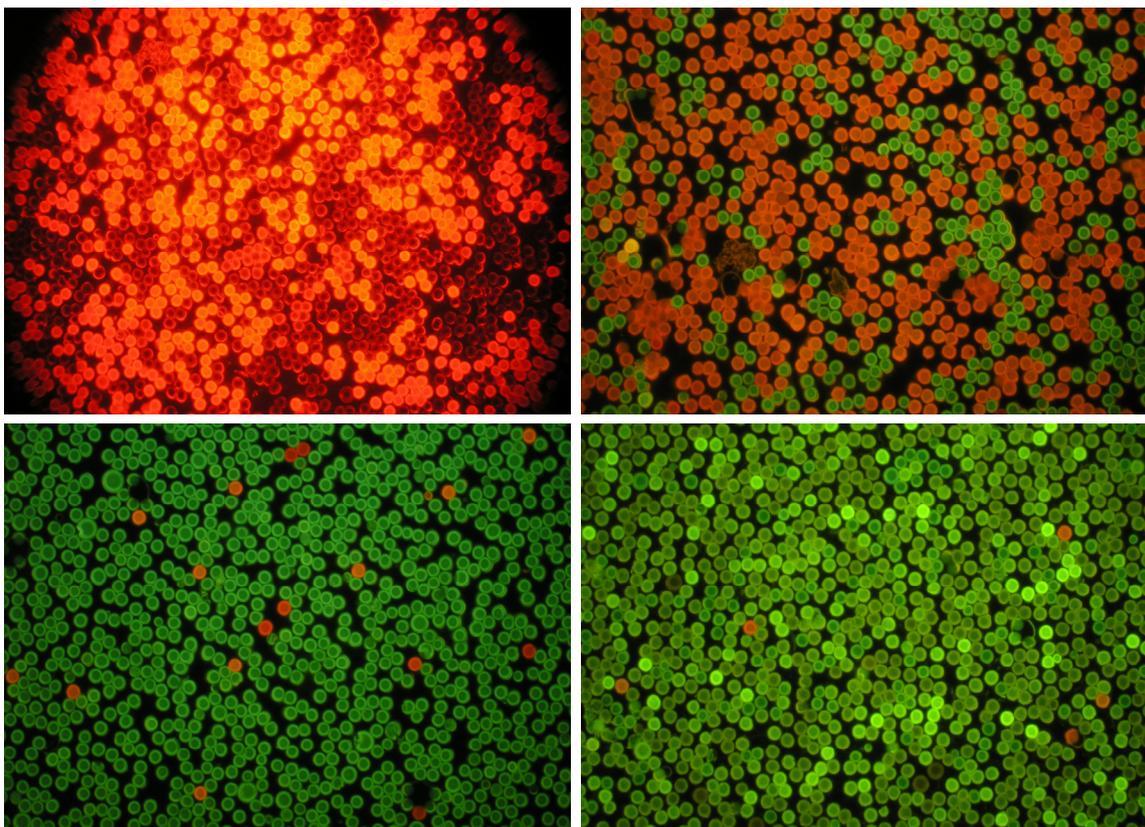
**Abb. 5.44: Mikrotiterplatte zur Herstellung der Grundeinstellungs-Carrier Plate**

Der Tesafilmträger ist bereits aufgeklebt und die Beschichtungszentrifugation wurde bereits durchgeführt.



**Abb. 5.45: Grundeinstellungs-Carrier Plate mit 65 Kompartimenten**

Diese Carrier Plate wurde zur Festlegung der LIPODOT-Transfer-Parameter verwendet und enthält 10 unterschiedliche Beadmischungen. Nach dem Kämmen ist die Färbung der Carrier Plate deutlich schwächer (im Vergleich zu Abb.5.44) da nur noch Bead-Monolayer vorhanden waren, die das Licht deutlich schwächer streuten.

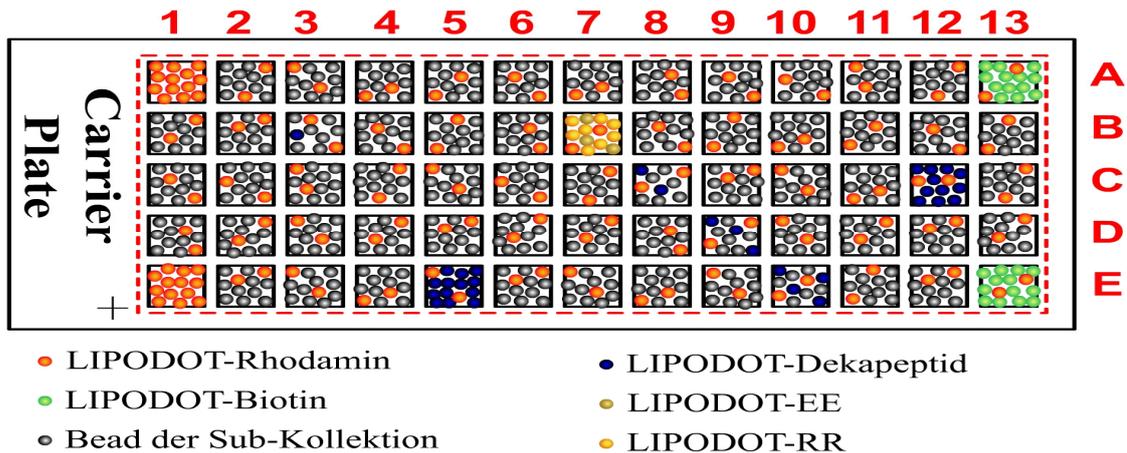


**Abb. 5.46: Fluoreszenz verschiedener Kompartimente der Grundeinstellungs-Carrier Plate**

Einzelne Kompartimente der Grundeinstellungs-Carrier Plate enthalten unter anderem Kompartimente mit Mischungen aus LIPODOT-Rhodamin- und leeren Beads (oben links), LIPODOT-Rhodamin- und LIPODOT-Fluorescein (oben rechts) sowie LIPODOT-Fluorescein mit ~2% LIPODOT-Rhodamin (unten links). Zudem wurde auf die Dipeptid-Kollektion Fluorescein gekuppelt und mit ~2% LIPODOT-Rhodamin versetzt (unten rechts), was unter anderem den etwas ungleichmäßigeren Farbton der grünen Beads im Vergleich zu dem deutlich homogeneren LIPODOT-Fluorescein (unten rechts). Es war überall eine Bead-Monolayer vorhanden, die über eine ähnliche mittlere Dichte verfügte.

### 5.1.5.4 Carrier Plates zur Vermessung der $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektionen

Nach Entwicklung der Transferapparaturen wurde die  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion (5.1.2.4) mit ihren 289 Teilkollektionen, unter Rücksprache mit dem Kooperationspartner Novartis IST (Wien) in das Format von 5 Carrier Plates mit je 5 x 13 Feldern aufgeteilt. Es wurde darauf geachtet, dass jede dieser „Tetrapeptid“ Carrier Plate einen identischen Aufbau besitzt (Abb.5.47).



**Abb. 5.47: Aufbau der Tetrapeptid Carrier Plates**

Jede dieser Carrier Plates enthält jeweils 58 Bead-Teilkollektionen der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion (5.1.2.4). Identisch sind 7 Kontrollfelder. Zwei LIPODOT-Rhodamin (A1 und A5), zwei LIPODOT-Biotin (M1 und M5), zwei LIPODOT-Dekapeptid (N3 und E5) und ein Mix aus LIPODOT-RR und LIPODOT-EE (G2).

Pro Carrier Plate konnten aufgrund der Wahl der Mikrotiterplatten und des manuell durchgeführten Kämmens maximal 65 Kompartimente erzeugt werden. Den 289 Teilkollektionen der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion wurden jeweils ~3% Beads mit LIPODOT-Rhodamin zugesetzt. Jede einzelne Teilkollektion wurde danach 5 mal mit 65°C warmem tBu-OH gewaschen, mit Ultraschall behandelt, schockgefroren und für 2 Tage lyophilisiert. Jeweils 8 bis 10 mg Beads wurden dann auf 5 Mikrotiterplatten aufgeteilt (Tab.5.2 bis Tab.5.6). Pro Carrier Plate wurden so 58 Teilkollektionen übertragen (Abb.5.48). Um die maximale Menge an Kompartimenten zu übertragen, wurden die restlichen 7 Kompartimente für zusätzliche Kontrollen verwendet. Daher enthält jede der 5 Tetrapeptid Carrier Plates

- 58 Kompartimente mit Teilkollektionen der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion zur Messung molekularer Interaktionen mit verschiedenen Bindungspartnern
- 2 Kompartimente mit LIPODOT-Rhodamin-Beads als Transfer-Kontrolle
- 2 Kompartimente mit LIPODOT-Biotin als Kontrolle der Bindung mit Streptavidin

- 2 Kompartimente mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(βAla-βAla-β<sup>3</sup>hE-β<sup>3</sup>hF-β<sup>3</sup>hV-β<sup>3</sup>hK-β<sup>3</sup>hW-β<sup>3</sup>hV-β<sup>3</sup>hE-β<sup>3</sup>hL-β<sup>3</sup>hV-β<sup>3</sup>hK)-NHMe (nach Angaben des Kooperationspartners Novartis IST, Wien) als Kontrolle der Bindung mit einem Rezeptor
- 1 Kompartiment mit 25% Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(βAla-βAla-E-E)-NHMe und 75% 25% Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(βAla-βAla-R-R)-NHMe, als Kontrolle für unspezifische Bindungen durch elektrostatische Wechselwirkungen
- Weiterhin wurden jeweils 4 Teilkollektionen mit unterschiedlichen Mengen an LIPODOT-Dekapeptid versetzt, um dort ebenfalls die Rezeptor-Bindung nachzuweisen
- Jedes Kompartiment enthält ~3% LIPODOT-Rhodamin Beads, welche fluoreszenten LIPODOTs erzeugen, die als Transferkontrolle und internes Koordinatensystem dienen.

Tamra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Biotin
	AA	AD	AE	AF	AG	AK	AL	AM	AN	AP	AQ	
12	13	14	15	16	17	RR,EE	18	19	20	21	22	23
AR	AS	AT	AV	AW	AY		DA	DD	DE	DF	DG	DK
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		35
DL	DM	DN	DP	DQ	DR	DS	DT	DV	DW	DY	Deka	EA
36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
ED	EE	EF	EG	EK	EL	EM	EN	EP	EQ	ER	ES	ET
Tamra	49	50	51	Deka	256	257	258	259	260	261	262	Biotin
	EV	EW	EY		WA	WD	WE	WF	WG	WK	WL	

**Tab.5.2: Verteilungsschema der Mikrotiterplatte 1 für Tetrapeptid Carrier Plate 1**  
 Nummerierung entsprechend Tab.5.1

Tamra	= 100% LIPODOT-Rhodamin
RR,EE	= 75% LIPODOT-RR und 25% LIPODOT-EE
Biotin	= LIPODOT-Biotin
Deka	= LIPODOT-Dekapeptid
	= Zugabe von 1; 2; 3 und 4-fachen Mengen an LIPODOT-Dekapeptid

Tamra	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	Biotin
	FA	FD	FE	FF	FG	FK	FL	FM	FN	FP	FQ	
63	64	65	66	67	68	RR,EE	69	70	71	72	73	74
FR	FS	FT	FV	FW	FY		GA	GD	GE	GF	GG	GK
75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85		86
GL	GM	GN	GP	GQ	GR	GS	GT	GV	GW	GY	Deka	KA
87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
KD	KE	KF	KG	KK	KL	KM	KN	KP	KQ	KR	KS	KT
	100	101	102		263	264	265	266	267	268	269	

Tamra	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	Biotin
	LQ	LD	LE	LF	LG	LK	LL	LM	LN	LP	LQ	
114	115	116	117	118	119	RR,EE	120	121	122	123	124	125
LR	LS	LT	LV	LW	LY		MA	MD	Me	MF	MG	MK
126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	Deka	137
ML	MM	MN	MP	MQ	MR	MS	MT	MV	MW	MY		NA
138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ND	NE	NF	NG	NK	NL	NM	NN	NP	NQ	NR	NS	NT
Tamra	151	152	153	Deka	270	271	272	Tamra	273	274	275	Biotin
	NV	NW	NY		WV	WW	WY		YA	YD	YE	

Tab.5.4: Verteilungsschema der Mikrotiterplatte 3 für Tetrapeptid Carrier Plate 3

Tamra	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	Biotin
	PA	PD	PE	PF	PG	PK	PL	PM	PN	PP	PQ	
165	166	167	168	169	170	RR,EE	171	172	173	174	175	176
PR	PS	PT	PV	PW	PY		QA	QD	QE	QF	QG	QK
177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	Deka	188
QL	QM	QN	QP	QQ	QR	QS	QT	QV	QW	QY		RA
189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201
RD	RE	RF	RG	RK	RL	RM	RN	RP	RQ	RR	RS	RT
Tamra	202	203	204	Deka	276	277	278	279	280	281	282	Biotin
	RV	RW	RY		YF	YG	YK	YL	YM	YN	YP	

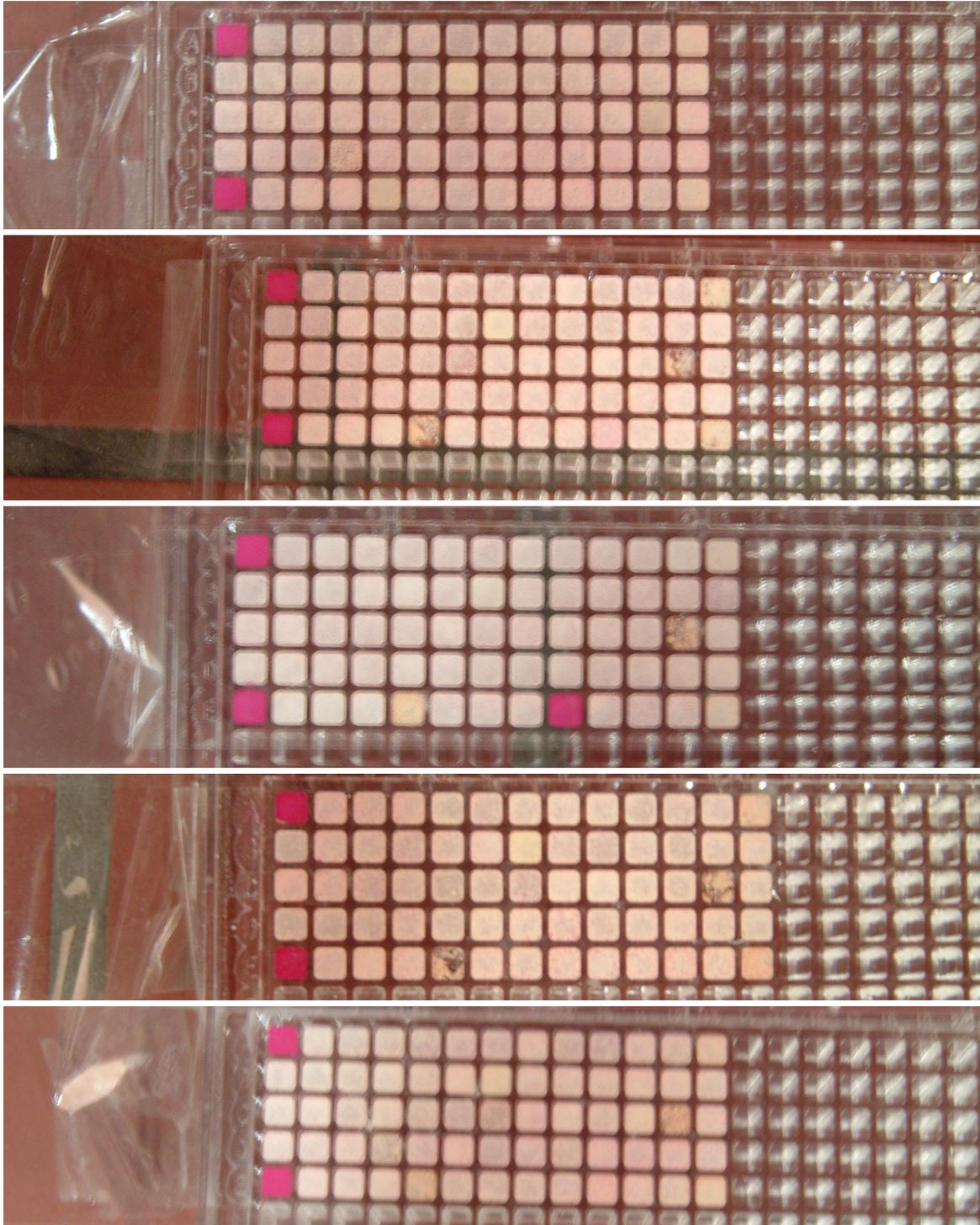
Tab.5.5: Verteilungsschema der Mikrotiterplatte 4 für Tetrapeptid Carrier Plate 4

Tamra	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	Biotin
	SA	SD	SE	SF	SG	SK	SL	SM	SN	SP	SQ	
216	217	218	219	220	221	RR,EE	222	223	224	225	226	227
SR	SS	ST	SV	SW	SY		TA	TD	TE	TF	TG	TK
228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	Deka	239
TL	TM	TN	TP	TQ	TR	TS	TT	TV	TW	TY		VA
240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
VD	VE	VF	VG	VK	VL	VM	VN	VP	VQ	VR	VS	VT
Tamra	253	254	255	Deka	283	284	285	286	287	288	289	Biotin
	VV	VW	VY		YQ	YR	YS	YT	YV	YW	YY	

Tab.5.6: Verteilungsschema der Mikrotiterplatte 5 für Tetrapeptid Carrier Plate 5  
 Nummerierung entsprechend Tab.5.1

- Tamra = 100% LIPODOT-Rhodamin
- RR,EE = 75% LIPODOT-RR und 25% LIPODOT-EE
- Biotin = LIPODOT-Biotin
- Deka = LIPODOT-Dekapeptid
- = Zugabe von 1; 2; 3 und 4-fachen Mengen an LIPODOT-Dekapeptid

Entsprechend des Verteilungsschemas wurden die Carrier Plates (Abb.5.48) hergestellt.



**Abb. 5.48: Die 5 Tetrapeptid Carrier Plates**

Die 5 Carrier Plates wurden entsprechend dem Verteilungsschema (Tab.5.2 bis Tab.5.6) hergestellt. Die Aufnahmen wurden vor dem Kämmen gemacht. Es zeigte sich, dass das LIPODOT-Dekapeptid bei der Zentrifugal-Pulverbeschichtung deutlich verklumpt. Diese Klumpen konnten aber durch das Kämmen entfernt werden.

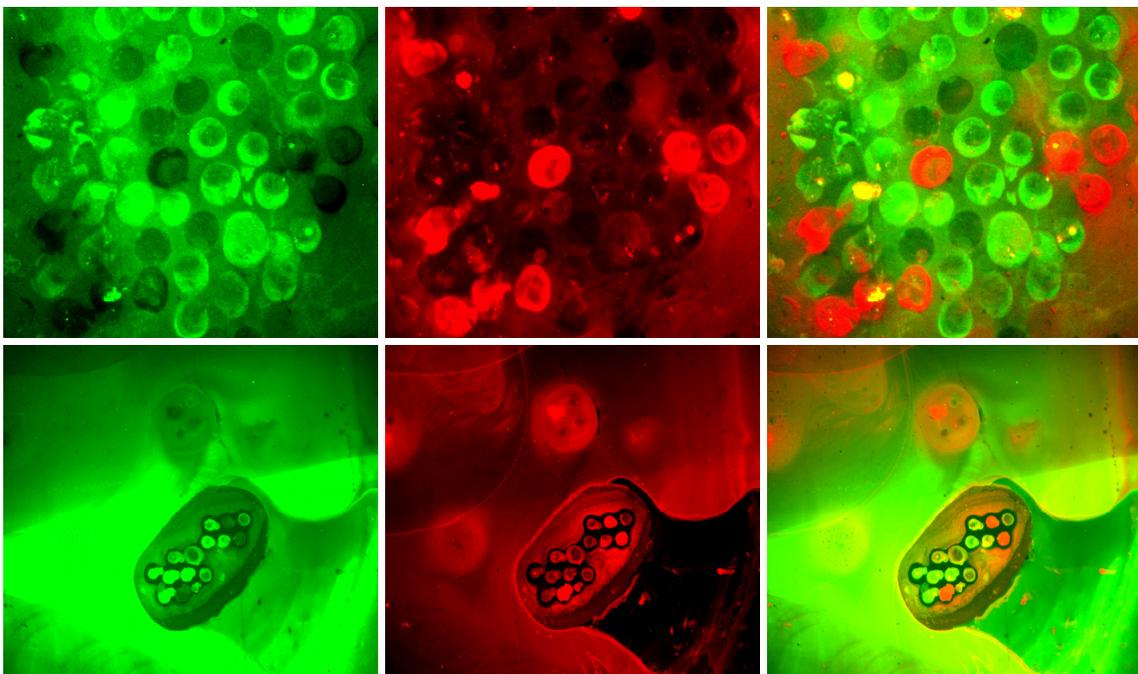
Die Tetrapeptid Carrier Plates wurden gekämmt und danach umgehend für den LIPODOT-Transfer eingesetzt.

### 5.1.6 LIPODOT-Transfer

Beim LIPODOT-Transfer sollen durch einen äußeren Trigger die LIPODOT-Verbindung von den Synthesebeads auf der Carrier Plate abgespalten und über einen Wasserfilm auf die Assay Plate übertragen werden. Diese sollen sich über hydrophobe Wechselwirkungen dort verankern.

#### 5.1.6.1 Erste LIPODOT-Transfers

Die ersten Versuche wurden mit kleinen Carrier Plates der ersten Generation durchgeführt. Die Carrier Plate wurde dazu für 2 min mit Wasser inkubiert, trocken geblasen, direkt mit der Assay Plate in Kontakt gebracht und durch diese hindurch für 5 min mit insgesamt  $1,8 \text{ mJ/cm}^2$  belichtet. Die erste transferierte Carrier Plate enthielt Beads mit LIPODOT-Rhodamin, LIPODOT-Fluorescein und LIPODOT-Ankerverbindung. Dementsprechend wurde für das erste so erzeugte Statistische Mikroarray (Abb.5.49) eine zufällige Anordnung von grün-fluoreszenten, rot-fluoreszenten und nicht-fluoreszenten LIPODOTs auf der hydrophoben Oberfläche erwartet.



**Abb. 5.49: Aufnahmen des ersten Statistischen Mikroarrays mit LIPODOT-Transfer-Technik**

Auf den ersten Blick erkennt man die kreisförmigen Strukturen. Jedoch zeigt sowohl der Fluorescein-Kanal (links) als auch der Rhodamin-Kanal (Mitte) einen extrem starken Hintergrund. In der Überlagerung (rechts) sieht man sehr deutlich, dass einzelne LIPODOTs nur rot oder grün gefärbt sind. Einige LIPODOTs, die dunkler als der Hintergrund sind, dürften durch Beads mit LIPODOT-Ankerverbindung entstanden sein.

Die ersten Ergebnisse zeigten, dass der LIPODOT-Transfer grundsätzlich funktionierte und dass die Dots mit Wasser nicht entfernbar waren. Dies war durch die hydrophoben Eigenschaften der Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe zu erwarten, da sie sich wie das Braunsche Lipoprotein in eine Lipidschicht integrieren sollte und damit den LIPODOT fest auf der hydrophoben Oberfläche verankert. Weder mit Wasser, Aceton, Ethanol, Isopropanol, Hexan noch DCM ließen sich die LIPODOTs vollständig entfernen. Nur durch mechanische Einwirkungen, wie das Rubbeln mit einem DCM befeuchteten Tuch, ließen sich die LIPODOTs weitgehend entfernen. Allerdings zeigten diese LIPODOT-Arrays noch einen enorm starken Hintergrund und Verwaschungen der fluoreszenten Komponenten über den Rand der erzeugenden Carrier Plate hinaus. Weiterhin war noch nicht bestätigt, ob beim LIPODOT-Transfer eine geordnete molekulare Monolayer aus LIPODOT-Verbindungen erzeugt wurde.

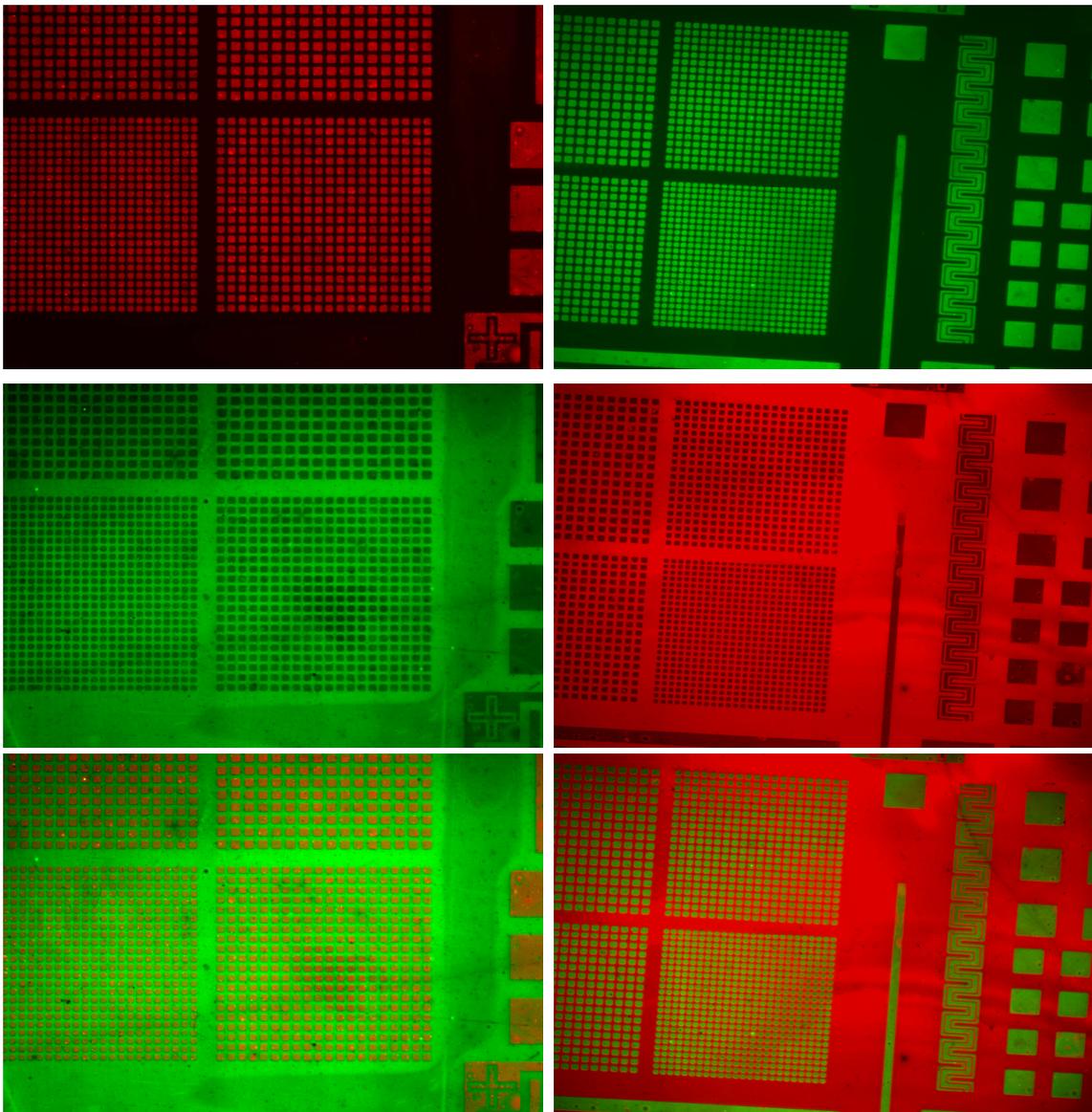
#### 5.1.6.2 Monolayer durch LIPODOT-Transfer?

Nach der Erzeugung der ersten Statistischen Mikroarrays mit Hilfe eines LIPODOT-Transfers stellte sich die Frage, ob es sich um eine molekulare Monolayer aus Pam<sub>3</sub>Cys-Ankern handelt, die absättigbar ist, oder ob sich Multilayer <sup>[276;339]</sup> bilden. Ein erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage ist die Verwendung von Softlithographischem Printing (4.2.3), mit dem man direkt Monolayer herstellen kann. Bei diesem einfachen Stempelprozess <sup>[330]</sup> lagern sich aus der Lösung Moleküle aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf dem Stempel an. Nach Entfernen der Lösung kann die Moleküllage auf eine planare Oberfläche übertragen werden. Die bisherigen Experimente weisen auf eine molekulare Monolayer hin <sup>[189;276;345;346]</sup>.

Eine Übertragung von LIPODOT-Verbindungen mittels Softlithographischen Printings auf eine hydrophile Glasoberfläche war nicht möglich, was in der Hydrophobizität der Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe begründet liegt. Daher wurde auf hydrophobe Oberflächen gestempelt.

Stempel mit Strukturgrößen zwischen 2 und 100 µm wurden entweder mit LIPODOT-Fluorescein oder mit LIPODOT-Rhodamin inkubiert. Danach wurde auf eine hydrophobe Oberfläche gestempelt, damit der LIPODOT-Fluorophor auf diese übertragen wird. Die so bestempelte Oberfläche wurde mit dem jeweils

anderen LIPODOT-Fluorophor überschichtet (Abb.5.50) und auf Colokalisation geprüft.



**Abb.5.50: Softlithographisches Printing von LIPODOT-Verbindungen**

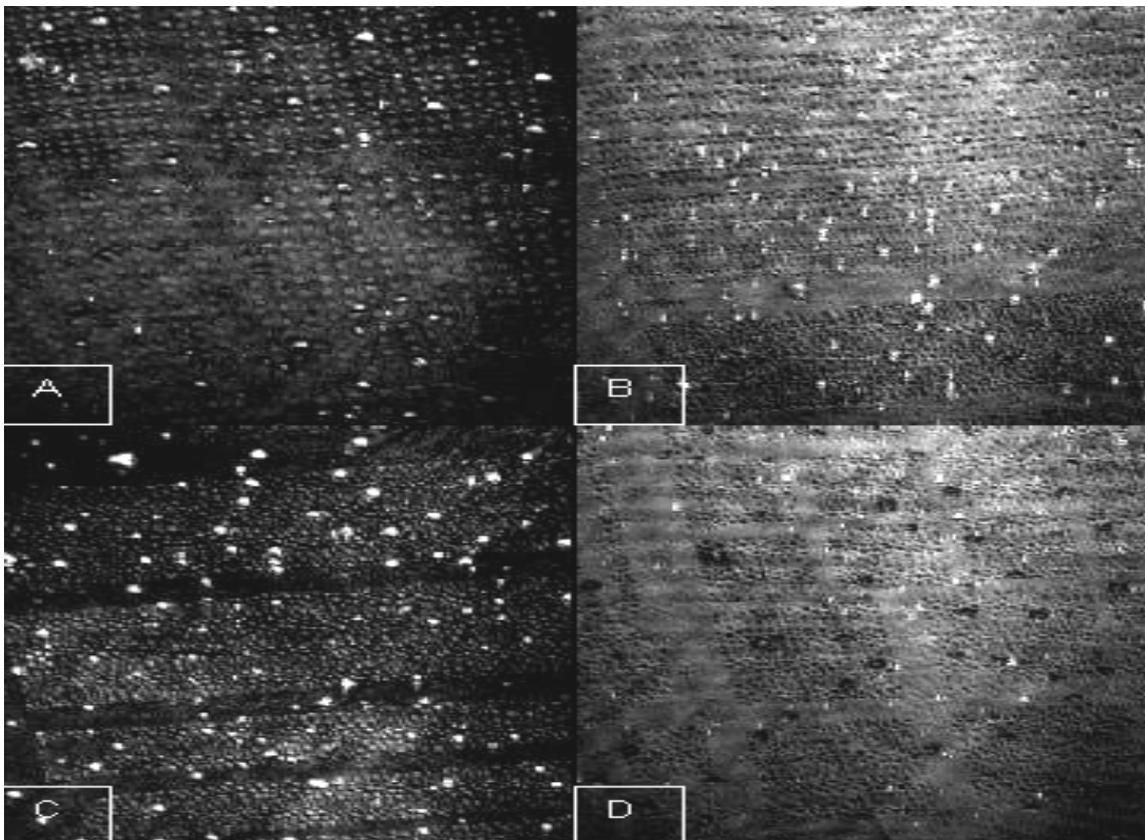
Zuerst wurde ein LIPODOT-Fluorophor gestempelt (obere Reihe). LIPODOT-Rhodamin (links) und LIPODOT-Fluorescein (rechts). Danach wurde die bestempelte Oberfläche mit dem entsprechend anderen Fluorophor überschichtet, wodurch sich dieser auf der noch freien hydrophoben Oberfläche anlagert (mittlere Reihe). Eine Farbkombination beider Bilder zeigte keine Colokalisation der beiden Farbtöne.

Da die Strukturen mittels Softlithographischen Printings auf die Oberflächen übertragen wurden, ist davon auszugehen, dass eine Monolayer unabhängig von der verwendeten LIPODOT-Verbindung erzeugt wurde. Es handelte sich dabei um eine absättigbare Schicht, in die nahezu keine weiteren LIPODOT-Derivate insertieren können. Abschätzungen der Fluoreszenzintensitäten (Abb.5.51) zeigten, dass pro 800 LIPODOT-Moleküle, die bereits in einer Monolage vorliegen ein „externes“ LIPODOT-Molekül insertiert wird.



**Abb. 5.51: Softlithographisches Printing von LIPODOT-Verbindungen**

Zuerst wurde die LIPODOT-Ankerverbindung gestempelt. Danach wurde die Lösung mit dem entsprechend LIPODOT-Fluorescein überschichtet, wodurch sich dieser auf der noch freien hydrophoben Oberfläche anlagert. Man sieht sehr deutlich den Rand des Tropfens. Ein Vergleich zwischen Hintergrund, gestempelten Strukturen und maximalem Fluoreszenzsignal ergab, dass in gestempelten Strukturen eines von 800 LIPODOT-Verbindungen ein LIPODOT-Fluorescein war.



**Abb. 5.52: Bildgebende Ellipsometrie einer gestempelten LIPODOT-Probe (Nanofilm)**

Das Bild wurde aus dem Messprotokoll vom 27.01.2004 der Firma Nanofilm entnommen und zeigt verschiedene Aufnahmen einer zu Abb.5.51 identischen Probe. Die dargestellte Helligkeit ist ein Maß für die Drehung des Phasenwinkels.

Eine mittels Softlithographischen Printings hergestellte Proben wurde mit bildgebender Ellipsometrie (Abb.5.52) vermessen <sup>[1]</sup>. Die Proben enthielten eine Beschichtung aus reinem Silan, Silan mit LIPODOT-Ankerverbindung, sowie einzelne Stufen eines Bindungsassays zwischen LIPODOT-Biotin und Streptavidin. Zudem wurden eigene Ellipsometrie-Messungen zur Schichtdickenbestimmung (Tab.5.7) durchgeführt.

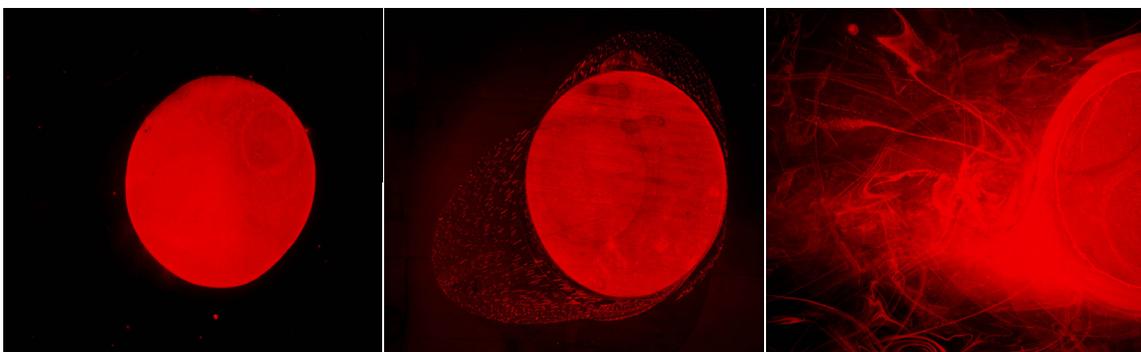
**Tab.5.7: Vermessung mittlerer Schichtdicken mittels Ellipsometrie <sup>[1]</sup>**

Schichtfolge	Schichtdicke (eigene Messungen)	Schichtdicke (Nanofilm)
Silan	13,2 nm	13,4 nm
LIPODOT-Ankerverbindung	3,8 nm	3,6 nm
LIPODOT-Ahx-Ahx-Biotin	4,1 nm	3,9 nm
LIPODOT-Rhodamin	4,0 nm	4,0 nm
LIPODOT-Ahx-Ahx-Biotin-Streptavidin	9,2 nm	9,9 nm

Die Daten für die Schichtdicke der LIPODOTs lagen stets im Bereich zwischen 3,5 und 4,5 nm. Dies entspricht einer halben Lipidbilayer-Membran <sup>[347-353]</sup> von 4,2 nm. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich beim LIPODOT-Transfer stets um eine Monolayer handelt, die zusammen mit der Silanschicht einer Lipidbilayer-Membran entspricht.

### 5.1.6.3 Moleküldichte der LIPODOT-Monolayer

Für Funktionalitätstests wurde ein Tropfen einer wässrigen LIPODOT-Rhodamin-Lösung auf einer hydrophoben Oberfläche abgesetzt und eingetrocknet. Danach wurde die Oberfläche gewaschen und untersucht (Abb.5.53).



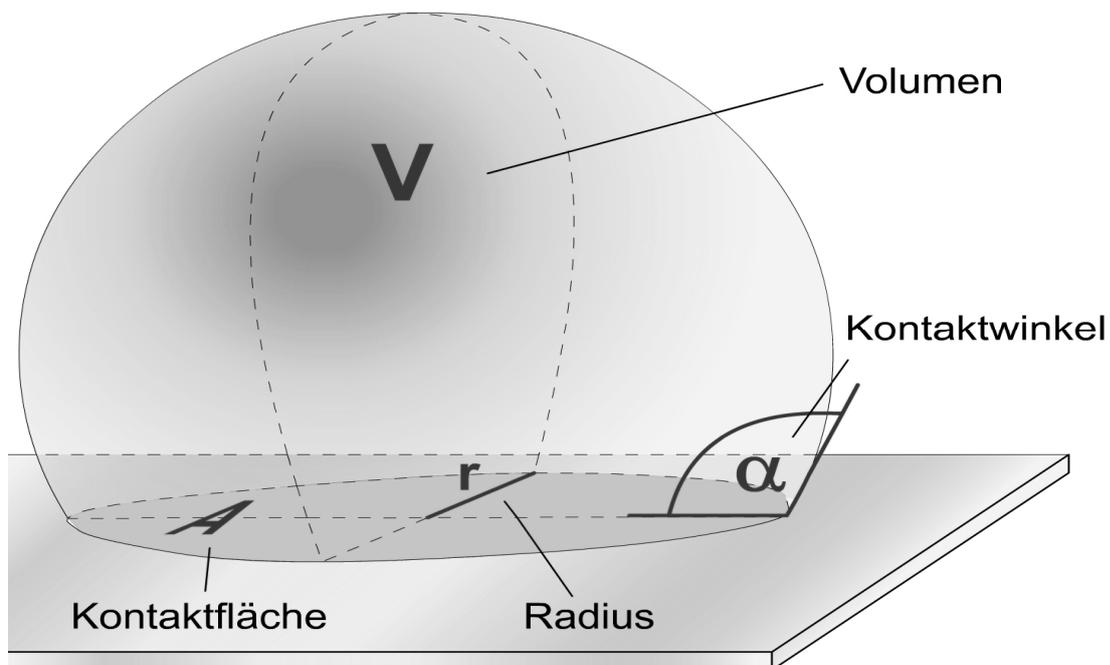
**Abb. 5.53: LIPODOT-Transfer durch Aufsetzen eines Tropfens**

Verschieden große Tropfen einer LIPODOT-Rhodamin-Lösung wurden auf einer hydrophoben Oberfläche abgesetzt und eingetrocknet. Nach dem Waschen zeigte sich ein deutliches „Ausbluten“ bei größeren Tropfen. Ein weiteres Waschen veränderte jedoch nicht diese beim ersten Waschen erzeugten Auswaschungen.

Es zeigte sich, dass kleinere Tropfen eine zumeist sehr homogene Beschichtung nach dem Eintrocknen erzeugten. Größere Tropfen erzeugten hingegen kristallähnliche Trocknungsringe und bluteten stets bei Kontakt mit Wasser aus. Die Ausblutungen bildeten Schlieren, die wie Rauchscheier aussahen und sich durch einen weiteren Waschprozess nicht mehr veränderten.

Wie schon zuvor beobachtet, ändert sich eine etablierte LIPODOT-Monolayer nicht im Kontakt mit Wasser. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein großer Tropfen beim Eintrocknen einen Multilayer oder Kristallite bildet, die sich bei erneutem Kontakt mit Wasser wieder lösen. Beim Kontakt mit der noch nicht belegten hydrophoben Oberfläche (außerhalb des Eintrocknungsgebietes des ursprünglichen Tropfens) bindet das LIPODOT-Rhodamin sofort an diese und lässt sich danach nicht wieder mit Wasser entfernen.

Wird ein Tropfen auf einer hydrophoben Oberfläche abgesetzt, so bildet sich ein kugelförmiges Volumen  $V$  (Abb.5.54) mit einer LIPODOT-Rhodamin Konzentration  $c_0$  und einer Kontaktfläche  $A$ . Diese Kontaktfläche  $A$  wird durch den Kontaktwinkel  $\alpha$  und das Volumen  $V$  festgelegt. Geht man von einer molekularen Monolayer aus, so wird diese eine maximale Dichte  $\sigma_{\max}$  an Molekülen aufnehmen können. Ausbluten kann nur stattfinden, wenn das Volumen mehr Moleküle enthält, als auf der Fläche anbinden können.



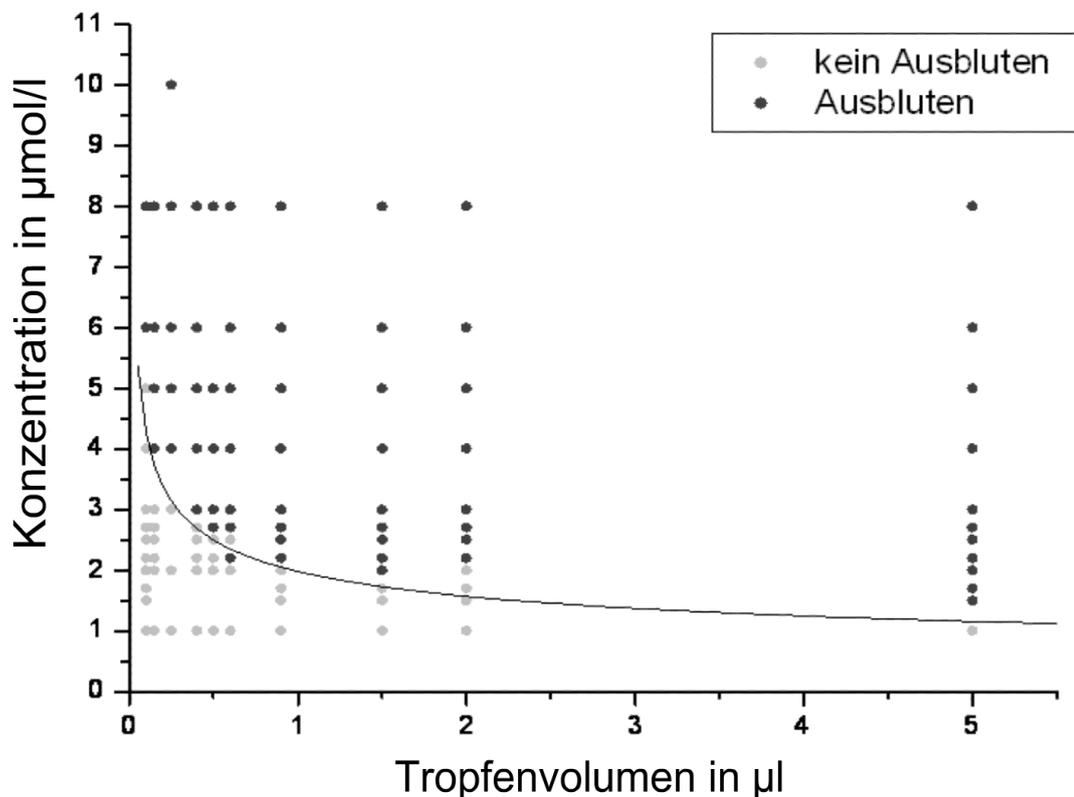
**Abb. 5.54: Schema des Tropfenvolumens**

Ein auf einer Oberfläche aufgesetzter Tropfen wird durch sein Volumen, den Radius, den Kontaktwinkel und die Berührfläche definiert.

Für die maximal absorbierbare Konzentration  $c_{\max}$  ergibt sich dann:

$$c_{\max} = \sigma_{\max} \cdot \sqrt[3]{\frac{9\pi}{V}} \cdot \left( \frac{\sin^3 \alpha}{(1 - \cos \alpha) \cdot (\sin^2 \alpha - \cos \alpha + 1)} \right)^{\frac{2}{3}}$$

Daher wurden Tropfen mit unterschiedlichem Volumina und unterschiedlichem Konzentrationen an LIPODOT-Rhodamin auf hydrophobe Oberflächen mit  $110^\circ$  Kontaktwinkel aufgesetzt, eingetrocknet, mehrfach gewaschen und auf „Ausblutung“ überprüft (Abb.5.55).

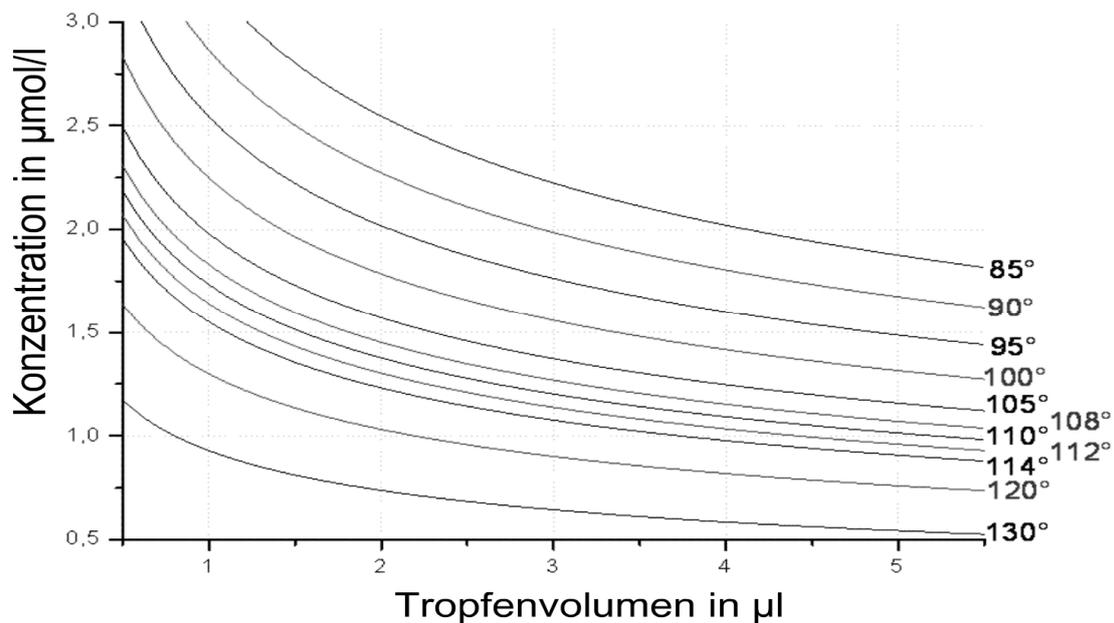


**Abb. 5.55: Ausbluten in Abhängigkeit von Konzentration und Tropfenvolumen**

Mit zunehmender Tropfengröße bluten auch Tropfen mit kleineren Konzentrationen aus. Anhand des Quotienten aus Volumen des Tropfens zur Kontaktfläche ließ sich eine volumenabhängige Grenzkonzentration (schwarze Linie) berechnen. Bei einer Grenzkonzentration von  $1,96 \mu\text{mol/l}$  und  $110^\circ$  Kontaktwinkel findet daher kein Ausbluten bei Volumina unter  $1 \mu\text{l}$  statt.

Durch das „Ausblutungsexperiment“ (Abb.5.55) konnte aus der Grenzkonzentration von  $1,96 \mu\text{mol/l}$ , einem Volumen von  $1 \mu\text{l}$  und einem Kontaktwinkel von  $110^\circ$  eine Oberflächendichte von  $1,51$  Molekülen pro  $\text{nm}^2$  bestimmt werden. Dies ist in Übereinstimmung zu Literaturwerten von  $1,58$ - $1,76$  Molekülen pro  $\text{nm}^2$  auf flüssigen Oberflächen <sup>[276;354]</sup>.

Aus den erhaltenen Werten wurde ein Sättigungsdiagramm (Abb.5.56) für Tropfenvolumina und Grenzkonzentration für verschiedene Kontaktwinkel berechnet. Anhand dieses Diagramms wurden spätere LIPODOT-Transfers so durchgeführt, dass keine Ausblutungskonzentrationen erreicht wurden.



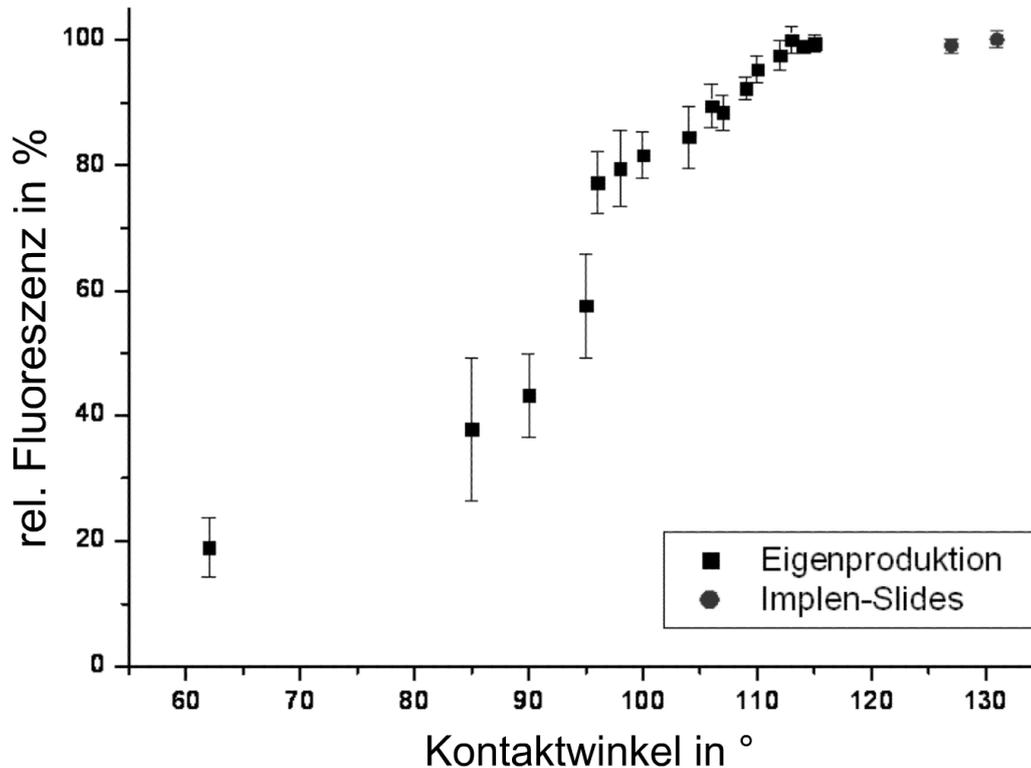
**Abb. 5.56: Sättigungsdiagramm in Abhängigkeit von Konzentration und Volumen**

In Abhängigkeit verschiedener Kontaktwinkel, Volumina und Konzentrationen ist die jeweilige Grenzkonzentration gegeben. Für kleinere Konzentrationen findet kein Ausbluten der erzeugten LIPODOTs statt.

Bisherige Experimente ergaben, dass jede LIPODOT-Verbindung auf einer hydrophoben Oberfläche verankert wurde, was stets durch Negativfärbungen (entsprechend Abb.5.64) gezeigt werden konnte. Man kann also davon ausgehen, dass die Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe ausschlaggebend für die Verankerung und die hydrophobe Wechselwirkung ist. Jedoch wird auch die K<sub>4</sub>-Gruppe als Löslichkeitsvermittler benötigt, da eine Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe nahezu wasserunlöslich ist. Daher sind diese beiden chemischen Gruppen als Gegenspieler für die Phasen-Löslichkeit zu sehen. Überwiegen die Eigenschaften der Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe bleibt die Verbindung vorwiegend in oder auf einem hydrophoben Medium. Überwiegt die K<sub>4</sub>-Gruppe wird sich die Verbindung in oder auf dem hydrophileren Medium befinden.

Daher ist die Hydrophobizität des Trägers ein äußerst kritischer Punkt der LIPODOT-Technik. Sinkt die Hydrophobizität unter einen kritischen Wert, wird sie zu hydrophil für eine Verankerung der Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppen und die Verbindungen

beginnen sich im wässrigen Medium zu lösen. Daher wurden Träger mit unterschiedlichen Kontaktwinkeln (Abb.5.57) ausgewählt, mit einer 50%igen LIPODOT-Rhodamin / LIPODOT-Ankerverbindung Lösung überschichtet, intensiv mit Wasser gewaschen und die Fluoreszenz vermessen.



**Abb. 5.57: Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Kontaktwinkel der Assay Plate**

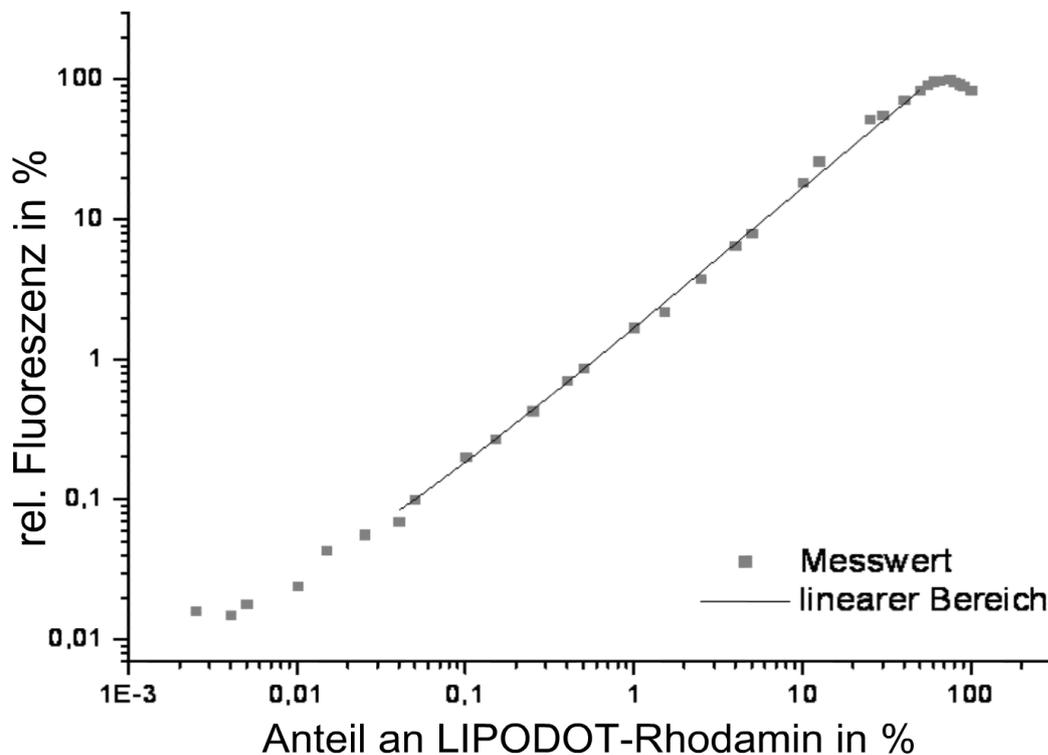
1 µl Tropfen einer Lösung mit einer 50% LIPODOT-Rhodamin und 50% LIPODOT-Ankerverbindung und einer Gesamtkonzentration 1,5 µmol/l wurden auf unterschiedlich hydrophobe Oberflächen pipettiert, die Oberfläche mehrfach gewaschen und vermessen.

Bei Kontaktwinkeln wie sie luftkontaminiertem Glas entsprechen (60° - 70°) wurde nur 20% der Fluoreszenz gemessen, die sich zudem in keinsten Weise als kreisförmige Struktur darstellte. Vielmehr sahen diese Oberflächen nach einem Trocknungsring aus, der sich selbst durch das ausgiebige Waschen nicht mehr entfernen ließ. Nach 24 h Lagerung in fließendem Wasser war die Fluoreszenz von diesen Gläsern nahezu entfernt.

Mit zunehmendem Kontaktwinkel wurde die Fluoreszenzintensität höher und näherte sich einem Grenzwert. Dieser konnte noch nachträglich durch den Erwerb der Implen-Slides (Abb.5.57 rot) bestätigt werden. Man kann davon ausgehen, dass bei Kontaktwinkeln oberhalb von 110° der Grenzwert erreicht ist und sich die

molekulare Monolayer durch die Hydrophobizität der Oberfläche optimal etablieren kann. Selbst nach einigen Monaten Lagerung in Wasser blieb die Fluoreszenz von LIPODOTs auf Trägern mit Kontaktwinkel  $>110^\circ$  unverändert.

Um sowohl eine maximale Fluoreszenz als auch ein fluoreszente Verdünnungsreihe zu erhalten, wurde LIPODOT-Rhodamin mit unterschiedlichen Mengen LIPODOT-Ankerverbindung gemischt. So sollten beim Kontakt mit hydrophoben Oberflächen die Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppen miteinander konkurrieren und entsprechend der Mischverhältnisse in Lösung unterschiedliche Mengen an Fluorophor auf der Oberfläche verankert werden. Die Mischungen wurden auf hydrophobe Flächen aufgetropft und die Fluoreszenz der Oberfläche danach vermessen (Abb.5.58).



**Abb. 5.58: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der LIPODOT-Rhodamin-Konzentration**

1  $\mu$ l Tropfen mit unterschiedlichen Anteilen an LIPODOT-Rhodamin zu LIPODOT-Ankerverbindung aber einer Gesamtkonzentration von 1,5  $\mu$ mol/l wurden auf eine hydrophobe Oberfläche (Kontaktwinkel  $>110^\circ$ ) pipettiert und noch vor dem Eintrocknen der Tropfen mit Wasser gewaschen.

Es zeigte sich, dass bei einem Anteil von 75% LIPODOT-Rhodamin, unabhängig von der Gesamtkonzentration aller LIPODOT-Verbindungen, die Fluoreszenz des Rhodamins stets am stärksten war. Bei höheren Konzentrationen scheint ein

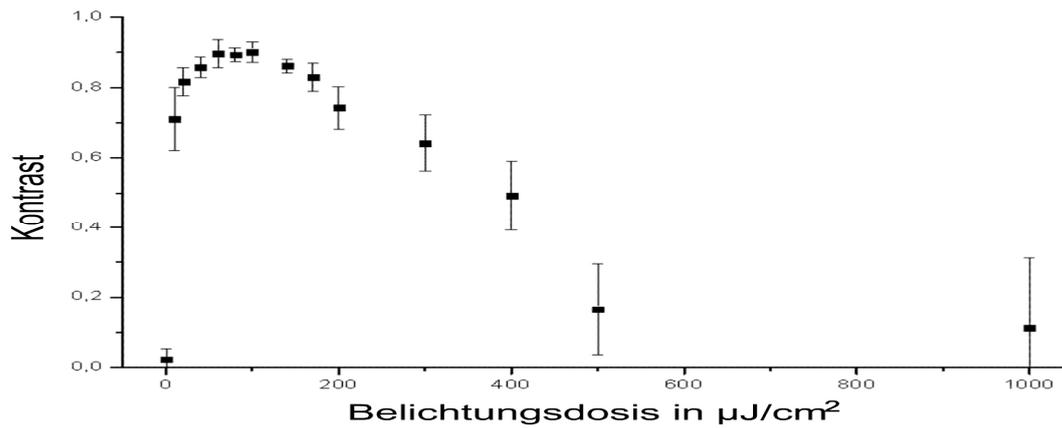
Quenching aufzutreten, welches für Fluorophore jedoch nicht ungewöhnlich ist [49;121;195]. Dieses Quenching ließ sich schon in älteren Aufnahmen wie Abb.5.49 nachweisen. Blutet ein LIPODOT aus, entsteht in seiner Umgebung eine „untersättigte“ Monolayer, also ein größerer mittlerer Abstand zwischen den Fluorophoren, die dann ein höheres Fluoreszenzsignal erzeugten, als die gesättigte und damit „gequenchte“ Monolayer des LIPODOTs. Dieses „Fluoreszenz-intensivere“ Ausbluten war bei nahezu allen LIPODOTs zu beobachten.

Für stärkere Verdünnungen bis unterhalb von 1‰ war ein linearer Abfall der Fluoreszenzintensität zu messen (Abb.5.58). Damit kann ein fluoreszentes LIPODOT-Rhodamin unter 1000 nicht-fluoreszenten LIPODOT-Verbindungen detektiert werden und man kann durch Intensitätsintegration über einen LIPODOT auf die Gesamtmenge an Fluorophoren zurückrechnen. Somit weist die LIPODOT-Technik alle notwendigen Eigenschaften auf, um eine quantitative Bindungsmessung durchzuführen.

#### 5.1.6.4 Optimierung des LIPODOT-Transfers

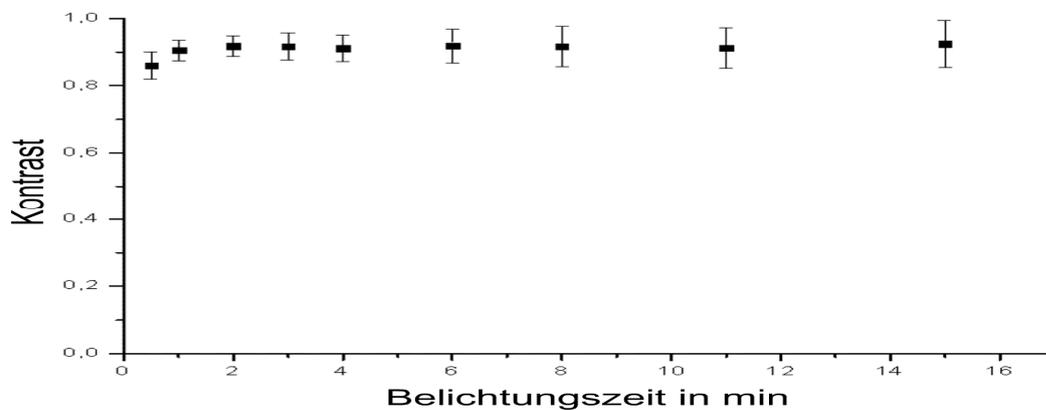
Aufgrund der Untersuchung der Eigenschaften der Monolayer wurde ein etwas anderes Vorgehen zur Übertragung der LIPODOT-Verbindungen gewählt. Die Carrier Plates wurden weiterhin mit Wasser überschichtet und trockengeblasen. Dann wurden die Carrier Plates mit dem Tesafilm nach unten weisend in den Stratalinker gelegt und belichtet. So werden hauptsächlich auf der Transferseite die LIPODOT-Verbindungen abgespalten. Danach wird die Carrier Plate gewendet, auf die Assay Plate gelegt und mit einem Gewicht und somit definierten Druck aufgepresst. Durch Variation des Drucks kann bei gegebenem Kontaktwinkel die Kontaktfläche verändert werden, so dass eine optimale Absättigung und Übertragung möglich wird. Nach Abheben der Carrier Plate wurde die Assay Plate mit Wasser gewaschen und vermessen. Zur Optimierung des LIPODOT-Transfers wurden Belichtungszeit (Abb.5.59), Benetzungszeit (Abb.5.60) und Anpressdruck (Abb.5.61) vermessen.

Die Optimierung wurde in Bezug auf maximalen Kontrast (Definition entsprechend 4.2.2.5) vorgenommen.



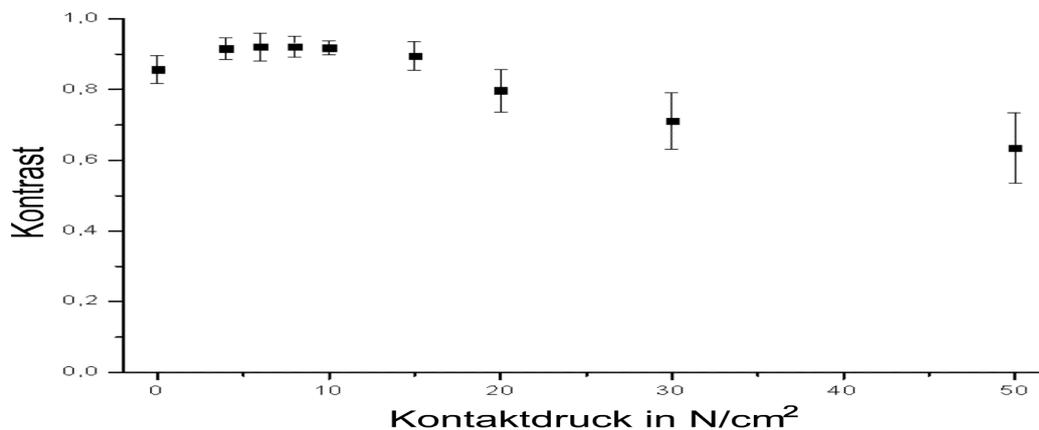
**Abb.5.59: Abhängigkeit des Kontrasts von der Belichtungsdosis**

Der LIPODOT-Transfer wurde mit 10 min Befeuchtungszeit, und einem Transferdruck von  $20 \text{ N}/\text{cm}^2$  durchgeführt. Optimaler Kontrast wurde bei 100 bis  $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  erreicht. Mit zunehmender Belichtungszeit wurde der Hintergrund deutlich stärker und damit der Kontrast schwächer.



**Abb.5.60: Abhängigkeit des Kontrasts von der Befeuchtungszeit**

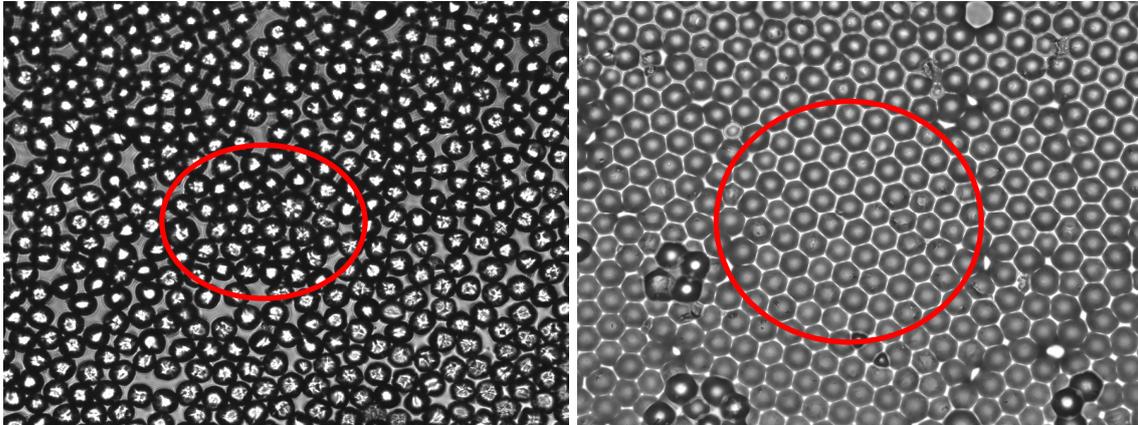
Der LIPODOT-Transfer wurde mit  $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  Belichtungs-dosis und einem Transferdruck von  $10 \text{ N}/\text{cm}^2$  durchgeführt. Optimaler Kontrast wurde schon nach 1 bis 2 min erreicht. Längere Befeuchtungszeit verbesserte den Kontrast nicht, aber vergrößerte die Varianz.



**Abb. 5.61: Abhängigkeit des Kontrasts vom Kontaktdruck**

Der LIPODOT-Transfer wurde mit 10 min Befeuchtungszeit und  $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  Belichtungs-dosis durchgeführt. Optimaler Kontrast wurde bei 8 bis  $10 \text{ N}/\text{cm}^2$  Druck erreicht. Zunehmender Druck sorgte teilweise für Flüssigkeitsaustritt in den Beads und erzeugte so ein hohes Hintergrundsignal.

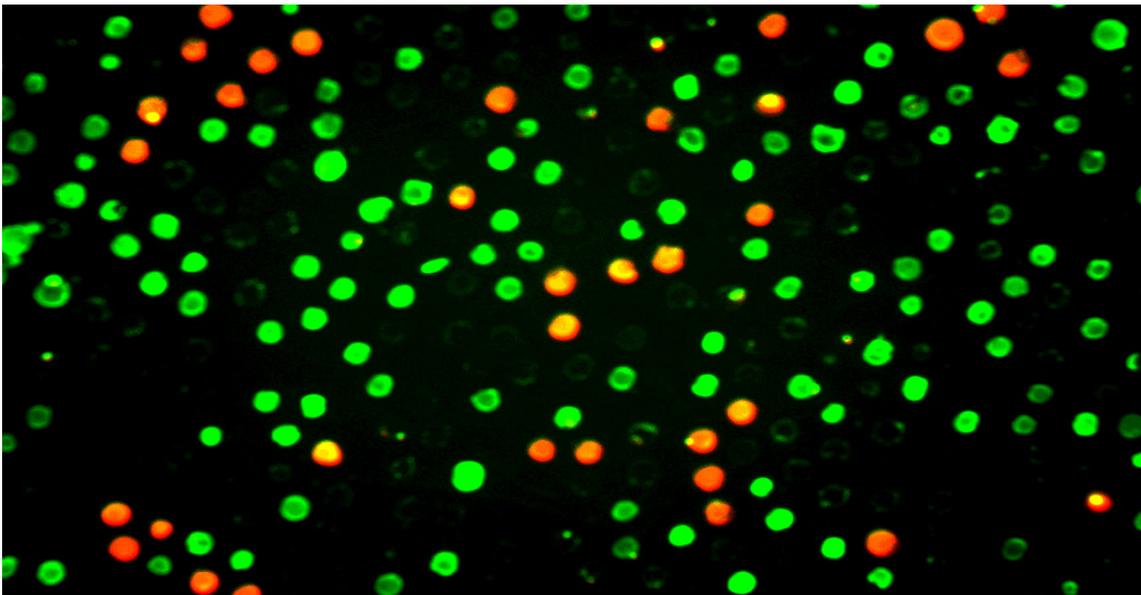
Während verschiedener mikroskopischer Kontrollen (Abb.5.62) zeigte sich, dass bei befeuchteten Carrier Plates die hexagonale Anordnung der Beads deutlich sichtbarer ist als bei trockenen Beads.



**Abb.5.62: Unbefeuchtete und befeuchtete Beads (unterschiedlicher Ausschnitt)**

Schon bei einer unbefeuchteten Carrier Plate (links) war oft eine hexagonal dichteste Packung zu sehen. Jedoch zeigte sich diese Struktur bei den befeuchteten Beads erheblich (rechts) deutlicher, da keine Substrukturierung der Beads mehr sichtbar war und das Quellen durch die Flüssigkeit Zwischenräume zwischen den Beads schließt.

Aufgrund der einzelnen Ergebnisse wurde die Befeuchtungszeit auf 2 bis 5 min begrenzt, die Belichtungs-dosis auf  $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  festgesetzt und der Kontaktdruck auf  $10 \text{ N}/\text{cm}^2$  verringert. So konnten deutlich bessere LIPODOT-Transfers durchgeführt werden (Abb.5.63) und der Kontrast bis auf 0,9 erhöht werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass sämtliche Schritte manuell durchgeführt wurden und damit Strukturen von 10 bis  $12 \mu\text{m}$  Durchmesser erzeugt werden konnten.

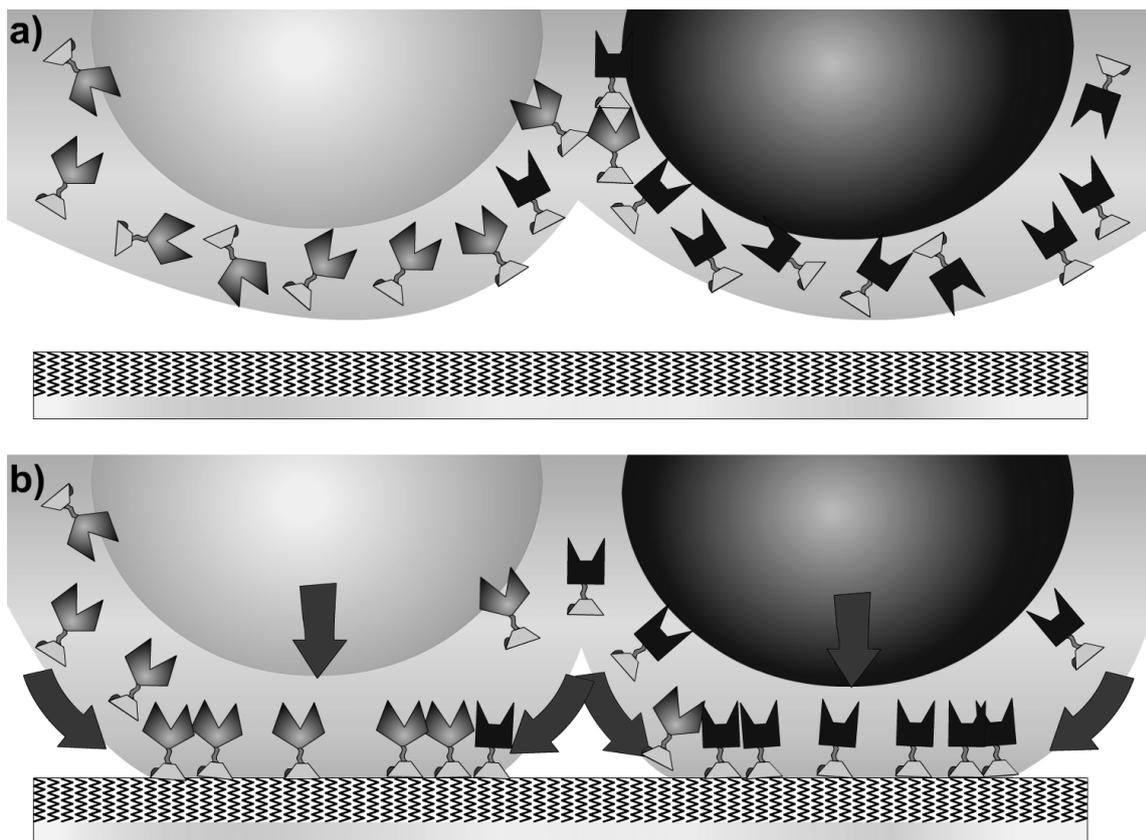


**Abb.5.63: Optimierter LIPODOT-Transfer einer Carrier Plate der ersten Generation**

Die Carrier Plate enthielt LIPODOT-Rhodamin, LIPODOT-Fluorescein und LIPODOT-Ankerverbindung Beads. Unter Verwendung der neuen Transferparameter (5 min Befeuchtungszeit,  $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  Belichtungs-dosis,  $10 \text{ N}/\text{cm}^2$  Transferdruck) konnten deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden als bei den anfänglichen Übertragungen (Abb.5.49).

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse des LIPODOT-Transfers fällt auf, dass die erzeugten LIPODOTs teilweise unterschiedlich hell ausfielen, und die schwächer gefärbten LIPODOTs zeigten zudem eine Helligkeitsverteilung auf. Am Rand war die Fluoreszenz stets etwas heller als im Inneren. Diese Beobachtung bestätigte sich bei LIPODOT-Fluorescein, im Vergleich zu LIPODOT-Rhodamin. Zudem zeigte sich stellenweise neben fluoreszenten LIPODOTs stets geringe Fluoreszenz als Kreuzkontamination in den direkt benachbarten LIPODOTs.

Die unterschiedlich starke Fluoreszenz der LIPODOTs lässt sich, insbesondere bei den LIPODOT-Fluorescein Beads, durch unterschiedlich gute Abspalteffizienz und Belegung erklären. Der Batch der LIPODOT-Rhodamin Beads wies eine höhere Homogenität und höhere Belegung als der Batch der LIPODOT-Fluorescein Beads auf. Die Helligkeitsverteilung innerhalb der LIPODOTs entsteht ebenso durch Diffusion wie die fluoreszente Kreuzkontamination der benachbarten LIPODOTs (Abb.5.64).

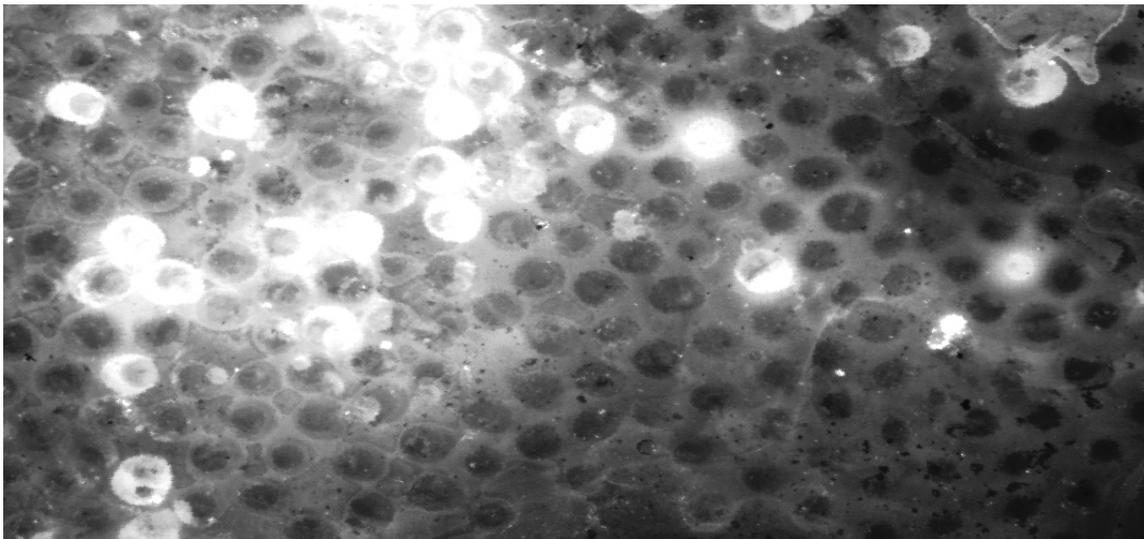


**Abb.5.64: Helligkeitsinhomogenitäten und Kreuzkontamination durch Diffusion**

Vor dem Kontakt sind die Verbindungen homogen im Wasserfilm verteilt (a). Durch den Kontakt mit der hydrophoben Oberfläche verankern sich die LIPODOT-Verbindungen auf dieser (b). Ist die Oberfläche noch nicht abgesättigt, so diffundieren weitere LIPODOT-Verbindungen nach. Dabei erfährt der Rand eines LIPODOTs einen besonders starken Diffusionsstrom (im Vergleich zur Mitte eines LIPODOTs). Ebenso diffundieren die LIPODOT-Verbindungen über Wasserfilm-Kontakte zu Nachbarbeads und in deren LIPODOTs, wodurch eine Kreuzkontamination entsteht.

### 5.1.6.5 Übertragung aller LIPODOT-Verbindungen?

Eine wichtige Anforderung an den LIPODOT-Transfer ist, dass alle LIPODOT-Verbindungen übertragen werden. Da die Ankerverbindung mit einer weiteren Verbindung modifiziert wird, entstehen unterschiedlich lösliche, hydrophobe und geladene Verbindungen. Dies könnte die Transfereffizienz eventuell einschränken. So könnte eine hydrophobe Verbindung die Löslichkeit so weit verringern, dass die daraus entstehende LIPODOT-Verbindung nicht mehr wasserlöslich ist und sich dann nicht mehr während des LIPODOT-Transfers vom Bead lösen lässt. Eine entsprechend hydrophile Sequenz wiederum könnte zwar verstärkt transferiert werden, aber beim nächsten Waschschrift von der hydrophoben Oberfläche gewaschen werden. Daher wurde eine Carrier Plate mit Beads der Dipeptid-Kollektion und LIPODOT-Rhodamin Beads hergestellt und übertragen. Da nicht jede einzelne Verbindung nachgewiesen werden kann, wurde die Assay Plate mit LIPODOT-Fluorescein überschichtet und detektiert (Abb.5.65).



**Abb.5.65: Nachweis des „universellen“ LIPODOT-Transfers**

Eine Carrier Plate mit LIPODOT-Dipeptid und LIPODOT-Rhodamin Beads wurde übertragen und die Assay Plate mit LIPODOT-Fluorescein überschichtet. Die Rhodaminfluoreszenz (weiß) überstrahlt selbst im Fluoresceinkanale das Fluorescein. Man sieht trotzdem deutlich, dass die LIPODOTs deutlich weniger Fluoreszenz als der Hintergrund besitzen.

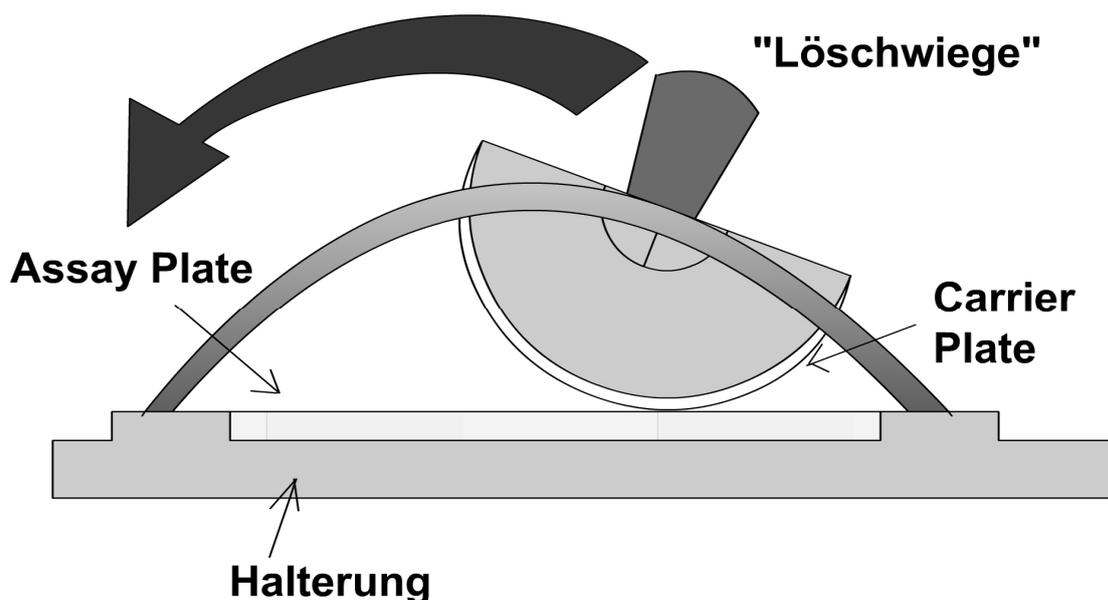
Es zeigte sich, dass das LIPODOT-Fluorescein hauptsächlich den Hintergrund der Assay Plate anfärbte. Diese Negativfärbung zeigt, dass eine Vielzahl von Beads einen LIPODOT (dunkler Kreis in Abb.5.65) erzeugen, in dem sich kaum weiteres LIPODOT-Fluorescein mehr insertieren konnte. Jedoch war diese Färbung recht schwach, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Assay Plates mit Kontaktwinkeln  $>110^\circ$  zur Verfügung standen.

## 5.1.7 Entwicklung der Transferapparaturen

Bei ersten LIPODOT-Transfer-Experimenten wurde der für den Kontakt zwischen Carrier Plate und Assay Plate benötigte Druck durch Auflegen von Gewichten erzeugt. Dies war technisch einfach durchführbar, da die Carrier Plates der ersten Generation nur ein bis zwei cm<sup>2</sup> Fläche bedeckten. Für größere Carrier Plates und Carrier Plates ab der zweiten Generation erwies sich die Erzeugung des Drucks durch Auflegen von Gewichten als stark inhomogen und wurde zudem von Unebenheiten auf der Carrier Plate stark beeinflusst. Bei einer Carrier Plate mit 2,5 x 7 cm Größe würde man knapp 20 kg Gewichte benötigen. Ohne apparative Hilfe ist es demnach nicht möglich, dieses Gewicht mit hinreichender Genauigkeit und ohne Verkantungen auf der Carrier Plate abzusetzen. Daher wurden für größere Carrier Plates unterschiedliche Transferapparaturen entwickelt.

### 5.1.7.1 Löschwiege

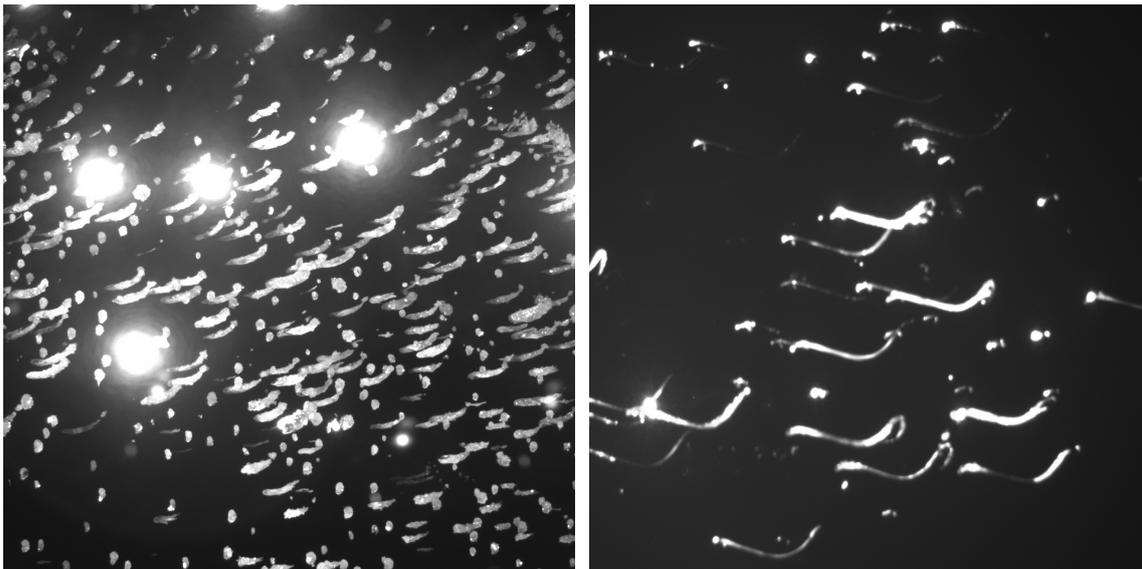
Eine Löschwiege (Abb.5.66) dient zum gleichmäßigen Trocknen von Tinte auf einem Schriftstück, ohne diese zu verwischen. Sie übt nur an der Berührstelle Druck aus und es wird deutlich weniger Gewicht zur Erzeugung des notwendigen Drucks benötigt. Wird nun die Carrier Plate auf eine Löschwiege gespannt und eine Assay Plate anstelle des Schriftstücks verwendet, so wird durch das „Wiegen“ entlang einer Führungsschiene ein LIPODOT-Transfer durchgeführt.



**Abb.5.66: Prinzip der Übertragung mit einer Löschwiege**

Durch das „Wiegen“ wird ein Abdruck der Carrier Plate auf die Assay Plate erzeugt. Eine seitliche Führung verhindert ein Scheren der Bewegung.

Um den entsprechenden Druck zu erzeugen, wurde die Innenseite der Löschwiese mit unterschiedlich großen Gewichten beschwert. Die Carrier Plate wurde an ihren Enden mit einem weiteren Tesafilm auf die Löschwiese geklebt und entsprechend der Ergebnisse von 5.1.6.4 behandelt. Die so durchgeführten LIPODOT-Transfers zeigten einen Kontrast bis zu 0,85. Allerdings zeigten sich „Verschleifungen“ und „Scherschwingungen“ durch die Bewegung der Löschwiese, die insbesondere zum Rand der Löschwiese besonders stark wurden (Abb.5.67). Durch die Bewegung selbst geht die Löschwiese leicht nach links und rechts und verformt sich zudem, da sie den Druck ausgleicht. Dies bewirkt ein „Schlingern“ der Carrier Plate im Bezug zur Assay Plate um 30 µm im Innenbereich (Abb.5.67 links). und um bis zu 100 µm am Rand der Wiege (Abb.5.67 rechts). Beim Trocknen einer Tintenschrift ist diese Ungenauigkeit unerheblich. Für 12 µm große LIPODOTs ist diese Ungenauigkeit jedoch zu hoch und daher nicht zu akzeptieren.

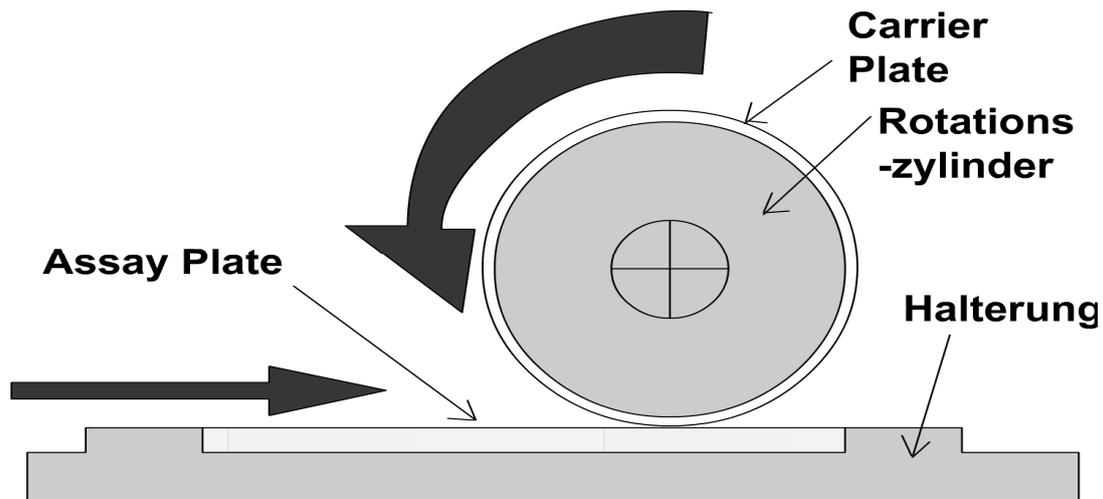


**Abb.5.67: Scherschwingungen beim Transfer mit einer Löschwiese**

Im Innenbereich (links) und am Rand (rechts) der Übertragungen mit der Löschwiese wurden in vielen Bereichen Streifenmuster detektiert, die auf Grund ihrer geschwungenen Form (wie bei längeren Streifen, rechts) als Scherschwingung während der Bewegung identifiziert werden konnten.

### 5.1.7.2 Rotationsdruckpresse

Die nächste untersuchte Übertragungsart war die Verwendung einer Rotationsdruckpresse (Abb.5.68). Dabei wurde die Carrier Plate auf den Rotationszylinder gespannt und die Assay Plate wie beim Zeitungsdruck unter der Walze hindurchgeführt.

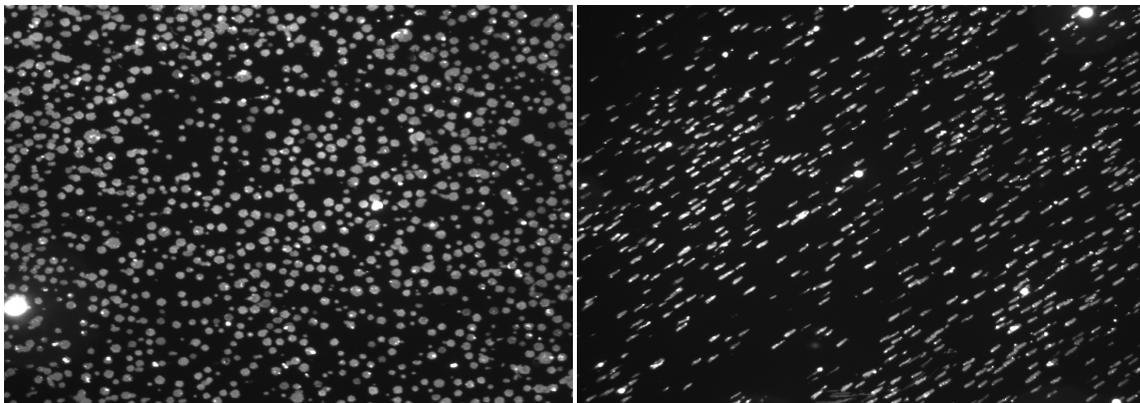


**Abb.5.68: Prinzip der Übertragung mit einer Rotationsdruckpresse**

Die Assay Plate wird unter dem Rotationszylinder, der mit der Carrier Plate bespannt ist, hindurchgeführt.

Durch die Einstellung des Abstandes zwischen Führungsebene der Assay Plate und des Rotationszylinders mit der Carrier Plate wird der entsprechende Transferdruck erzeugt.

Es war allerdings nicht möglich, eine völlig synchrone Bewegung zwischen der Führungsebene und dem Rotationszylinder zu erzeugen. Zu Beginn und am Ende der Assay Plate entstanden stets „Zugstreifen“. Hierbei verrutschte die Assay Plate im Bezug auf die Carrier Plate um 10 bis 20  $\mu\text{m}$  (Abb.5.69 rechts). Im Innenbereich der Assay Plate zeigte sich zwar eine homogen übertragene Fluoreszenz, aber die erzeugten LIPODOTs zeigten eine sehr ungewöhnliche Größenverteilung (Abb.5.69 links). Diese ungleich großen LIPODOTs ließen sich weder mit einer Änderung der Vorschubgeschwindigkeit noch durch Variation des Transferdrucks oder der Feuchtigkeit der Carrier Plate verändern.



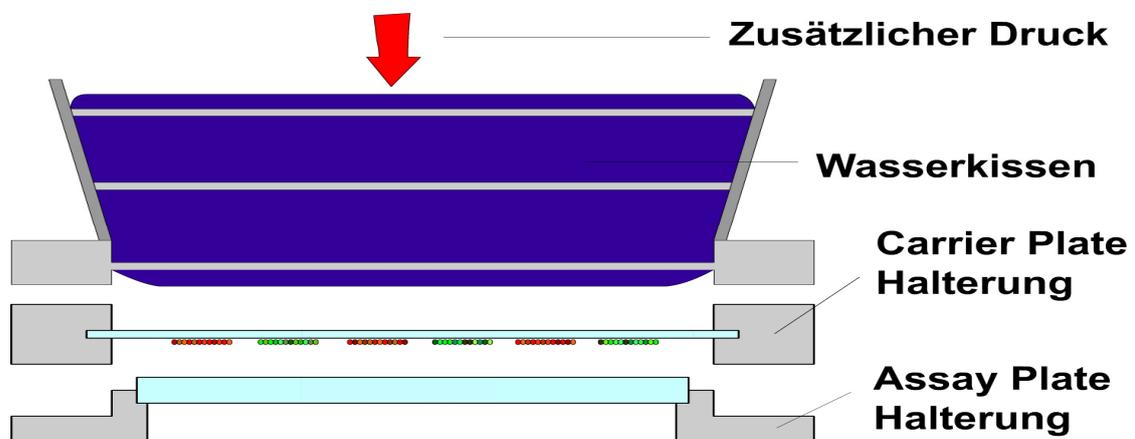
**Abb.5.69: Transfer durch eine Rotationsdruckpresse**

Im Innenbereich (links) der Assay Plate entstanden stets homogen fluoreszente LIPODOTs, die allerdings eine sehr inhomogene Größenverteilung aufwiesen. Am Beginn und Ende der Assay Plate (rechts) entstanden, durch leichte Verschiebung der Assay Plate zudem streifenförmige LIPODOTs.

Da sich weder die inhomogene Größenverteilung noch die Zugstreifen zu Beginn und Ende der Assay Plate unterbinden ließen, schied auch diese Transfertechnik aus.

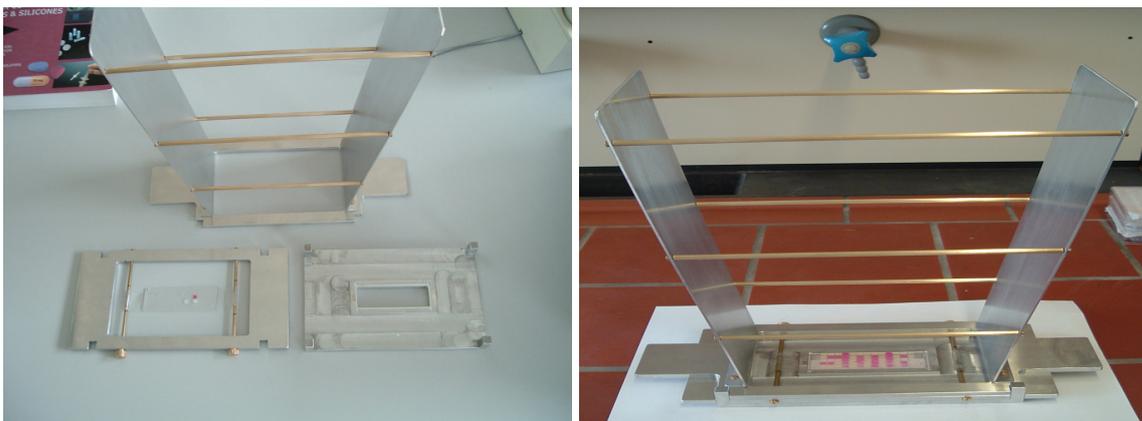
### 5.1.7.3 Hydrostatischer und pneumatischer Transfer

Durch die beweglichen Teile der bisher verwendeten Verfahren entstanden stets Artefakte. Daher wurden im Folgenden nur noch Verfahren verwendet, bei denen sich die Assay Plate in Bezug auf die Carrier Plate nicht mehr bewegte. Analog einer Hub-Druckerpresse (Abb.5.70) wurde eine separate Halterung für die Assay Plate und die Carrier Plate verwendet. Der Druck wurde hydrostatisch über ein Wasserkissen erzeugt, das auf die Oberfläche angepresst wurde.



**Abb.5.70: Prinzip der Übertragung mit einer hydrostatischen Druckvorrichtung**

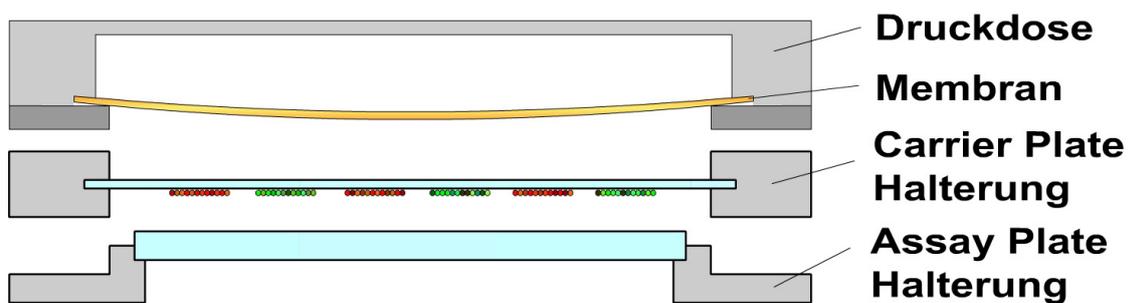
Sowohl Carrier Plate als auch Assay Plate werden separat eingespannt und das Druckkissen darauf abgesenkt. Das Druckkissen sorgt für eine homogene Druckverteilung auf der Carrier Plate.



**Abb.5.71: Einzelteile der hydrostatischen Druckvorrichtung**

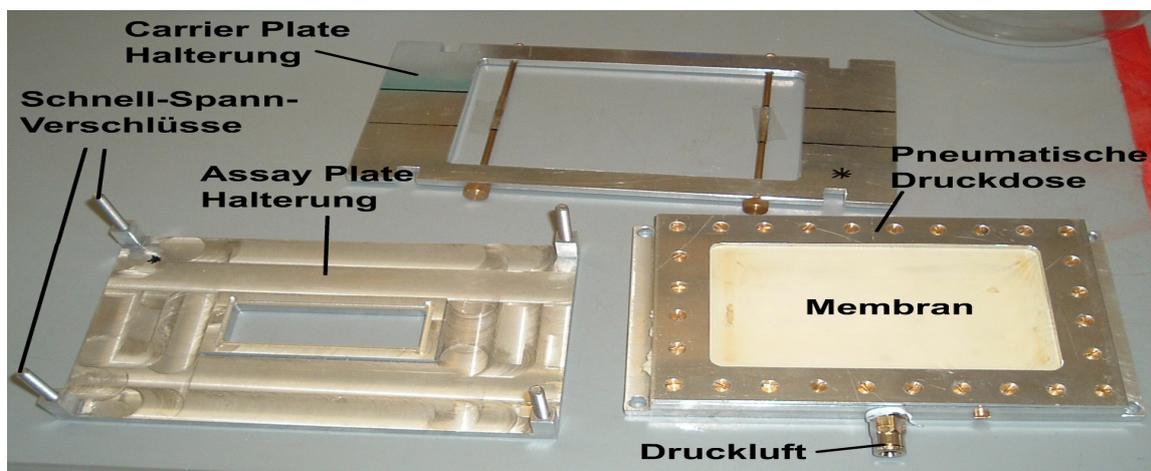
Die Assay Plate wird eingelegt und die Carrier Plate in ihrer Halterung so justiert (a), dass sie exakt über der Assay Plate liegt (b). Eine trichterförmige Führungshalterung dient zur Aufnahme des Wasserkissens. Durch Aufsetzen von Gewichten auf das Wasserkissen kann der Druck auf die Carrier Plate entsprechend erhöht werden.

Mit diesem hydrostatischen Ansatz konnten allerdings selbst bei einem Druck von 10 bar kaum LIPODOT-Transfers erzeugt werden. Es ist davon auszugehen, dass der Druck entweder nicht ausreichte oder durch Rückstellkräfte im System des Wasserkissens kompensiert wurde. Eine weitere Erhöhung des Drucks war jedoch aufgrund der maximalen Belastbarkeit der Führungshalterung (Abb.5.71) für das Wasserkissen nicht möglich. Zudem erwies sich die Handhabung dieser Führungshalterung zum schnellen Wechseln der Assay Plate als unpraktikabel. Daher wurde die Druckerzeugung durch eine einfache Pneumatik (Abb.5.72) ersetzt. Hierbei wurde die Halterung für Carrier Plate und Assay Plate beibehalten und die Führungsschienen der Halterung der Assay Plate als Verankerung für eine Druckdose verwendet. Zwischen Deckel und Boden der Druckdose wurde eine elastische Membran luftdicht eingespannt, so dass diese mittels Druckluft einen entsprechenden Druck auf die Carrier Plate ausüben konnte (Abb.5.73).



**Abb.5.72: Prinzip der Übertragung mit einer pneumatischen Druckvorrichtung**

Wie beim hydrostatischen Ansatz gibt es sowohl eine Halterung für die Assay Plate als auch für die Carrier Plate. Eine pneumatische Druckdose wird mit der Assay Plate verschraubt. Durch Druckluft erzeugt die in der Druckdose enthaltene Membran einen entsprechenden Druck auf die Carrier Plate und gewährleistet so den LIPODOT-Transfer.



**Abb.5.73: Einzelteile der pneumatischen Druckvorrichtung**

Die Halterungen des hydrostatischen Ansatzes wurden übernommen aber anstelle des hydrostatischen Kissens wurde eine Druckdose verwendet. Diese enthält eine elastische Membran. Nach Verschrauben der Druckdose mit der Halterung der Assay Plate wird mit zu 4 bar Druckluft der LIPODOT-Transfer durchgeführt.

Die 4 Schnellspannschrauben, die die Druckdose auf der Assay Plate Halterung fixierten, erlauben ein schnelles Austauschen der Assay Plates. Dieser Prototyp des Transferapparates besticht so durch seine technische Einfachheit und den geringen Platzbedarf, der schnellen Regulierung des Drucks, dem Fehlen von beweglichen Teilen, die ein Verrutschen der Assay Plate gegenüber der Carrier Plate bewirken können, und der einfachen Handhabung was den Austausch von Carrier Plate oder Assay Plate angeht.

Für die Belichtungs- und Befeuchtungsschritte kann die Carrier Plate entnommen werden und getrennt von der Assay Plate belichtet werden.

Die pneumatische Apparatur zeigte eine hohe Homogenität des LIPODOT-Transfers über die gesamte Assay Plate hinweg. Für alle weiteren LIPODOT-Transfers, insbesondere dem Transfer der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektionen, wurde deshalb diese Apparatur verwendet.

### **5.1.8 Allokation**

Eine mathematische Allokation ist eine ein-eindeutige Zuordnung von Raumpunkten zweier Koordinatensysteme zueinander. So wird beispielsweise ein Original mit seinem Abbild über eine Allokation verknüpft.

Besitzt man nun die Koordinaten eines LIPODOTs auf einer Assay Plate, so benötigt man eine Allokation, um sie dem erzeugenden Bead auf der Carrier Plate zuzuordnen. Diese Identifizierung ist eine wichtige Voraussetzung, um später das entsprechende Bead isolieren und analysieren zu können.

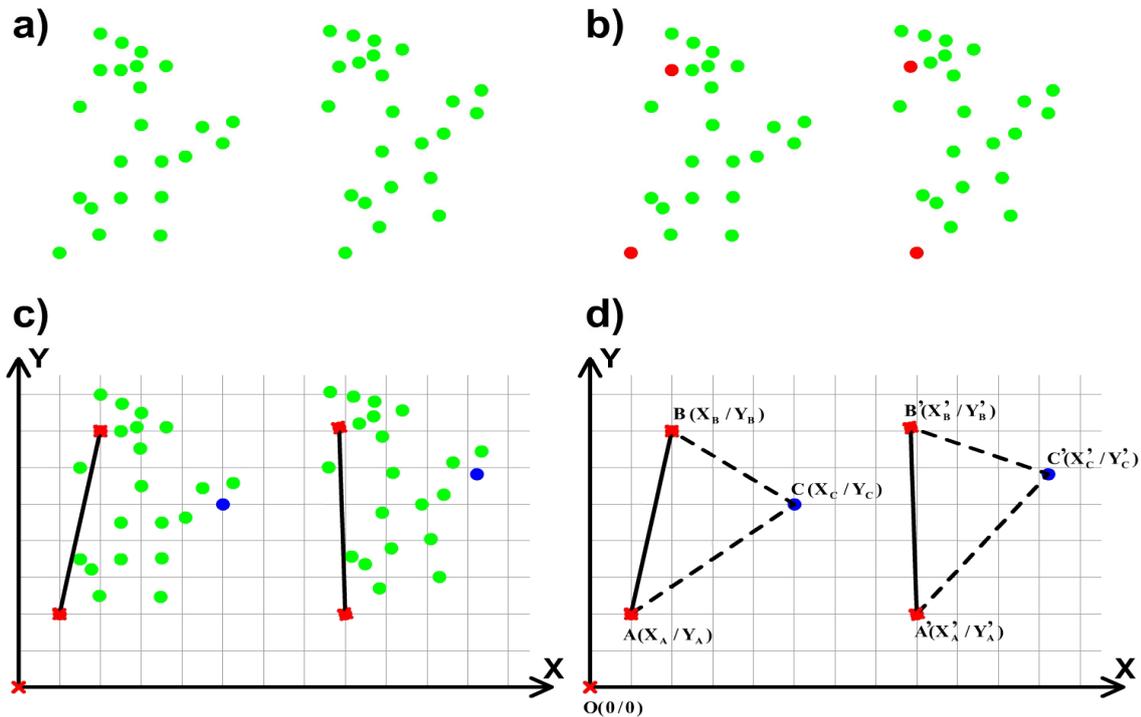
#### **5.1.8.1 Grundidee der Allokation**

Für die Allokation benötigt man ein Ursprungskoordinatensystem, das in irgendeiner Art und Weise auf ein Abbildungskoordinatensystem projiziert wird.

Diese mathematische Problemstellung wurde schon zu Beginn des 19. Jahrhunderts im Zusammenhang mit der Herstellung von Karten detailliert bearbeitet und von Riemann 1854 abschließend in seiner „Theorie über Mannigfaltigkeit“ behandelt <sup>[355]</sup>.

Entsprechend der Grundvoraussetzungen dieser Theorie erfüllt der LIPODOT-Transfer von der Carrier Plate zur Assay Plate alle Anforderungen für eine Allokation mit identischer Raumkrümmung. Daher benötigt man nur jeweils einen

Koordinatenursprung pro Plate und 2 Punkte, die zueinander zugeordnet werden (Abb.5.74), um eine mathematische Vorschrift für alle LIPODOTs zu erstellen.



**Abb.5.74: Erstellen einer Allokation**

Ein Muster (Mannigfaltigkeit) aus Punkten wird ein weiteres Mal abgebildet (a). Zuerst wird ein Koordinatensystem festgelegt (b) und es werden 2 Punktpaare (rot) erstellt, die sich einander entsprechen (c). Aus den Koordinaten der Ursprünge und den zugeordneten Punktpaaren A und B lassen sich beliebige weitere Punktpaare C (blau) zueinander zuordnen (d).

Wird für jedes Koordinatensystem der Ursprung als (0/0) definiert und besitzt man auf der Carrier Plate die Koordinaten der Punkte  $A(x_A/y_A)$  und  $B(x_B/y_B)$ , sowie die entsprechenden Koordinaten der zugeordneten Punkte  $A'(x'_A/y'_A)$  und  $B'(x'_B/y'_B)$  der Assay Plate, so kann zu jedem beliebigen Punkt  $C(x_C/y_C)$  der zugeordnete Punkt  $C'(x'_C/y'_C)$  entsprechend berechnet werden.

$$X'_C = \frac{(X_C - X_A)(X_B - X_A) + (Y_C - Y_A)(Y_B - Y_A)}{(X_B - X_A)^2 + (Y_B - Y_A)^2} \cdot (X'_B - X'_A) + \frac{(X_C - X_A)(Y_B - Y_A) - (Y_C - Y_A)(X_B - X_A)}{(X_B - X_A)^2 + (Y_B - Y_A)^2} \cdot (Y'_B - Y'_A) + X'_A$$

$$Y'_C = \frac{(X_C - X_A)(X_B - X_A) + (Y_C - Y_A)(Y_B - Y_A)}{(X_B - X_A)^2 + (Y_B - Y_A)^2} \cdot (Y'_B - Y'_A) - \frac{(X_C - X_A)(Y_B - Y_A) - (Y_C - Y_A)(X_B - X_A)}{(X_B - X_A)^2 + (Y_B - Y_A)^2} \cdot (X'_B - X'_A) + Y'_A$$

Weiterhin können der Drehwinkel  $\alpha$  und Verzerrungen  $\kappa$  zwischen den Koordinatensystemen berechnet werden.

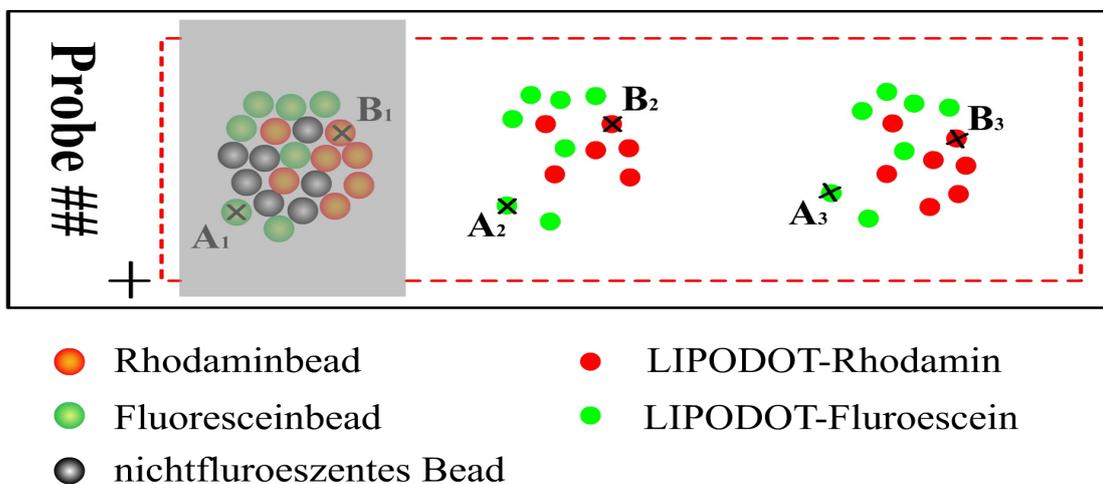
$$\cos \alpha = \sqrt{\frac{(X_B - X_A) \cdot (X'_B - X'_A) + (Y_B - Y_A) \cdot (Y'_B - Y'_A)}{[(X_B - X_A)^2 + (Y_B - Y_A)^2] \cdot [(X'_B - X'_A)^2 + (Y'_B - Y'_A)^2]}}$$

$$\kappa = \frac{\sqrt{(X'_B - X'_A)^2 + (Y'_B - Y'_A)^2}}{\sqrt{(X_B - X_A)^2 + (Y_B - Y_A)^2}}$$

Idealerweise sollte  $\alpha$  möglichst null sein und  $\kappa$  den Wert 1 annehmen.

### 5.1.8.2 Allokation für LIPODOT-Arrays

Um ein ortsfestes Koordinatensystem zu erzeugen, wurde auf jeder planaren Oberfläche mit einem Diamantstift ein Kreuz eingeritzt. Das Zentrum dieses Kreuzes ist per Definition der Koordinatenursprung (Abb.5.75).



**Abb.5.75: Festlegung des Koordinatensystems**

Auf jedem planaren Träger markiert ein Kreuz den Koordinatenursprung (0/0). Aus einem Muster aus fluoreszenten Beads und entsprechenden LIPODOTs werden je zwei signifikante Punkte herausgesucht und auf allen Assay Plates und der Carrier Plate einander zugeordnet.

Weiterhin wurden aus signifikanten Mustern der Carrier Plate zwei Koordinaten ausgewählt und entsprechende Koordinaten aus den Mustern der Assay Plate(s) bestimmt. Als besonders signifikante Strukturen gilt stets der Rand eines Musters, da das menschliche Auge Konturen besser wahrnehmen kann als ein komplettes Muster. Die so erhaltenen Daten erlauben eine Allokation jedes einzelnen LIPODOTs und jedes einzelnen Beads.

Für Carrier Plates der ersten Generation wurden auf einer Assay Plate mehrfach LIPODOT-Transfers vorgenommen (entsprechend Abb.5.75) und die Carrier Plate anschließend auf den unteren Rand der Assay Plate geklebt.

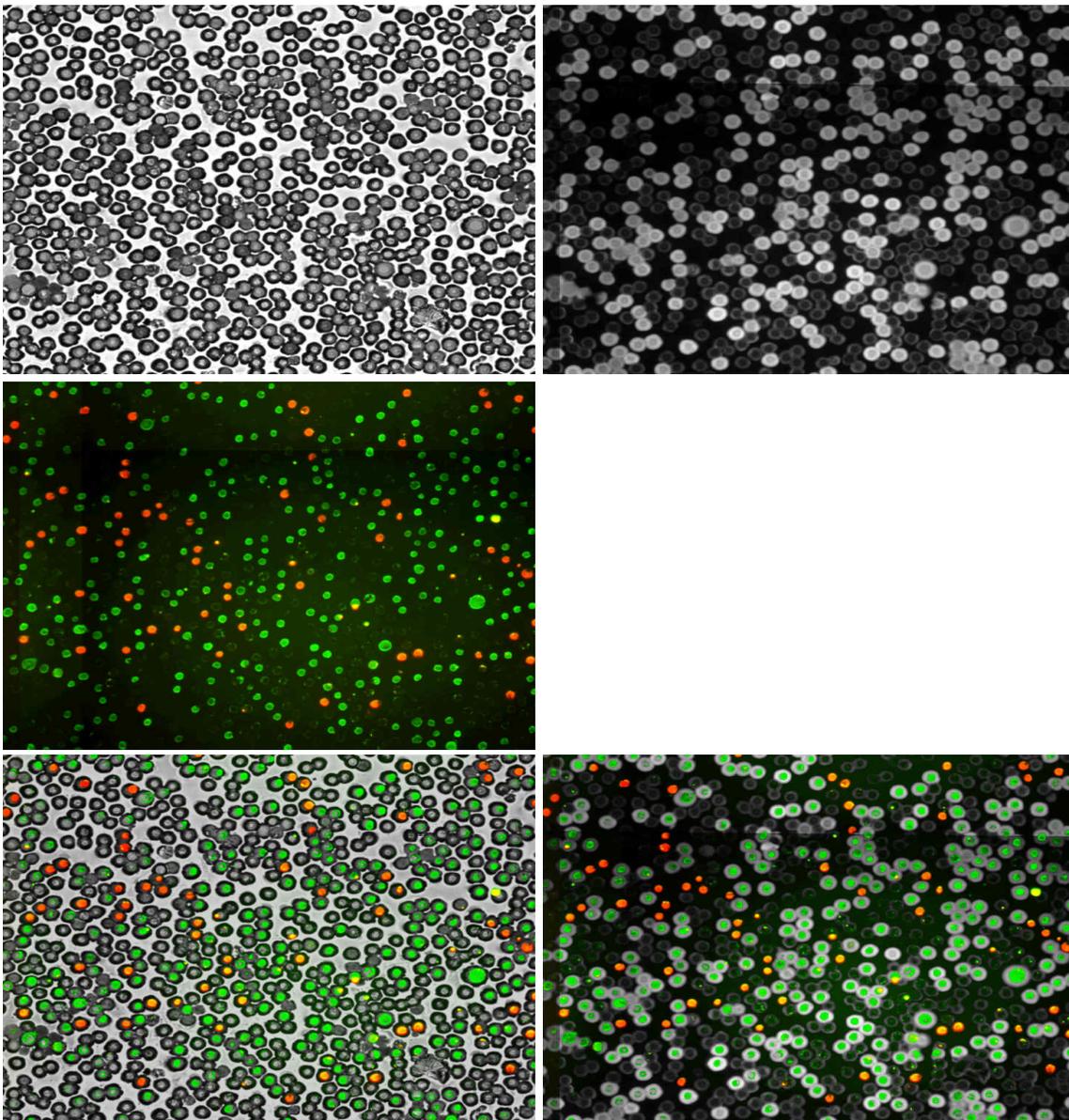
Für spätere Generationen an Carrier Plates wurde aufgrund der Größe der Carrier Plate pro Assay Plate ein LIPODOT-Transfer vorgenommen und dann pro Assay Plate je zwei Koordinaten bestimmt.

### 5.1.8.3 Allokation einer Beispielprobe

Entsprechend Abb.5.75 wurde eine Carrier Plate mit LIPODOT-Rhodamin, LIPODOT-Fluorescein und LIPODOT-Ankerverbindung hergestellt und zwei Mal auf eine Assay Plate transferiert. Danach wurde die Carrier Plate auf die Assay Plate aufgeklebt und die Stützkoordinaten für die Allokation bestimmt.

Die zugeordneten Koordinaten ergaben

A <sub>1</sub> (11095/11475)	A <sub>2</sub> (29737/9872)	A <sub>3</sub> (51591/11812)
B <sub>1</sub> (8476/11442)	B <sub>2</sub> (27100/9872)	B <sub>3</sub> (49021/11785)

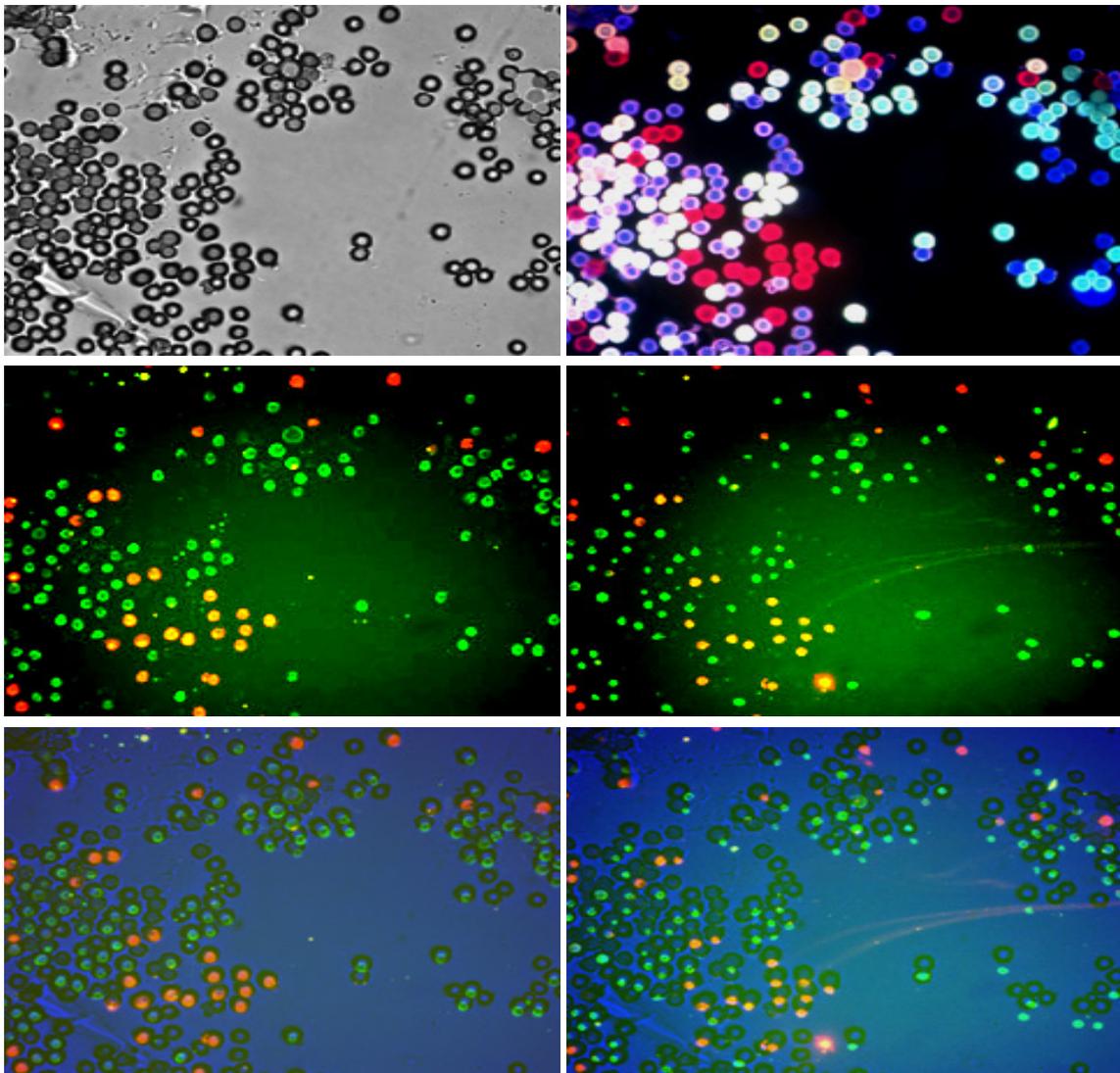


**Abb.5.76: Allokation zwischen Carrier Plate und Assay Plate**

Eine Durchlichtaufnahme (links oben) und eine Fluoresceinaufnahme (rechts oben) der Carrier Plate wurden mit der Fluoreszenzaufnahme (links mitte) der allokierten Assay Plate überlagert. Man sieht sowohl im Überlagerungsmuster (links unten) als auch in der Fluoreszenzüberlagerung (rechts unten), dass eine sehr gute Übereinstimmung vorliegt. Jeder LIPODOT kann eindeutig seinem erzeugenden Bead zugeordnet werden.

Es zeigte sich schnell, dass nach einmalig erfolgter Bestimmung der Allokationskoordinaten jeder LIPODOT seinem erzeugenden Bead zugeordnet werden konnte und sofort die Übereinstimmung zwischen Carrier Plate und Assay Plate erkennbar ist (Abb.5.76).

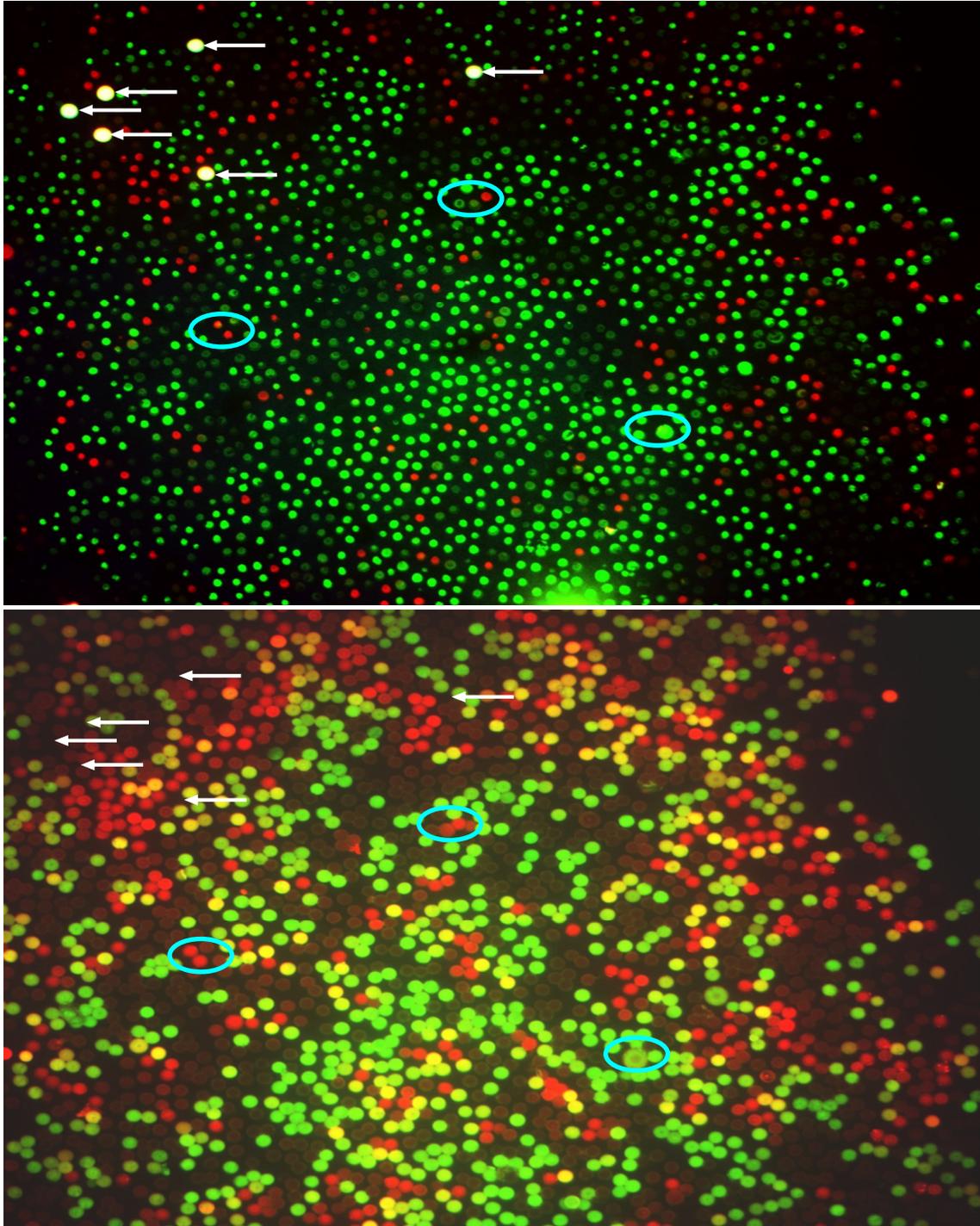
Die berechnete Allokation bezieht sich stets auf den Bead links unten in einem Bild. Um das Potential der Allokation zu zeigen, wurde eine zufällige Koordinate der Carrier Plate ausgewählt, die entsprechenden Koordinaten der beiden Assay Plates errechnet und automatisiert aufgenommen. Die direkte Überlagerung (Abb.5.77) der Originalbilder zeigte schon sehr deutlich, dass es sich um dieselbe Stelle handelt.



**Abb.5.77: Allokation zwischen Carrier Plate und zwei Assay Plates**

Von einer zufällig gewählten Stelle der Carrier Plate wurde ein Durchlichtbild (links oben) und Fluoreszenzbild (rechts oben) aufgenommen. Danach wurden die entsprechenden Koordinaten der beiden Assay Plates berechnet und automatisch aufgenommen. (jeweils mitte). Die Allokation ist stets auf die linke untere Ecke optimiert. Dies ist in der Überlagerung (jeweils unten) sehr deutlich sichtbar. Die rechte Assay Plate ist leicht im Uhrzeigersinn verdreht.

Es konnte also klar gezeigt werden, dass eine Allokation eine Zuordnung jedes einzelnen LIPODOTs zulässt. Weiterhin konnte eine Allokation nach mehrfachen Übertragungen trotz fluoreszenter Kreuzkontamination der Beads oder Verlust einzelner Beads beim LIPODOT-Transfer durchgeführt werden (Abb.5.78).



**Abb.5.78: Allokation zwischen Carrier Plate und Assay Plate**

Die abgebildete Assay Plate (a) war die 6. Kopie der Carrier Plate (b). Einige Beads blieben während des Transfers auf der Assay Plate haften und fehlen daher auf der Carrier Plate (weiße Pfeile). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden 48 Stunden nach dem LIPODOT-Transfer durchgeführt, was die starke Kreuzkontamination (Gelbfärbung) der Beads erklärt. Zum Auffinden des Musters wurden signifikante Stellen markiert (blaue Kreise).

### 5.1.9 Erster Bindungsassay mit Streptavidin

Der erste Bindungsassay wurde mit einer Carrier Plate aus 100% LIPODOT-Biotin Beads durchgeführt. Mit dem LIPODOT-Biotin wurde ein klassischer Bindungsassay unter der Verwendung eines Streptavidin Alexa 633 durchgeführt. Es wurde je 1 h mit BSA geblockt und dann mit dem Streptavidin Alexa 633 detektiert. Der erste Blick ins Fluoreszenzmikroskop (Abb.5.79) zeigte keinerlei spezifische Fluoreszenz in Form von LIPODOTs.

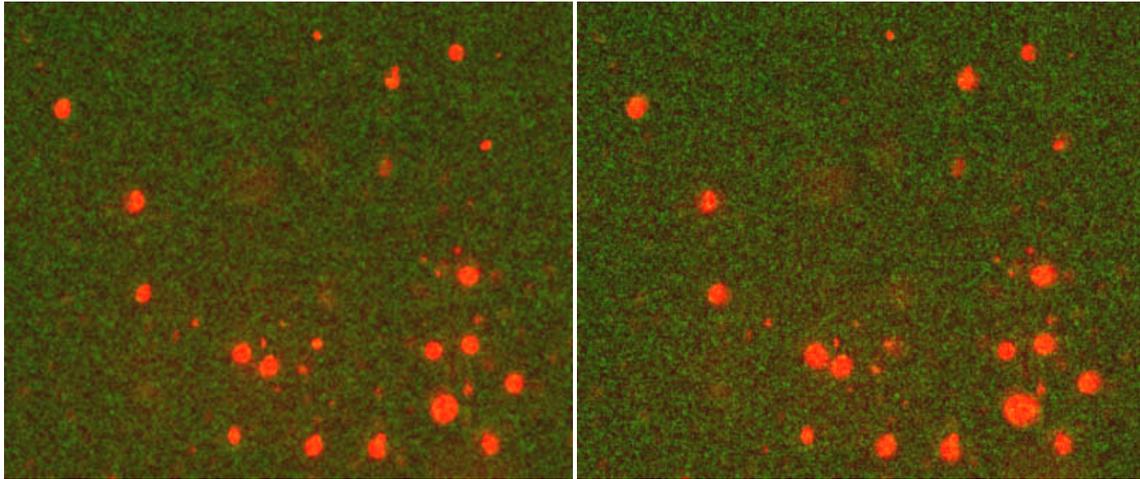


**Abb.5.79: SMA aus LIPODOT-Biotin gefärbt mit Streptavidin Alexa 633**

Nach dem Blocken (links) zeigt die Assay Plate stellenweise leichte unspezifische Fluoreszenz. Nach Inkubation (rechts) mit Streptavidin Alexa 633 zeigte sich der Hintergrund etwas stärker, aber keine LIPODOTs.

Daher wurde nochmals eine Carrier Plate hergestellt, die nun allerdings 5% LIPODOT-Rhodamin Beads enthielt. Zudem wurde zur Detektion Streptavidin Alexa 488 verwendet. Hierdurch sollte schon direkt nach dem LIPODOT-Transfer und dem Blocken ein LIPODOT-Rhodamin Muster auf der Assay Plate sichtbar sein und bei Anbindung des Streptavidins eine grüne Fluoreszenz erzeugt werden, die sich deutlich vom Rhodaminmuster abheben würde.

Die Fluoreszenz des LIPODOT-Rhodamins konnte sofort nach dem LIPODOT-Transfer und auch nach dem Blocken nachgewiesen werden (Abb.5.80 links), allerdings konnte keinerlei Anbindung des Streptavidins nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine zusätzliche Fluoreszenz (Abb.5.80 rechts) und damit keine Anbindung von Streptavidin.



**Abb.5.80: SMA aus LIPODOT-Rhodamin/LIPODOT-Biotin gefärbt mit Alexa 488 gelabeltem Streptavidin**

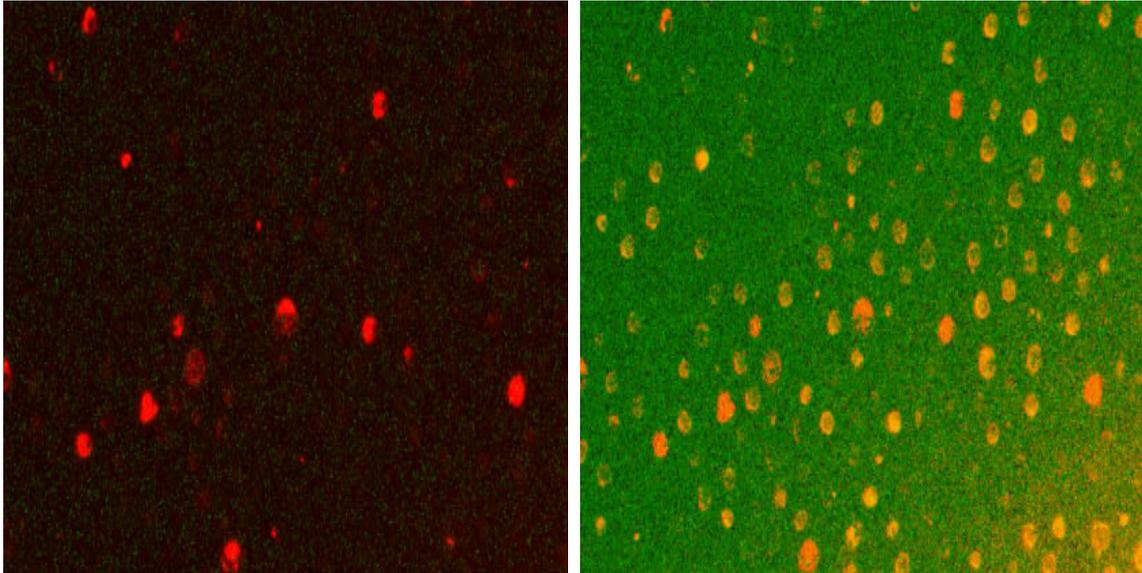
Vor dem Blocken (links) zeigte die Assay Plate ein deutliches Muster aus LIPODOT-Rhodamin (rot). Nach dem Blocken und der Inkubation mit Streptavidin Alexa 488 (rechts) war dieses Muster immer noch sichtbar. Allerdings zeigte sich keine Spur von angebundenem Streptavidin (grün).

Zu diesem Zeitpunkt war nicht erklärbar, warum keine Interaktion detektiert werden konnte, da die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin eine der höchsten Bindungskonstanten besitzt und selbst im pikomolaren Bereich noch nachweisbar sein sollte.

Allerdings wurde berichtet, dass Streptavidin unter bestimmten Bedingungen nicht an Biotin bindet <sup>[356;357]</sup>. Falls das Biotin zu nahe an der Oberfläche sitzt, kann das Streptavidin dieses nicht mehr „greifen“ und so kann keine Bindung etabliert werden. Dieser sterischen Hinderung wurde durch Verwendung von unterschiedlich langen Spacern vorgebeugt. Hierdurch hätte zumindest bei dem LIPODOT-Biotin mit dem längsten Spacer eine Bindung stattfinden müssen.

Eine ausgiebige Literatursuche zeigte, dass im Falle einer hochdichten Biotinbeschichtung ebenfalls keine Bindung stattfinden kann <sup>[356]</sup> und dass alle verwendeten Spacer eine ausreichende Länge besaßen, um eine Bindung zu etablieren.

Daher wurden eine weitere Carrier Plate mit LIPODOT-Biotin Beads hergestellt. Diese wurde allerdings direkt vor dem LIPODOT-Transfer mit einer wässrigen Lösung von 0,5 mg/ml LIPODOT-Ankerverbindung inkubiert. Hierdurch wurde beim folgenden LIPODOT-Transfer nicht nur das LIPODOT-Biotin, sondern auch die LIPODOT-Ankerverbindung auf den LIPODOT übertragen. Die hierdurch entstehende Verdünnung des LIPODOT-Biotins auf der Oberfläche ermöglichte eine Anbindung des Streptavidins (Abb.5.81).



**Abb.5.81: SMA aus LIPODOT-Rhodamin/LIPODOT-Biotin gefärbt mit Alexa 488 gelabeltem Streptavidin**

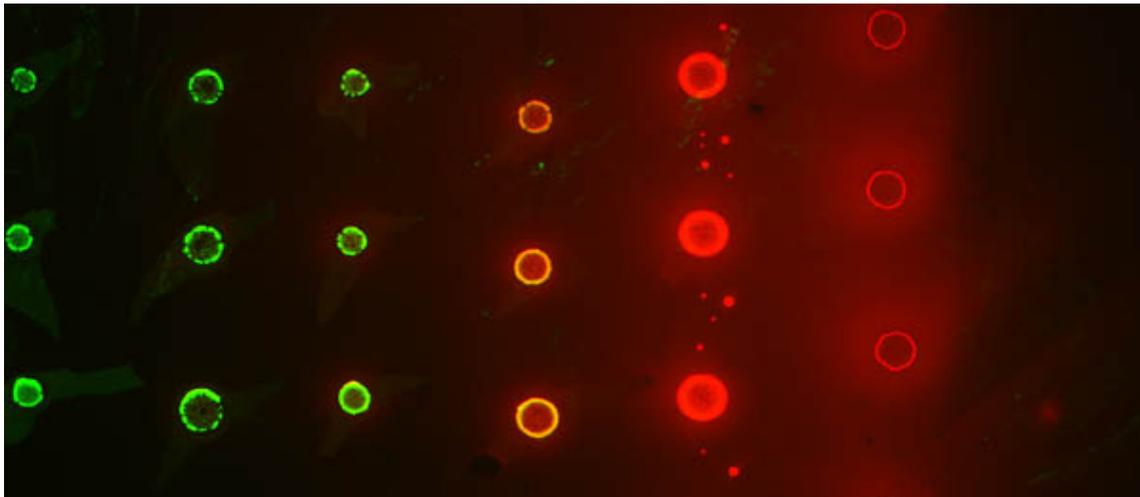
Vor dem LIPODOT-Transfer wurde die Carrier Plate mit LIPODOT-Ankerverbindung inkubiert, um so eine Verdünnung des LIPODOT-Biotins zu erreichen. Vor dem Blocken (links) zeigte die Assay Plate ein deutliches Muster aus LIPODOT-Rhodamin (rot). Nach dem Blocken und der Inkubation mit Streptavidin Alexa 488 (rechts) war dieses Muster immer noch sichtbar. Nun zeigten sich LIPODOTs mit angebundenerem Streptavidin (orange), jedoch nicht in dem erwarteten Grünton sondern als Fluoreszenz, die in beiden Farbkanälen sichtbar war.

Die Fluoreszenz im Alexa 488 Kanal war sehr schwach und im Rhodaminkanal zeigte sich ein deutliches Signal. Diese Farbverschiebung kann einerseits durch eine Wechselwirkung des Fluorophors mit der extrem hydrophoben Oberfläche entstehen oder durch eine gegenseitige Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren generiert werden.

Daher wurde ein Mikroarray (4.2.4) aus LIPODOT-Biotin und LIPODOT-Ankerverbindung erzeugt. Hierfür wurde eine reine LIPODOT-Biotin Lösung mehrfach 1 zu 3 verdünnt und so Verdünnungen bis 1 zu 729 erzeugt.

Das Mikroarray wurde danach entsprechend der zuvor durchgeführten Bindungsassays geblockt und mit Streptavidin Alexa 488 inkubiert (Abb.5.82). Es zeigte sich, dass die Oberfläche nicht den Fluorophor beeinflusste, sondern die Dichte des LIPODOT-Biotins ausschlaggebend war. Je dichter das Streptavidin Alexa 488 war, umso mehr war die erzeugte Fluoreszenz rotverschoben. Bei 100% LIPODOT-Biotin war mit dem zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmikroskop keinerlei Fluoreszenz mehr nachweisbar.

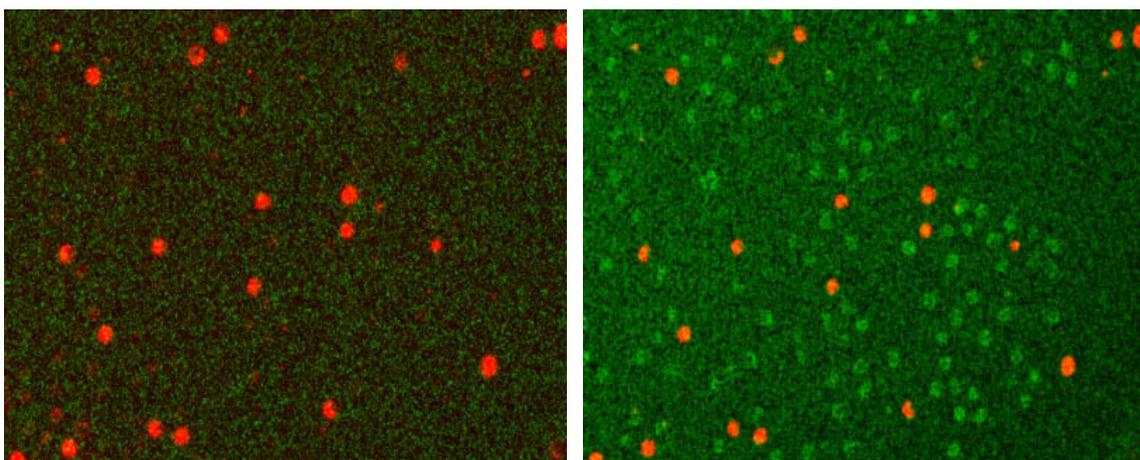
Bei Verdünnungen von 1 zu 81 und höher zeigte sich die erwartete Fluoreszenz des Alexa 488.



**Abb.5.82: Mikroarray einer Verdünnungsreihe LIPODOT-Biotin/LIPODOT-Ankerverbindung gefärbt mit Alexa 488 gelabeltem Streptavidin**

Auf der hydrophoben Oberfläche wurde LIPODOT-Biotin mit LIPODOT-Grundkomponente verdünnt (7 Spalten, von links nach rechts 0,14%; 0,41%; 1,23%; 3,7%; 11,1%; 33,3% und 100%). Es wurde mit Streptavidin-Alexa 488 detektiert. Mit zunehmender LIPODOT-Biotinmenge erfährt der Fluorophor eine Rotverschiebung, so dass die 100% Konzentration nicht mehr detektierbar war.

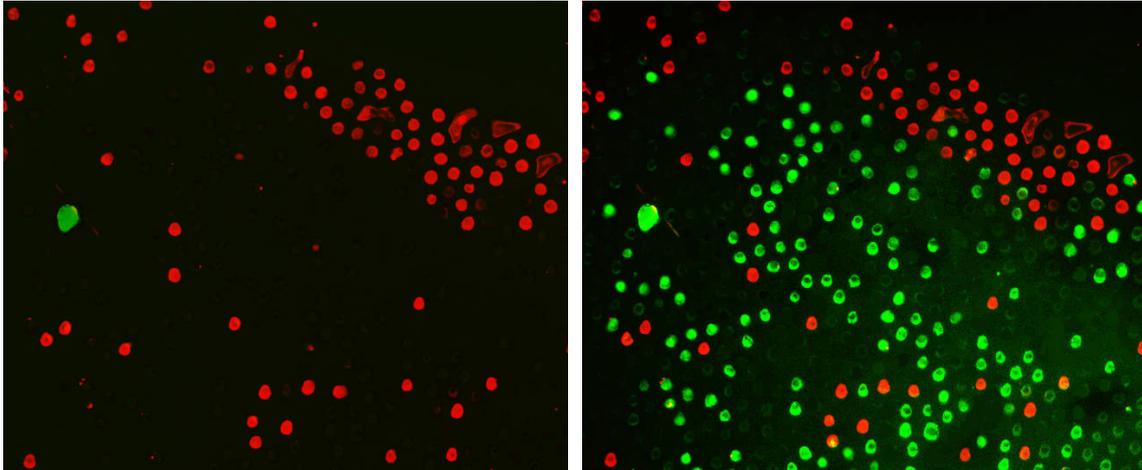
Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde ein weiterer LIPODOT-Transfer mit einer Carrier Plate aus LIPODOT-Biotin durchgeführt. Direkt vor dem LIPODOT-Transfer wurde die Carrier Plate mit einer gesättigten wässrigen Lösung aus LIPODOT-Ankerverbindung inkubiert, um so eine möglichst starke Verdünnung des LIPODOT-Biotins zu erreichen. Danach wurde ein Bindungsassay durchgeführt (Abb.5.83), der eine deutliche Bindung des Streptavidin an das LIPODOT-Biotin zeigte.



**Abb.5.83: SMA aus LIPODOT-Rhodamin/LIPODOT-Biotin gefärbt mit Alexa 488 gelabeltem Streptavidin**

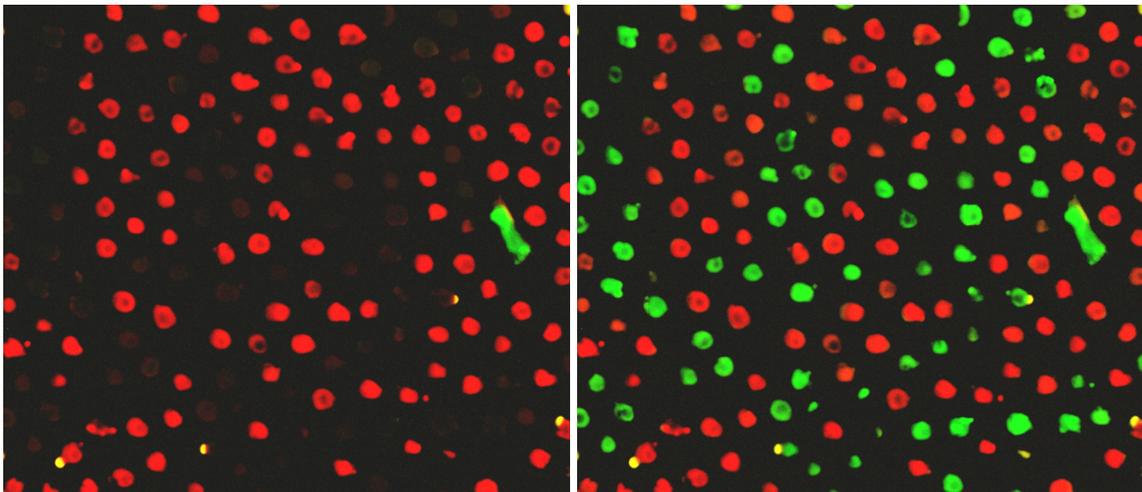
Vor dem LIPODOT-Transfer wurde die Carrier Plate mit der LIPODOT-Ankerverbindung inkubiert, um so eine Verdünnung des LIPODOT-Biotins zu erreichen. Vor dem Blocken (links) zeigte die Assay Plate ein deutliches Muster aus LIPODOT-Rhodamin (rot). Nach dem Blocken und der Inkubation mit Streptavidin Alexa 488 (rechts) war dieses Muster noch sichtbar. Es zeigte sich das erwartete Bindungsmuster (grün).

Wurden anstelle des Alexa 488 gelabelten Streptavidins fluoreszente Antibiotin-Antikörper (Abb.5.85) oder Streptavidin mit anderen Fluorophoren verwendet, so konnte keinerlei Farbverschiebung des Fluorophors festgestellt werden. Spätere Optimierung des Block-Protokolls, die Vorinkubation der Carrier Plate mit der LIPODOT-Ankerverbindung und die Verwendung von Fluorescein gelabeltem Streptavidin verbesserten die Bindungsassays (Abb.5.84) deutlich.



**Abb.5.84: SMA aus LIPODOT-Rhodamin/LIPODOT-Biotin gefärbt mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin**

Vor dem Blocken (links) waren das LIPODOT-Rhodamin (rot) und eine Kontamination (grün) deutlich zu sehen. Nach dem Blocken mit BSA und der Inkubation mit Streptavidin Fluorescein (rechts) zeigte sich das LIPODOT-Biotin mit sehr gutem Kontrast (grüne LIPODOTs).



**Abb.5.85: SMA aus LIPODOT-Rhodamin/LIPODOT-Biotin gefärbt mit Fluorescein gelabeltem Antibiotin Antikörper**

Vor dem Blocken (links) war das LIPODOT-Rhodamin (rot) und eine Kontamination (grün) deutlich zu sehen. Nach dem Blocken mit BSA und der Inkubation mit dem Antikörper (rechts) zeigte sich das LIPODOT-Biotin mit sehr gutem Kontrast (grüne LIPODOTs).

Es zeigte sich, dass die LIPODOTs über eine „zu hohe“ Dichte an Biotin verfügten, so dass keine Bindung des Streptavidins stattfand. Erst durch ein entsprechendes

„Ausdünnen“ mit der LIPODOT-Ankerverbindung war eine deutliche Bindung mit Streptavidin detektierbar und der Bindungsassay so erfolgreich beendet.

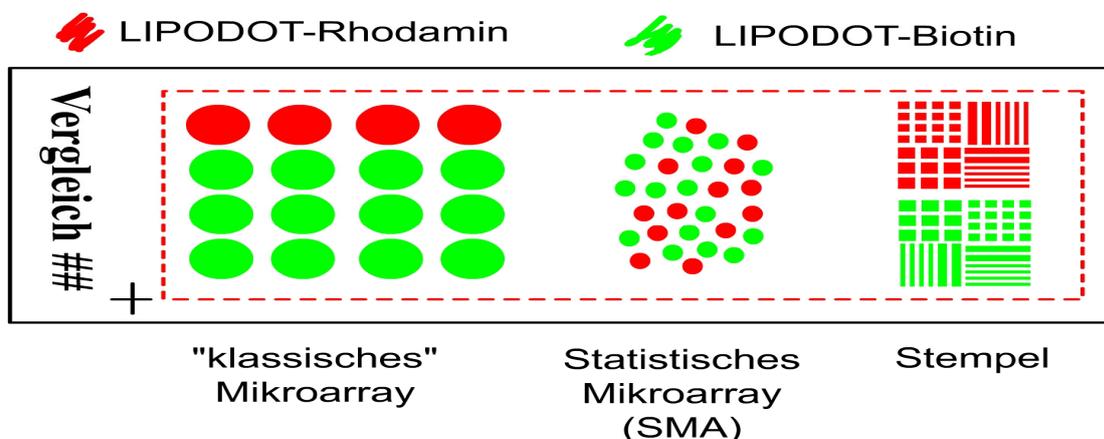
### 5.1.10 Vergleich von SMA, Softlithographisches Printing und Mikroarrays

Der LIPODOT-Transfer stellte eine neue Technik dar. Es war auch noch nicht geklärt, ob damit eine Monolayer erzeugt wurde und ob es generelle Unterschiede zu bereits etablierten Techniken wie Softlithographisches Printings und herkömmlichen Mikroarrays gab. Deshalb wurden die LIPODOT-Verbindungen von den Beads für den LIPODOT-Transfer abgespalten, aufgereinigt und mit diesen Techniken immobilisiert.

Mit keiner der Techniken ließen sich LIPODOT-Verbindungen auf unbehandeltem Glas immobilisieren. Auf hydrophoben Oberflächen mit Kontaktwinkeln höher als  $110^\circ$  konnte stets immobilisiert werden.

Daher wurde auf ein und demselben Träger (Vergleichsträger) zuerst ein Mikroarray durch einen Nanopipettier-Roboter erzeugt. Dann wurde ein Statistisches Mikroarray mittels LIPODOT-Transfer generiert und schließlich mit einem softlithographischen PDMS-Stempel eine mikroarrayähnliche Struktur mit denselben LIPODOT-Verbindungen erzeugt (Abb.5.86).

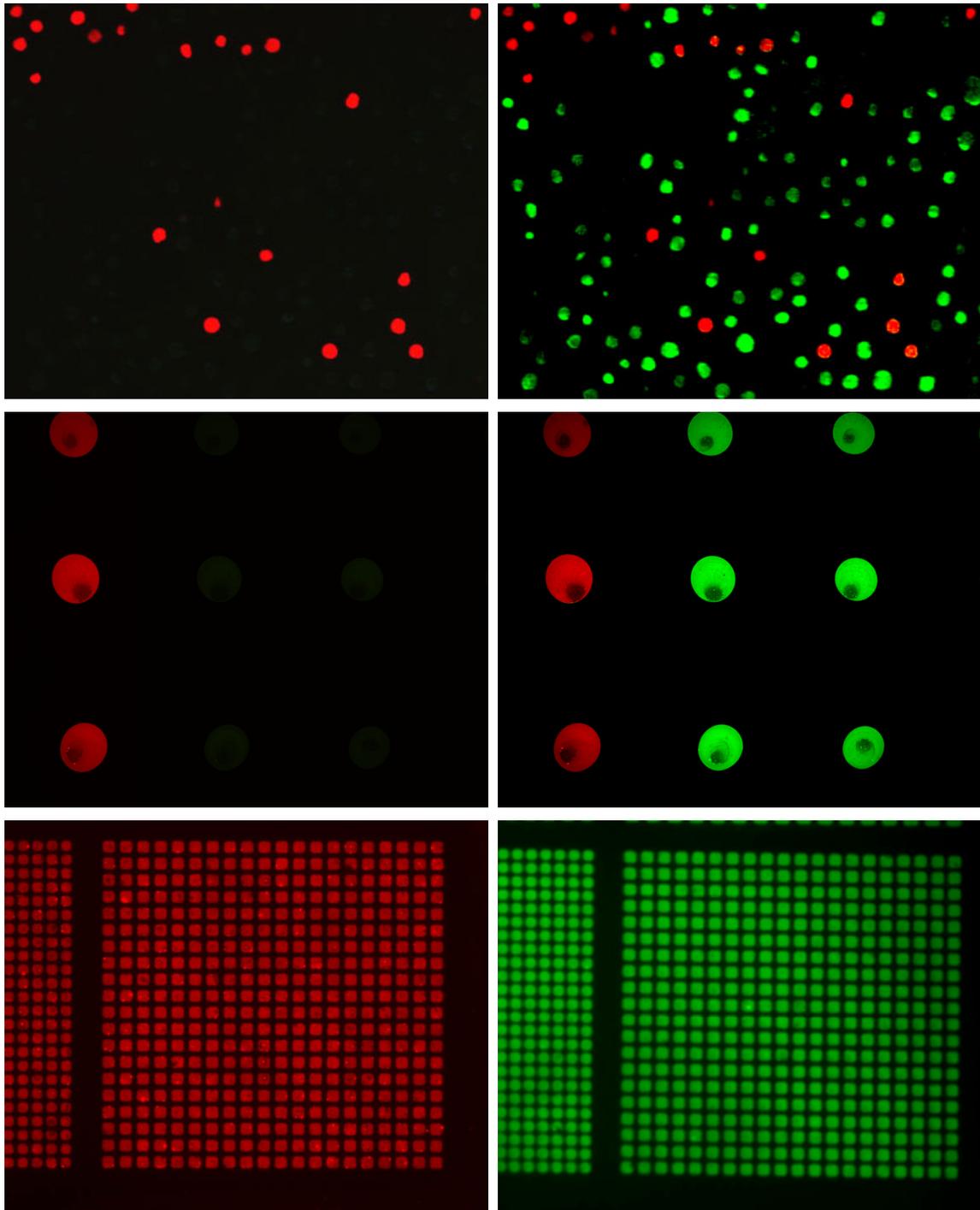
Es wurden LIPODOT-Rhodamin und LIPODOT-Biotin verwendet. Das LIPODOT-Biotin wurde, entsprechend der Ergebnisse von 5.1.9 im Verhältnis 1 zu 10 mit LIPODOT-Ankerverbindung verdünnt.



**Abb.5.86: Aufbau eines Vergleichsträgers**

LIPODOT-Rhodamin und LIPODOT-Biotin (1:10 mit LIPODOT-Ankerverbindung verdünnt) wurden als Mikroarray, SMA und als gestempelte Struktur auf dem Vergleichsträger aufgebracht.

Entsprechend Kapitel 5.1.6.3 wurden die Konzentrationen und Volumina des Nanopipettier-Roboters so eingestellt, dass kein Ausbluten der erzeugten Spots stattfand. Mit einem der produzierten Vergleichsträger wurde ein Bindungsassay mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin durchgeführt (Abb.5.87).



**Abb.5.87: Bindungsassay auf einem Vergleichsträger**

Nach der Herstellung (links) wurde der Vergleichsträger mikroskopiert. Es ist jeweils nur das LIPODOT-Rhodamin zu sehen (rot). Erst nach dem Blocken und der Inkubation mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin (rechts) entstand die Färbung des LIPODOT-Biotins (grün). Man erkennt keine signifikanten Unterschiede zwischen SMA (oben), Mikroarray (mitte) und gestempelten Strukturen (unten). Für alle Bildaufnahmen wurden identische Aufnahmeparameter verwendet.

Es zeigte sich, dass es nahezu keinen Unterschied macht, ob die LIPODOT-Verbindungen mit einem Mikropipettier-Roboter, einem LIPODOT-Transfer oder einem Stempelprozess auf die hydrophobe Oberfläche übertragen wurden. Zudem war die erzielte Fluoreszenzintensität ungefähr gleich stark. Da der Stempelprozess per se eine Monolayer aus LIPODOT-Verbindungen erzeugt konnte hier auch kein „Ausbluten“ der erzeugten Strukturen beobachtet werden. Man kann also davon ausgehen, dass unabhängig von der Übertragungsmethode stets eine identische Monolayer aus LIPODOT-Verbindungen entsteht und diese im Bindungsassay ebenfalls unabhängig von der Übertragungsmethode ein identisches Ergebnis liefert.

### **5.1.11 Optimierung des Streptavidin-Bindungsassays**

Hydrophobe Oberflächen werden nicht für Bindungsassays eingesetzt (und sie sind daher kommerziell höchstens in Kleinserien erhältlich). Es gab also keine ausreichenden Erfahrungswerte über ein effizientes Blocken für entsprechende Bindungsassays.

#### **5.1.11.1 Mögliche Block-Lösungen**

Da nicht bekannt war, wie eine hydrophobe Oberfläche am besten für einen Immunoassay inertisiert (geblockt) werden konnte, wurden acht unterschiedliche Block-Lösungen untersucht.

##### BSA

Bovines Serum Albumin (BSA) ist der Standard für die Blockierung einer biomolekularen Reaktion an einer Oberfläche. Es ist das häufigste Protein in Milch und Blut und seine natürliche Funktion ist die Unterbindung von unspezifischen Interaktionen zwischen Proteinen. BSA erhöht die Löslichkeit nahezu jeglichen Proteins: Weiterhin neigt es dazu, sich an Oberflächen anzulagern. Für Proteine, die größer als 10 kD sind, wird allgemein angenommen, dass Serum Albumin das beste Block-Reagenz ist. Bovines Serum Albumin wird anderen Albuminen vorgezogen, da es in großen Mengen aus Kuhmilch gewonnen werden kann.

- Zur Herstellung einer BSA-Blocklösung wurden 4% BSA (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  gelöst.

#### TopBlock (Sigma)

TopBlock wird aus Bakterien gewonnen und besteht aus Peptiden, die teilweise von verschiedenen Albuminen abgeleitet sind. Daher verfügt es über ähnliche Eigenschaften wie BSA. Die kürzeren Peptidketten bedecken jedoch stärker und vor allem dichter Oberflächen, weshalb es vornehmlich zum Blocken in Gegenwart kleinerer Proteine eingesetzt wird.

- TopBlock wurde ebenfalls als 4% TopBlock (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  gelöst.

#### Blockpuffer (Roche Diagnostics)

Dieser Blockpuffer wird für DNA- und RNA-Arrays verwendet und enthält Maleinsäure und ein Proteingemisch, das kovalent auf eine Oberfläche bindet.

- Die gelieferte Stock-Lösung wurde 1 zu 10 verdünnt und verwendet.

#### BlockIt (ArrayIt)

Wurde für die Anwendung auf Protein-Mikroarrays entwickelt. Seine Zusammensetzung ist nicht bekannt.

- Die gelieferte Stock-Lösung wurde ebenfalls 1 zu 10 verdünnt.

#### Casein

Ebenso wie BSA ist Casein ein Hauptbestandteil von Milch und erhöht die Löslichkeit von kleinen Molekülen, Peptiden und Proteinen.

- Aufgrund schlechterer Löslichkeit wurde 2% Casein (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  gelöst.

#### Gelatine

Eine verdünnte Gelatine-Lösung wird bei Westernblots als Block-Reagenz verwendet.

- Hierfür wurden 0,5% Gelatine (w/v) mit 0,05% Tween (v/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  gelöst.

### Magermilchpulver

Dies ist im Prinzip eine Mischung aus BSA und Casein, die jedoch weitere Proteine und einen geringen Anteil Fette enthält.

- Wiederum wurden 4% Milchpulver (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{18\text{M}\Omega}$  gelöst.

### RPMI-Medium

Dieses Medium wird für das Zellwachstum eingesetzt. Durch Autoklavieren wird dieses Medium biologisch inaktiviert, ohne dass es seine Eigenschaft verliert, die Löslichkeit von Proteinen zu erhöhen. Es wird verwendet, um Glas- und Kunststoffoberflächen zu blocken.

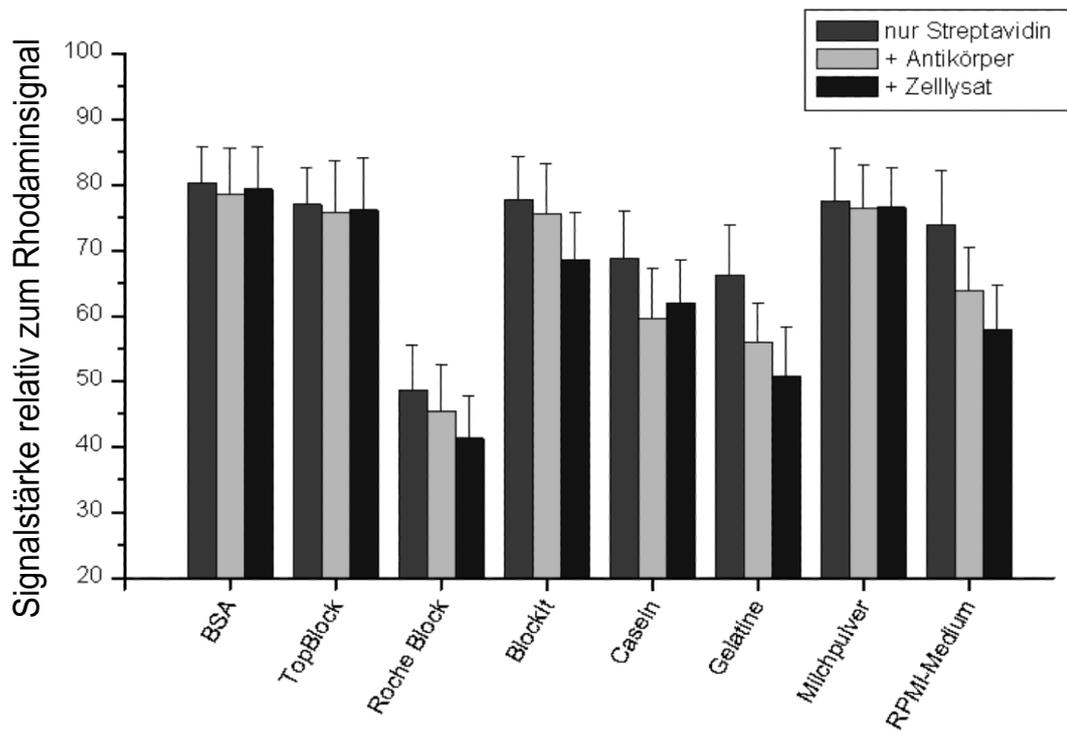
- Standard-RPMI-Medium wurde autoklaviert und direkt so verwendet.

## 5.1.11.2 Vergleich verschiedener Block-Reagenzien

Je drei Vergleichsträger (Herstellung in 5.1.10) wurde mit einem der acht Block-Reagenzien für 60 min geblockt. Um die Effizienz des Blockens zu überprüfen, wurden während des Bindungsschritts mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin unterschiedliche Bindungsumgebungen simuliert.

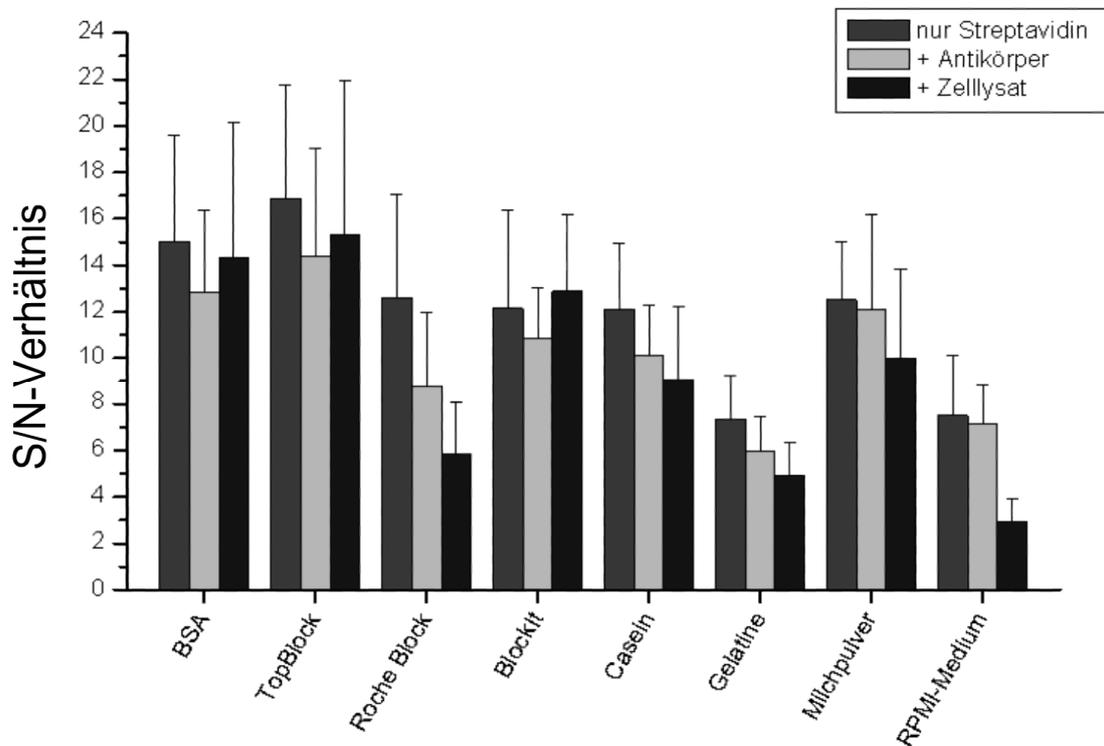
Ein Vergleichsträger wurde unverändert mit Block-Reagenz und Streptavidin behandelt. Beim zweiten Vergleichsträger wurde dem Streptavidin eine äquimolare Menge eines Fluorescein gelabelten Antimyc-Antikörpers zugefügt. Für den dritten Vergleichsträgers wurde dem Streptavidin zusätzlich zur äquimolaren Menge an Fluorescein gelabelten Antimyc-Antikörper noch Zelllysate hinzugefügt. Dieses Zelllysate enthielt überexprimiertes GFP. Nach dem Färbeschritt wurden die Träger gründlich gewaschen und vermessen.

Die jeweiligen Strukturen wurden, ebenso wie der Hintergrund, mit Metamorph (Visitron Systems) erfasst. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten der Bindung wurden einerseits auf die Fluoreszenzintensität des LIPODOT-Rhodamin „normiert“ (Abb.5.88), andererseits mit dem Hintergrund zu einem Kontrast (Abb.5.89) bzw. einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis S/N verrechnet (Abb.5.90).



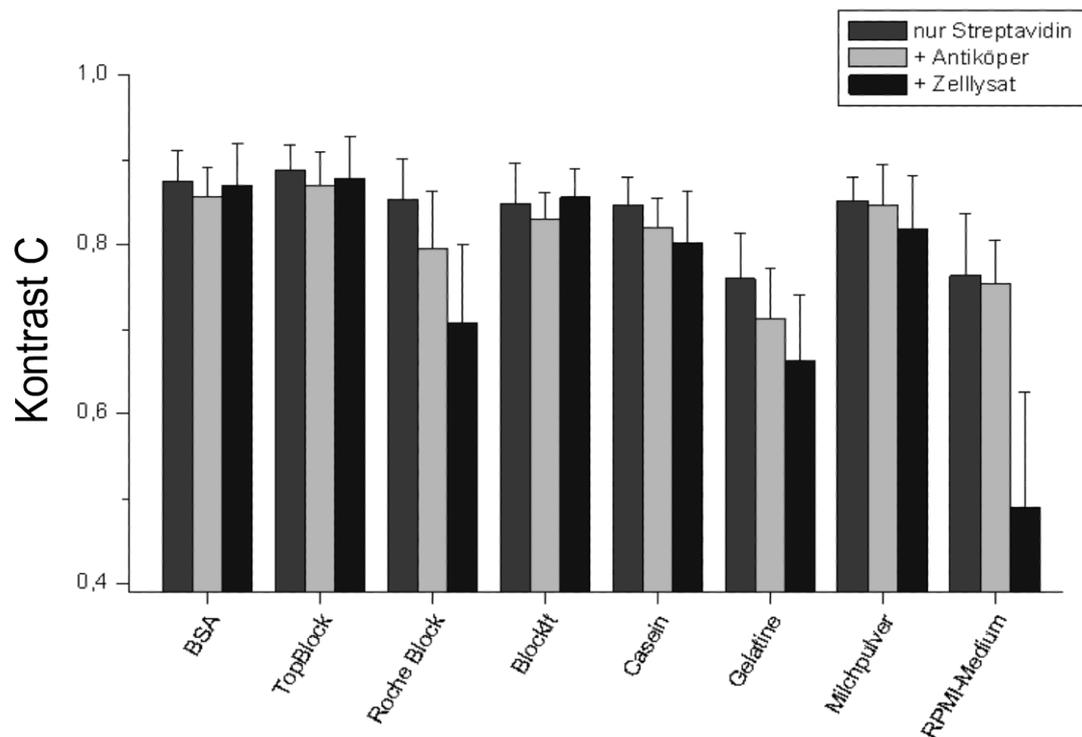
**Abb.5.88: Relative Signalstärke durch unterschiedliche Blockreagenzien**

Unter jeweils 3 Bedingungen während des Streptavidin-Bindungsschrittes wurden 8 Blockreagenzien auf Vergleichsträgern getestet. Das erzeugte fluoerente Bindungssignal wurde in Relation zur Intensität von LIPODOT-Rhodamin gesetzt.



**Abb.5.89: S/N-Verhältnis des Bindungssignals durch unterschiedliche Blockreagenzien**

Unter jeweils 3 Bedingungen während des Streptavidin-Bindungsschrittes wurden 8 Blockreagenzien auf Vergleichsträgern getestet. Das jeweilige Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde berechnet.



**Abb.5.90: S/N-Verhältnis des Bindungssignals durch unterschiedliche Blockreagenzien**

Unter jeweils 3 Bedingungen während des Streptavidin-Bindungsschrittes wurden 8 Blockreagenzien auf Vergleichsträgern getestet. Das jeweilige Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde berechnet.

Die Blocklösung von Roche zeigte einen guten Kontrast, erniedrigte allerdings die Signalintensität deutlich, was die Messzeiten entsprechend verlängerte.

Gelatine und RPMI-Medium führten zu einem extrem hohen Hintergrund, der sich bei Zugabe von Zellysat nochmals deutlich verstärkte.

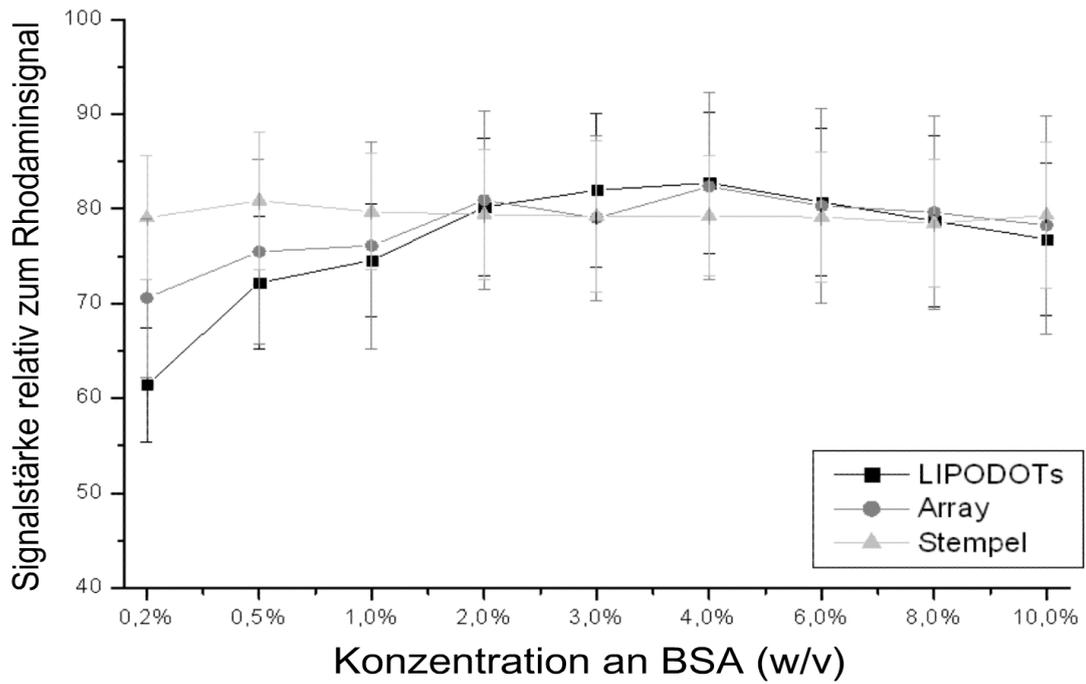
Die Blocklösung BlockIt von ArrayIt zeigte zwar einen guten Kontrast, aber die Signalintensität war etwas schwächer als bei BSA und TopBlock.

Letztendlich zeigten BSA und TopBlock die besten Ergebnisse und wurden daher auch genauer untersucht.

### 5.1.11.3 Optimierung der Konzentration der Blocklösung

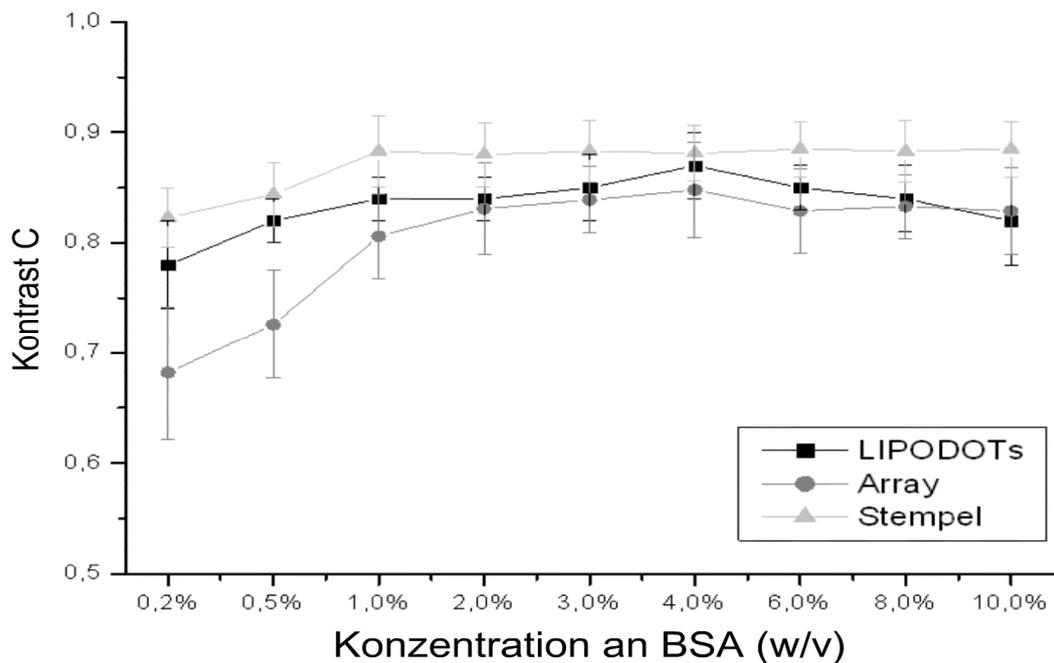
Sowohl von BSA als auch TopBlock wurden Blocklösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt und Vergleichsträger 60 min inkubiert. Danach wurde für 60 min mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin inkubiert, die Fluoreszenz mit Metamorph vermessen und konzentrationsabhängig ausgewertet (Abb.5.91 bis Abb.5.94).

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse für die Mikroarrays, die gestempelten Strukturen und SMA getrennt ausgewertet.



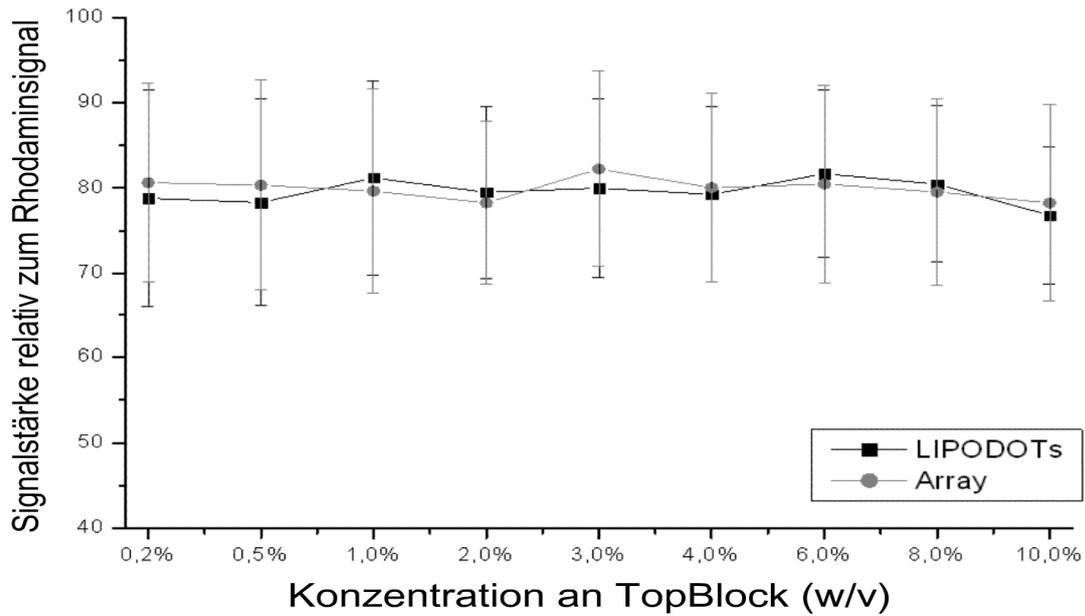
**Abb.5.91: Relative Signalstärke für verschiedene Konzentrationen an BSA**

Das erzeugte fluoreszente Bindungssignal wurde in Relation zur Intensität von LIPODOT-Rhodamin gesetzt. Gestempelte Strukturen erweisen sich hierbei als besonders reproduzierbar. 2% BSA waren ausreichend für ein gutes Signal.



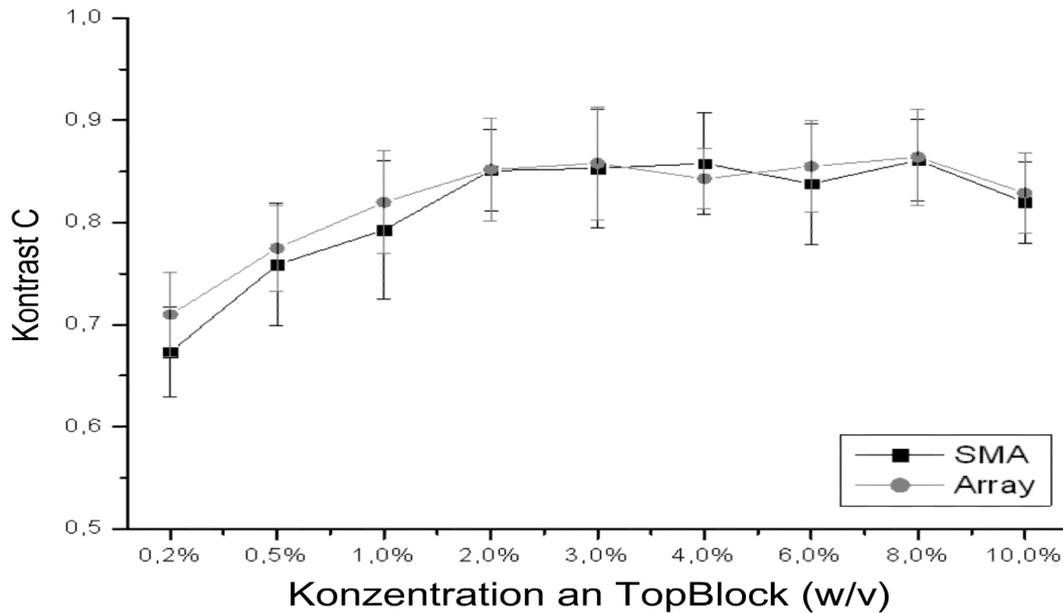
**Abb.5.92: Kontrast bei unterschiedlichen BSA Konzentrationen**

Da die Stempel nie ausbluteten erreichten sie stets einen hohen Kontrast. Bei den Mikroarrays und den LIPODOTs wurde der Kontrast durch das Ausbluten und den unspezifischen Hintergrund stärker beeinflusst. Ab einer BSA-Konzentration von 2% wurde ein Optimum an Kontrast erreicht.



**Abb.5.93: Relative Signalstärke für verschiedene Konzentrationen an TopBlock**

Das erzeugte fluoreszente Bindungssignal wurde in Relation zur Intensität von LIPODOT-Rhodamin gesetzt. Gestempelte Strukturen erweisen sich hierbei als besonders reproduzierbar. Schon 0,2% TopBlock erzeugen ein gutes Signal. Diese Serie der Vergleichsträger enthielt keine Stempel!



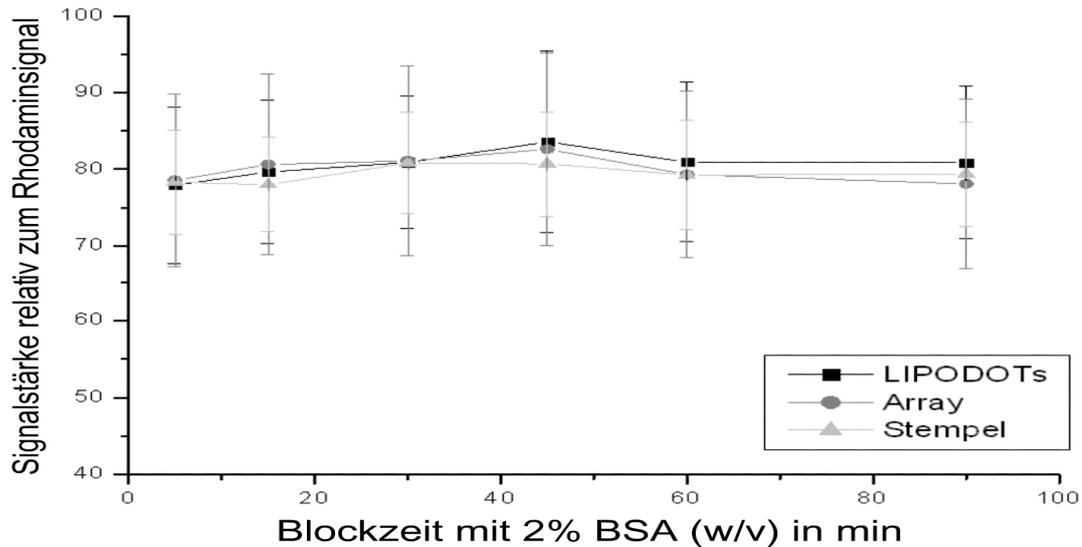
**Abb.5.94: Kontrast bei unterschiedlichen TopBlock Konzentrationen**

Für geringe Konzentrationen war der Kontrast deutlich schlechter, da das unspezifische Hintergrundsignal deutlich höher war als bei höheren Konzentrationen. Ab 2% TopBlock wurde ein optimaler Kontrast erreicht. Diese Serie der Vergleichsträger enthielt keine Stempel!

Sowohl für BSA als auch für TopBlock war mindestens eine Konzentration von 2% (w/v) nötig ist, um ein optimales Signal zu erhalten. Weiterhin gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den verschiedenen Transfermethoden.

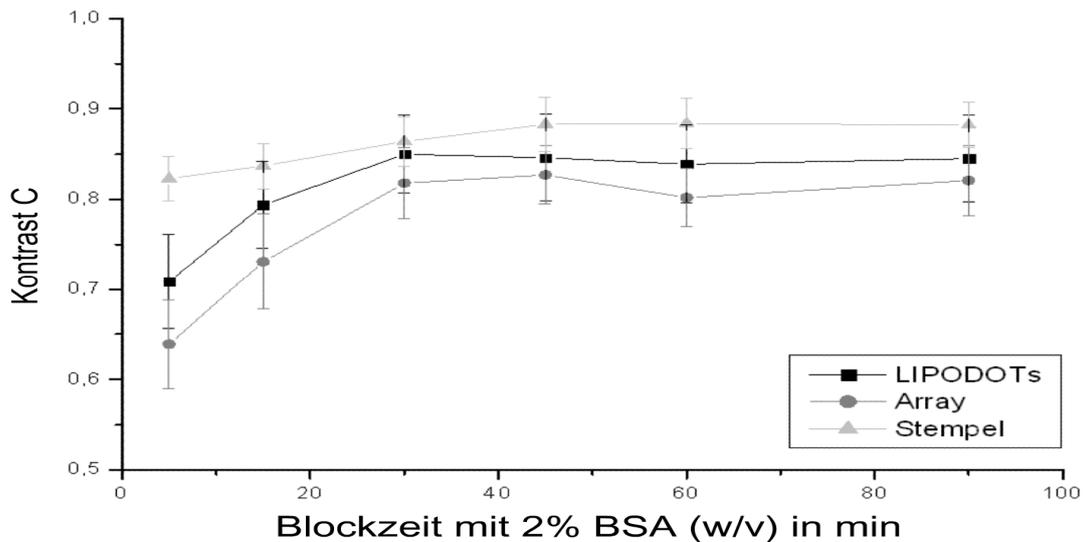
### 5.1.11.4 Optimierung der Blockdauer

Jedes Block-Reagenz benötigt eine gewisse Zeit, um sich an der Oberfläche anzulagern und diese so zu schützen. Bei BSA und TopBlock variiert die Blockdauer von 30 min bis hin zu 3 h. Für eine jeweils 2% Lösung wurde der Bindungsassay als eine entsprechende Zeitreihe durchgeführt (Abb.5.95 bis Abb.5.98).



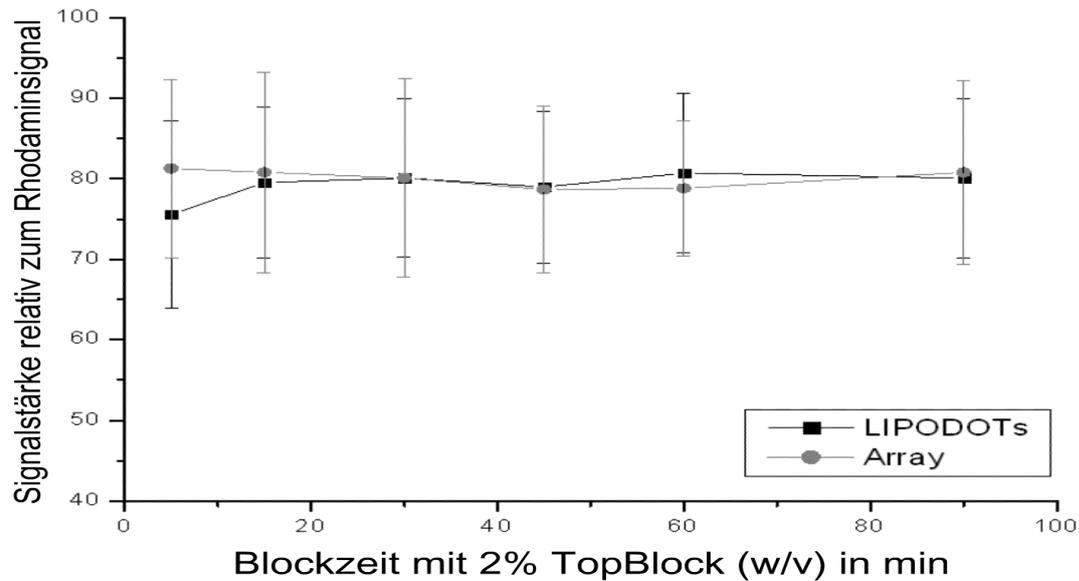
**Abb.5.95: Relative Signalstärke für verschiedene Blockzeiten mit BSA**

Die Vergleichsträger wurden unterschiedlich lang mit BSA geblockt. Das erzeugte fluoreszente Bindungssignal wurde in Relation zur Intensität von LIPODOT-Rhodamin gesetzt. Es zeigte sich keine Abhängigkeit von der Blockzeit.



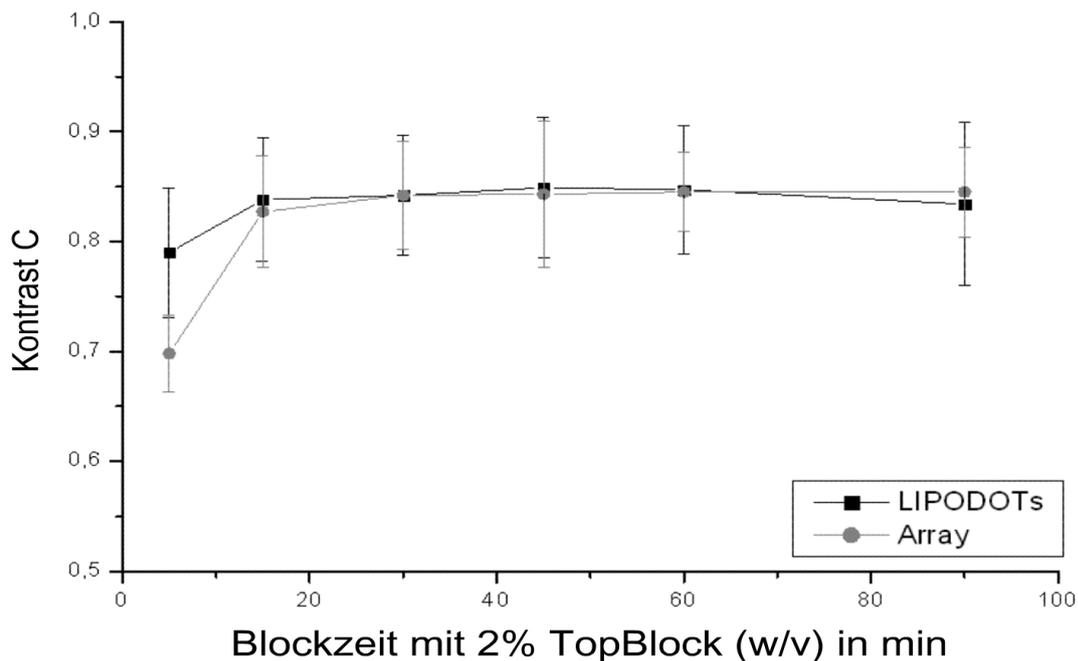
**Abb.5.96: Kontrast für verschiedene Blockzeiten mit BSA**

Für kurze Blockzeiten war der Kontrast deutlich schlechter, da das unspezifische Hintergrundsignal deutlich höher war als bei längeren Blockzeiten. Bereits nach 30 min wurde ein optimaler Kontrast erreicht.



**Abb.5.97: Relative Signalstärke für verschiedene Blockzeiten mit TopBlock**

Die Vergleichsträger wurden unterschiedlich lang mit TopBlock geblockt. Das erzeugte fluoreszente Bindungssignal wurde in Relation zur Intensität von LIPODOT-Rhodamin gesetzt. Es zeigte sich keine Abhängigkeit von der Blockzeit. Dieser Vergleichsträger enthielt keine Stempel!



**Abb.5.98: Kontrast für verschiedene Blockzeiten mit TopBlock**

Bereits nach 15 min wurde ein optimaler Kontrast erreicht. Dieser Vergleichsträger enthielt keine Stempel!

Es zeigte sich, dass für das niedermolekulare TopBlock bereits 15 min Blockzeit ausreichend sind. Für BSA dagegen wurden mindestens 30 min Blockzeit benötigt. Auch hier gab es keine Unterschiede zwischen den Transfermethoden.

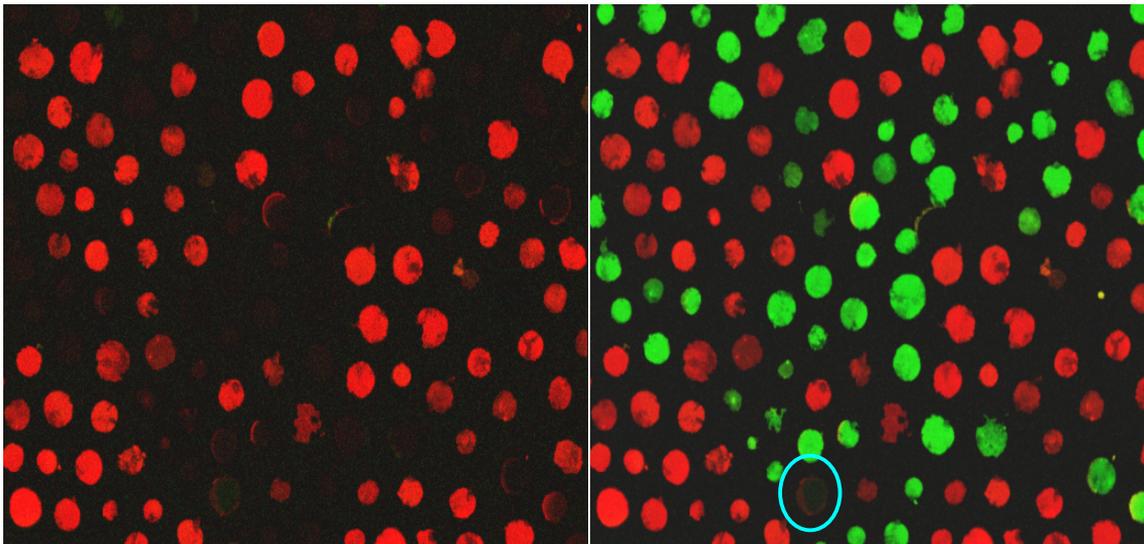
Aufgrund der Ergebnisse über die Blockdauer, die Blockkonzentrationen und die unterschiedlichen Blockreagenzien wurde ein Gemisch aus 2% BSA (w/v) und 2% TopBlock (w/v) zum Blocken verwendet. Mit diesem Gemisch wurde ein Kontrast von bis zu 0,9 erreicht.

### 5.1.12 Weitere Bindungsassays

Mit den optimierten Assaybedingungen wurden nun weitere Bindungsassays mit unterschiedlichen Biomolekülen durchgeführt.

#### 5.1.12.1 Bindungsassay mit einer biotinylierten Dipeptid-Kollektion

Auf 40 mg der Beads der Dipeptid-Kollektion wurde Biotin gekuppelt. Daraus wurde zusammen mit LIPODOT-Rhodamin Beads eine Carrier Plate erstellt und auf eine Assay Plate übertragen. Der Bindungsassay wurde dann mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin durchgeführt (Abb.5.99).



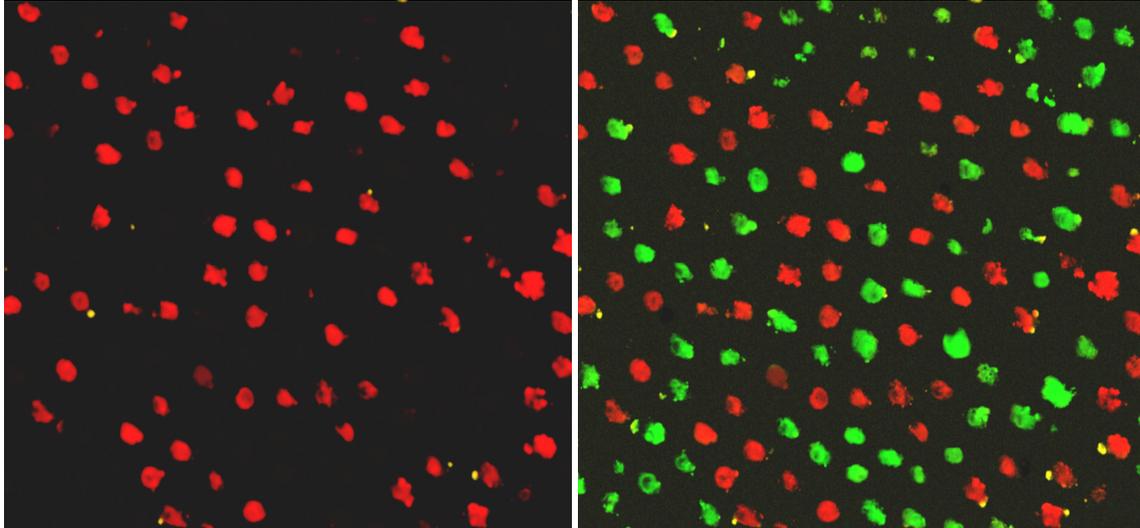
**Abb.5.99: Bindungsassay einer biotinylierter Dipeptidkolektion**

Direkt nach dem LIPODOT-Transfer (links) war nur das LIPODOT-Rhodamin (rot) zu sehen. Nach dem Blocken und Färben mit Fluorescein gelabeltem Streptavidin (rechts) waren deutlich die biotinylierten LIPODOTs (grün) zu erkennen. Ein LIPODOT färbte sich allerdings nicht (blau).

Da nahezu alle LIPODOTs mit Streptavidin gefärbt wurden, kann man davon ausgehen, dass auch nahezu alle LIPODOT-Verbindungen der biotinylierten Dipeptid-Kollektion übertragen wurden und das Biotin erkannt wurde.

### 5.1.12.2 Bindungsassay mit Antimyc-Antikörper

Die LIPODOT-Ankerverbindung wurde mit der Sequenz EQKLISEEDL (myc-Sequenz) verlängert. Diese Sequenz wird von Antimyc-Antikörpern erkannt <sup>[179;180]</sup> Dieser Antikörper\* wurde mit Fluorescein gelabelt und ein entsprechender Bindungstest durchgeführt.



**Abb.5.100: Bindungsassay der myc-Sequenz mit einem Antimyc-Antikörper**

Direkt nach dem LIPODOT-Transfer (links) war nur das LIPODOT-Rhodamin (rot) zu sehen. Nach dem Blocken und Färben mit Fluorescein gelabeltem Antimyc-Antikörper (rechts) waren entsprechend angefärbte LIPODOTs (grün) zu erkennen. Die Qualität der LIPODOTs war bei diesen Aufnahmen schlechter, da zu diesem Zeitpunkt nur hydrophobe Oberflächen mit 100° Kontaktwinkel zur Verfügung standen.

Es war somit möglich an die myc-Sequenz den entsprechenden Antimyc-Antikörper zu binden.

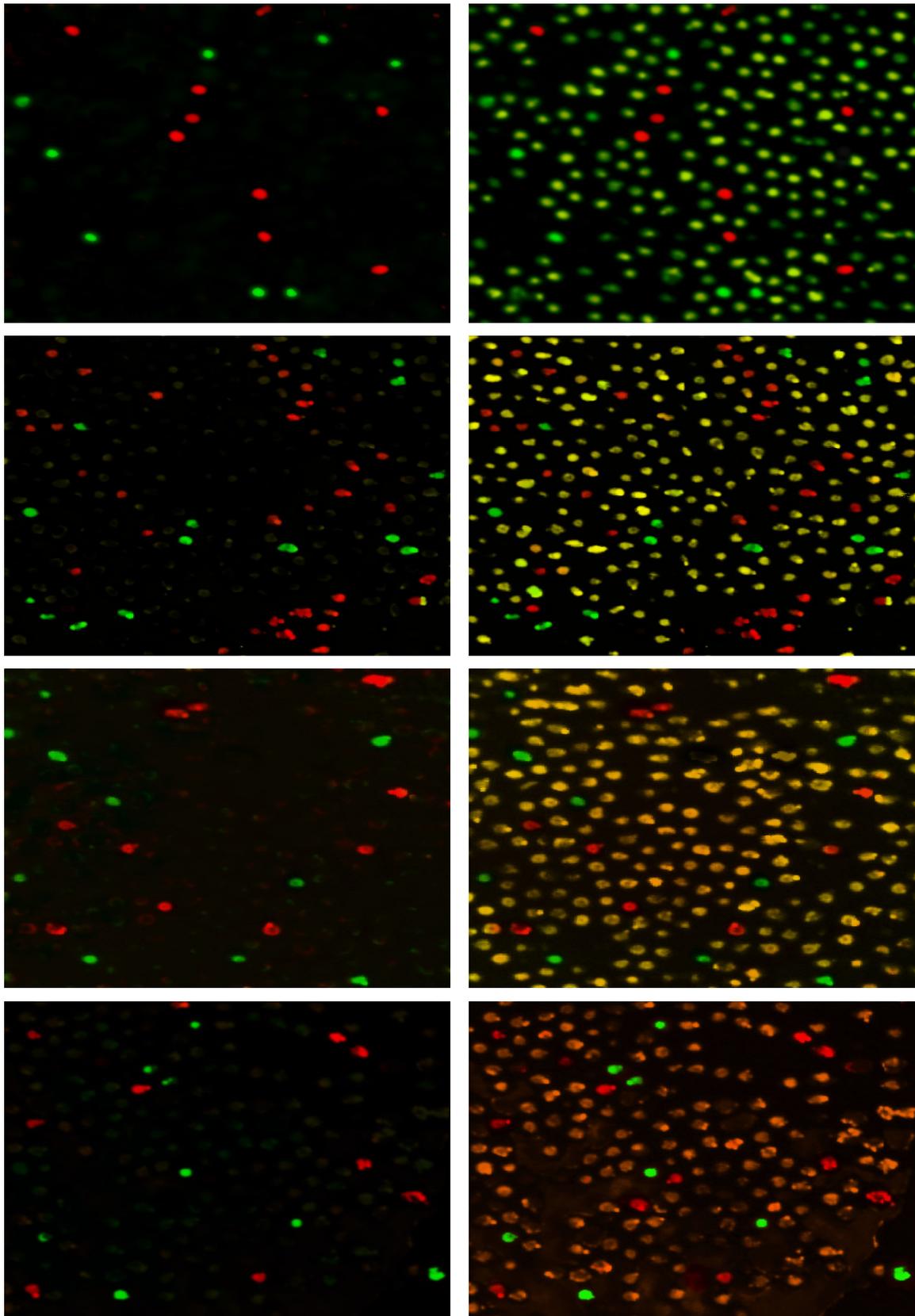
### 5.1.12.3 Ratiometrischer Farbassay

Beim Ratiometrischen Farbassay <sup>[358]</sup> konkurrieren zwei Binder, die mit unterschiedlichen Fluorophoren gelabelt sind, um denselben Interaktionspartner. Diese Assay-Technik wird hauptsächlich bei DNA- und RNA-Arrays eingesetzt, um up- und downregulierte Gensequenzen zu identifizieren.

Dementsprechend wurde eine Carrier Plate mit etwa gleichen Anteilen LIPODOT-Rhodamin, LIPODOT-Fluorescein und LIPODOT-Biotin hergestellt und auf vier Assay Plates übertragen. Mit unterschiedlichen Mischverhältnissen aus Fluorescein und Rhodamin gelabeltem Streptavidin wurden Bindungsassays (Abb.5.101) mit diesen Assay Plates durchgeführt.

---

\* Hergestellt von Melanie Nevar  
212



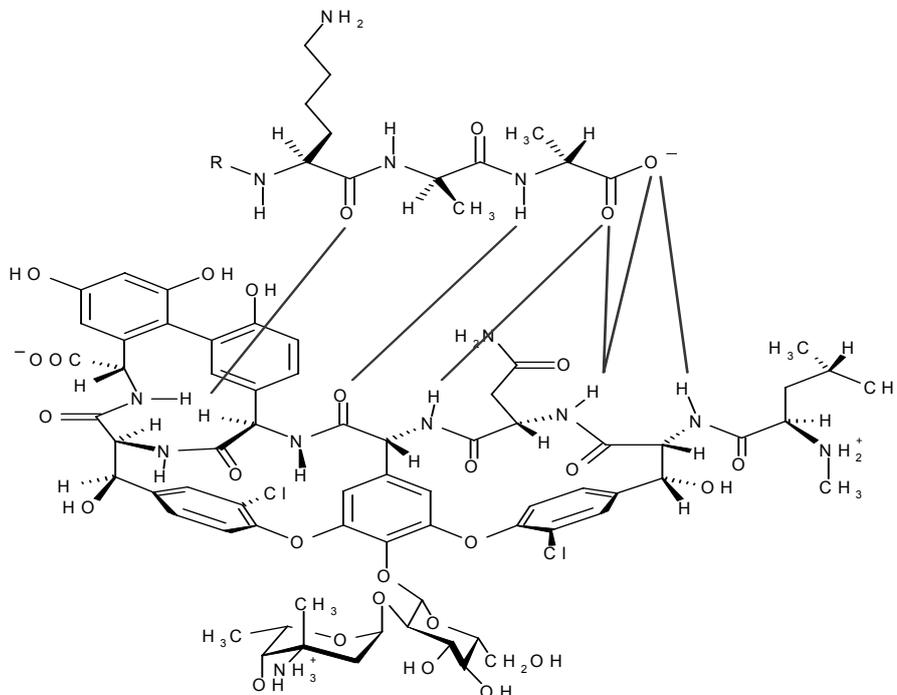
**Abb.5.101: Ratiometrischer Farbbassay mit 2-Farb-Streptavidinen**

Fluorescein gelabeltes Streptavidin wurde mit Rhodamin gelabeltem Streptavidin in verschiedenen Verhältnissen gemischt (von oben nach unten) 10:1, 3:1, 1:1 und 1:3. Über Allokation wurden entsprechend zugeordnete Stellen vor (links) und nach der Inkubation (rechts) mit dem Gemisch aufgenommen. Man sieht sehr deutlich das LIPODOT-Rhodamin (rot), LIPODOT-Fluorescein (grün) und das LIPODOT-Biotin, die sich entsprechend der Mischverhältnisse farblich ändern.

Mittels Allokation wurden die entsprechend zugeordneten Stellen auf den vier Assay Plates gefunden und man sah sehr deutlich, dass sich das LIPODOT-Biotin entsprechend der Mischverhältnisse der unterschiedlich fluoreszenten Streptavidine änderte.

#### 5.1.12.4 Bindungsassay mit Vancomycin

Die LIPODOT-Ankerverbindung wurde hierfür mit D-Ala-D-Ala bzw. L-Lys-D-Ala-D-Ala verlängert. Durch das zusätzliche L-Lys erhöht sich die Bindungskonstante von Vancomycin auf  $10^{-6}$  M <sup>[359-364]</sup> da sich hierdurch eine weitere Wasserstoffbrücke bilden kann (Abb.5.102). Ohne L-Lys konnte an Oberflächen bisher nur abgeschätzt werden, dass die Bindungskonstante mind. um den Faktor 1000 geringer liegt <sup>[363;364]</sup>.

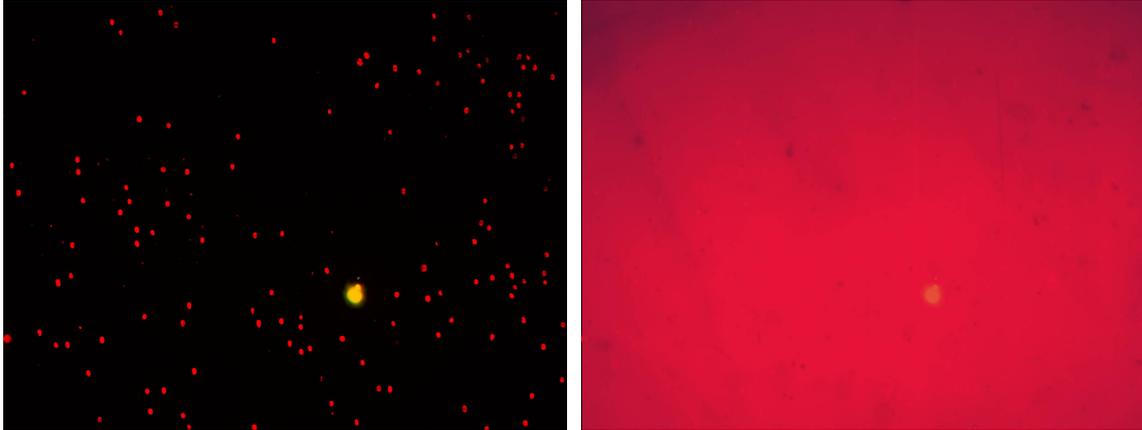


**Abb.5.102: Wechselwirkung zwischen Vancomycin und L-Lys-D-Ala-D-Ala**

Vancomycin (unteres Molekül) bindet an **D-Ala-D-Ala-L-Lys** (oberes Molekül) über mehrere Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linie).

Somit können durch die Verwendung von LIPODOT-L-Lys-D-Ala-D-Ala und LIPODOT-D-Ala-D-Ala innerhalb eines Bindungstest zwei verschiedene Bindungen erfasst werden und man kann abschätzen, wie sensitiv die entsprechenden LIPODOTs reagieren. Die LIPODOTs mit L-Lys-D-Ala-D-Ala sollten deutlich intensiv gefärbt sein, wohingegen die LIPODOTs mit D-Ala-D-Ala nahezu unsichtbar sein sollten.

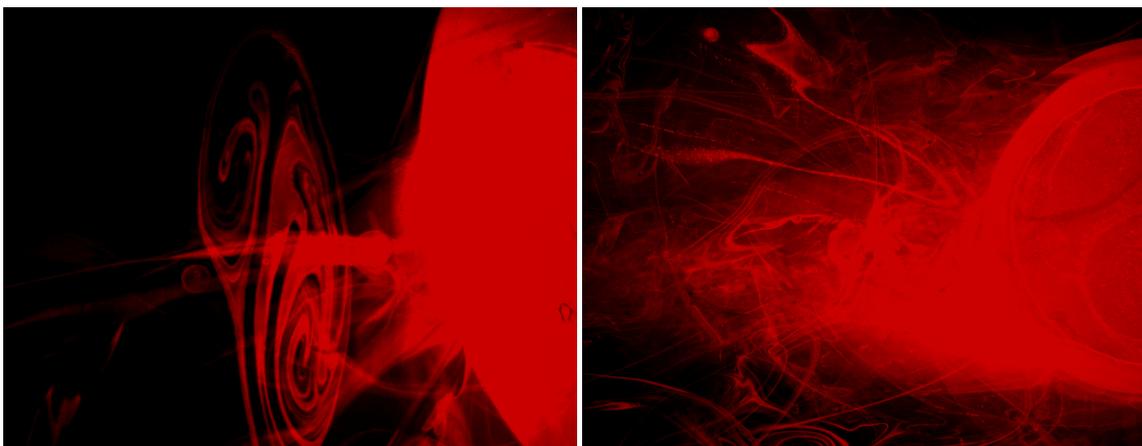
Eine Carrier Plate mit einem Gemisch aus 15% LIPODOT-Rhodamin, 15% LIPODOT-L-Lys-D-Ala-D-Ala und 70% LIPODOT-D-Ala-D-Ala wurde übertragen und ein Bindungsassay (Abb.5.103) mit TAMRA gelabelten Vancomycin durchgeführt.



**Abb.5.103: Bindungsassay mit Vancomycin-TAMRA**

Direkt nach dem LIPODOT-Transfer (links) war nur das LIPODOT-Rhodamin (rot) zu sehen. Nach dem Blocken und Färben mit Vancomycin-TAMRA (rechts) war die komplette Oberfläche mit Vancomycin-TAMRA kontaminiert. Einzig die Kontamination (gelb) ist noch nach der Inkubation mit Vancomycin-TAMRA (rechts) erkennbar (dunkeloranjer Fleck).

Hieraus ergab sich, dass das recht hydrophobe Vancomycin-TAMRA die komplette Assay Plate unspezifisch färbt. Diese unspezifische Kontamination ließ sich nicht durch exzessives Waschen entfernen. Daher wurden unbehandelte hydrophobe Oberflächen geblockt, Vancomycin-TAMRA aufpipettiert und nach 10 min wieder entfernt. Nach mehrfachem Waschen wurden Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt (Abb.5.104).



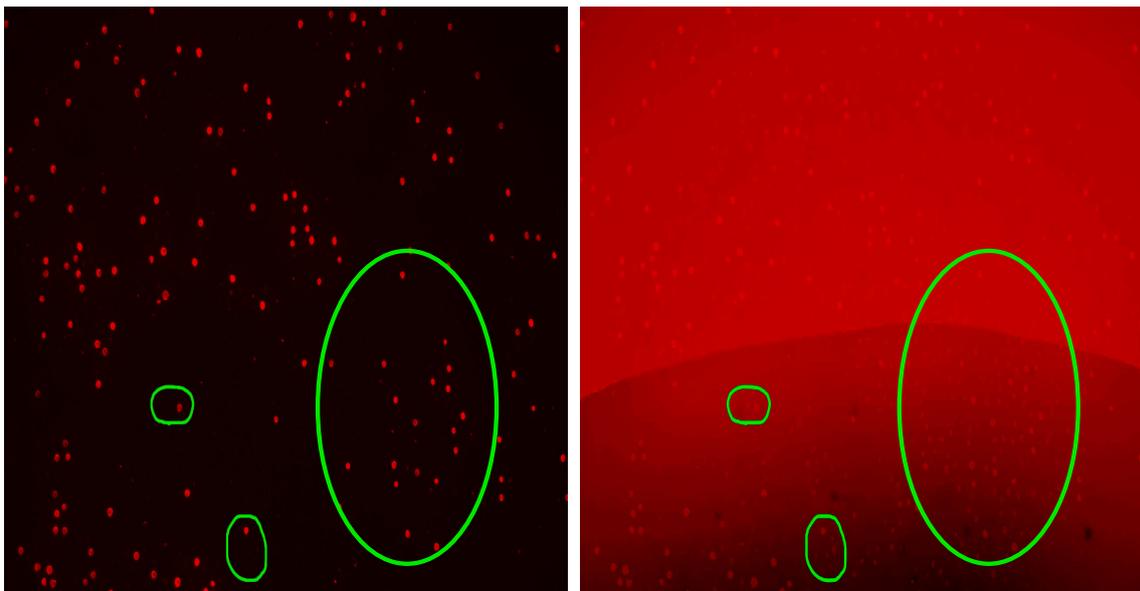
**Abb.5.104: Blockversuche gegen Vancomycin-TAMRA**

Eine hydrophobe Oberfläche wurde geblockt und mit einer Pipette ein Tropfen wässrige Vancomycin-TAMRA-Lösung aufgesetzt. Dieser wurde nach 10 min entfernt und die Oberfläche gewaschen. Es zeigten sich Ausblutungen, die sich auch bei nochmaligem Waschen nicht mehr veränderten (links). Diese entsprechen den Ausblutungen von wässrigen LIPODOT-Rhodamin Lösungen (rechts).

Es zeigte sich schnell, dass Vancomycin-TAMRA ein ähnliches Verhalten wie LIPODOT-Rhodamin zeigte. Daher wurde versucht, die hydrophobe Oberfläche mit einer Mischung aus LIPODOT-Ankerverbindung und nicht fluoreszente Vancomycin zu blocken (Abb.5.105).

Dieses Gemisch zeigte eine reduzierte Hintergrundfluoreszenz. Daher wurde erneut eine Carrier Plate mit 20% LIPODOT-Rhodamin, 20% LIPODOT-L-Lys-D-Ala-D-Ala und 60% LIPODOT-D-Ala-D-Ala hergestellt und übertragen.

Diese Assay Plate wurde dann zunächst für 30 min mit einer gesättigten Lösung aus LIPODOT-Ankerverbindung geblockt, danach trocken geblasen und für 30 min mit einer gesättigten Lösung Vancomycin überschichtet. Danach wurde die Oberfläche mit einem Gemisch aus 2% BSA und 2% TopBlock geblockt, gewaschen und ein Bindungstest (Abb.5.105) mit Vancomycin-TAMRA durchgeführt.



**Abb.5.105: Bindungsassay mit Vancomycin-TAMRA**

Direkt nach dem LIPODOT-Transfer (links) war nur das LIPODOT-Rhodamin (rot) zu sehen. Nach dem Blocken mit LIPODOT-Ankerverbindung und Vancomycin (rechtes Bild untere Hälfte) und Färben mit Vancomycin-TAMRA (rechts) war die komplette Oberfläche mit Vancomycin-TAMRA kontaminiert. Allerdings zeigten sich einige gefärbte LIPODOTs (Beispiele mit grünen Kreisen), die deutlich schwächer als das LIPODOT-Rhodamin gefärbt und zuvor nicht detektierbar waren.

Der Bindungsassay gegen Vancomycin-TAMRA zeigte sehr deutlich die Grenzen der SMA Bindungsassays auf. Die hydrophobe Oberfläche, die für die Etablierung und Stabilisierung der Monolayer sorgt, ist ebenfalls ein Ziel für extrem hydrophobe Verbindungen. Vancomycin selbst beispielsweise verankert sich

kaum auf der Oberfläche. Vancomycin-TAMRA hingegen verankert sich nahezu genauso gut wie LIPODOT-Rhodamin auf der hydrophoben Oberfläche.

Unter Berücksichtigung dieser „Einschränkung“, der viele andere Assays ebenfalls unterliegen, kann man davon ausgehen, dass hydrophobe Bindungspartner wie beispielsweise Membranproteine mit Transmembranhelices oder kleine hydrophobe Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit unspezifisch mit der hydrophoben Assay Plate interagieren und so eine Messung unterbinden.

### **5.1.13 Ansätze zur Einzelbead-Analytik**

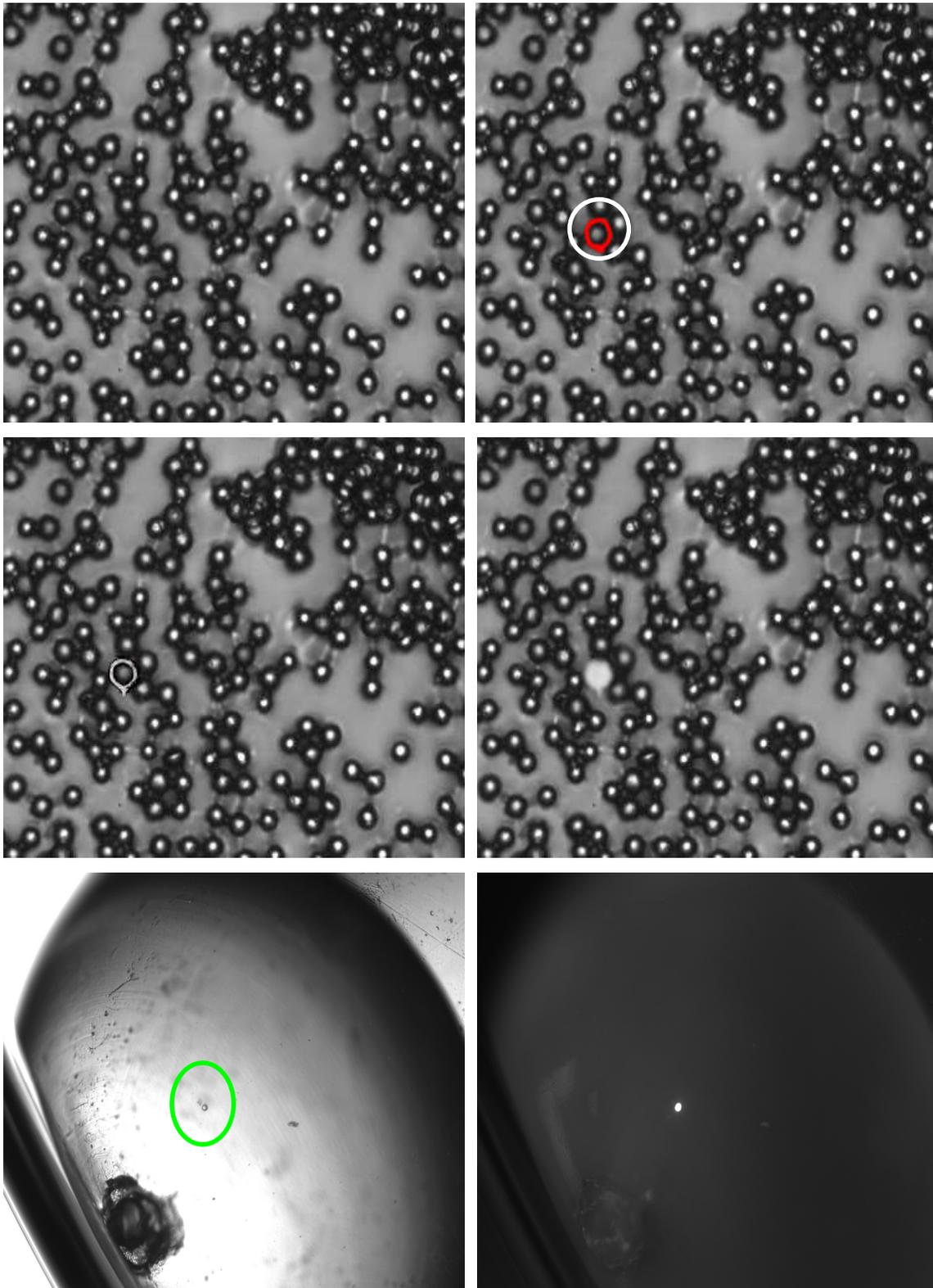
Bei einer Split & Mix Kollektion weiß man aufgrund des Herstellungsprozesses nicht, welche Verbindung sich auf welchem Bead befindet. Man weiß nur, dass auf jedem Bead genau eine Verbindung zu finden ist. Bindet nun auf einem LIPODOT ein Target, so kann man durch die Allokation das zugehörige Bead ermitteln. Es stellte sich nun die Frage, ob es möglich ist ein einzelnes Bead wiederzugewinnen und so evtl. eine Analytik durchführen zu können.

#### **5.1.13.1 Wiedergewinnung eines Beads**

Üblicher Weise wird eine Strukturbestimmung direkt vom Bead durchgeführt. Hierfür werden die Beads beispielsweise mit einem FACS-Gerät (Fluorescence assisted cell sorter) oder einem Bead-Picker in einzelne Behältnisse transferiert, die Verbindung vom Bead abgespalten und dann analysiert.

Die verwendeten 20 µm durchmessenden Beads konnten nicht mit konventionellen Methoden wiedergewonnen werden. Daher wurde ein Lasermikrodissektor für die Wiedergewinnung eines einzelnen Beads „zweckentfremdet“ (Abb.5.106).

Da der Lasermikrodissektor über einen baugleichen X-Y-Tisch wie das Fluoreszenzmikroskop verfügt, können alle Koordinaten der Allokation direkt verwendet und so jedes einzelne Bead aufgefunden und wiedergewonnen werden. Mehrere Beads wurden so manuell wiedergewonnen und stehen für eine klassische Strukturanalytik zur Verfügung.



**Abb.5.106: Wiedergewinnung eines einzelnen Beads**

Auf der Carrier Plate (links oben) wurde ein einzelnes Bead markiert (rechts oben). Mit dem Laser des Mikrodissektors wurde entlang der Markierung (rot) der Kunststoff der Carrier Plate verdampft (links mitte). Mit einem starken Laserimpuls wurde das Bead aus der Carrier Plate herauskatapultiert (rechts mitte). In einem Eppendorf-Cup (links unten) wurde das Bead (Mitte des grünen Kreises) dann aufgefangen und kann so für die Strukturanalytik verwendet werden. Mittels Fluoreszenz (rechts unten) konnte das Bead einfacher im Eppendorf-Cup entdeckt werden.

### 5.1.13.2 Teil-Dekonvolution durch Ortsinformation

Entsprechend der Kompartimentierung der Carrier Plates der vierten Generation kann mit Hilfe der Allokation nicht nur jedes Bead jedem LIPODOT zugeordnet werden, sondern auch die Teilkollektion über die X- und Y-Koordinaten berechnet werden. Hierfür benötigt man nur die Koordinaten der Allokation und den mittleren Abstand der Wells einer 384er Mikrotiterplatte.

Anhand der Koordinaten kann so das Kompartiment bestimmt werden und über diese Ortsinformation wird eine Teil-Dekonvolution erreicht.

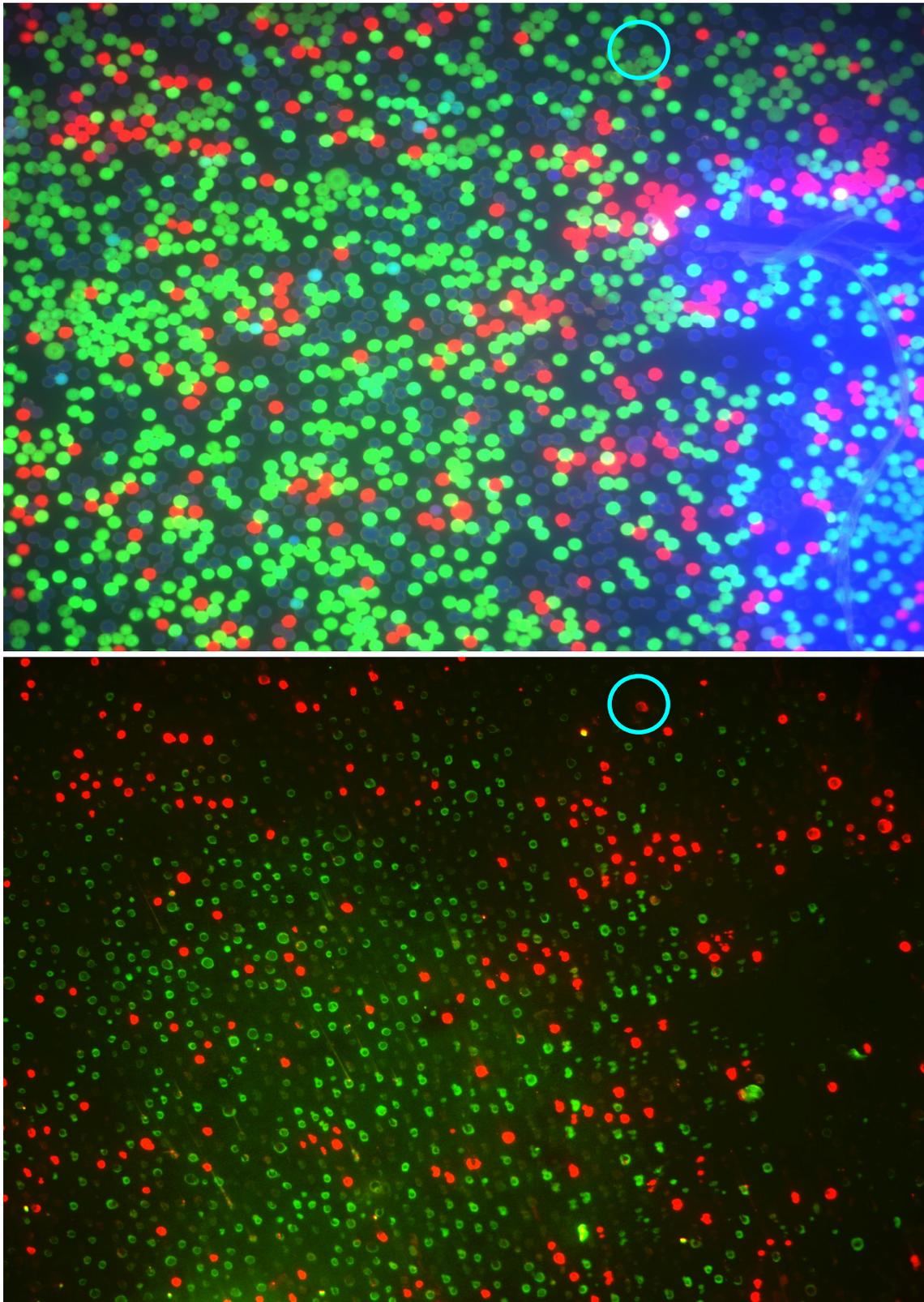
### 5.1.14 Eine Carrier Plate – viele Assay Plates

Prinzipiell kann eine Carrier Plate mehrfach zum LIPODOT-Transfer auf eine Assay Plate verwendet werden. Unter Berücksichtigung der Beladung von 1 pmol Verbindung pro Bead und der Flächendichte von 1,5 LIPODOT-Verbindungen pro  $\text{nm}^2$  benötigt man für einen 12  $\mu\text{m}$  durchmessenden LIPODOT etwa 220 attomol LIPODOT-Verbindungen. Somit wären rein theoretisch einige tausend Assay Plates aus einer Carrier Plate herstellbar.

Allerdings nimmt die Kreuzkontamination durch Diffusion der LIPODOT-Verbindungen von einem Bead zum anderen kontinuierlich im Laufe der Zeit zu.

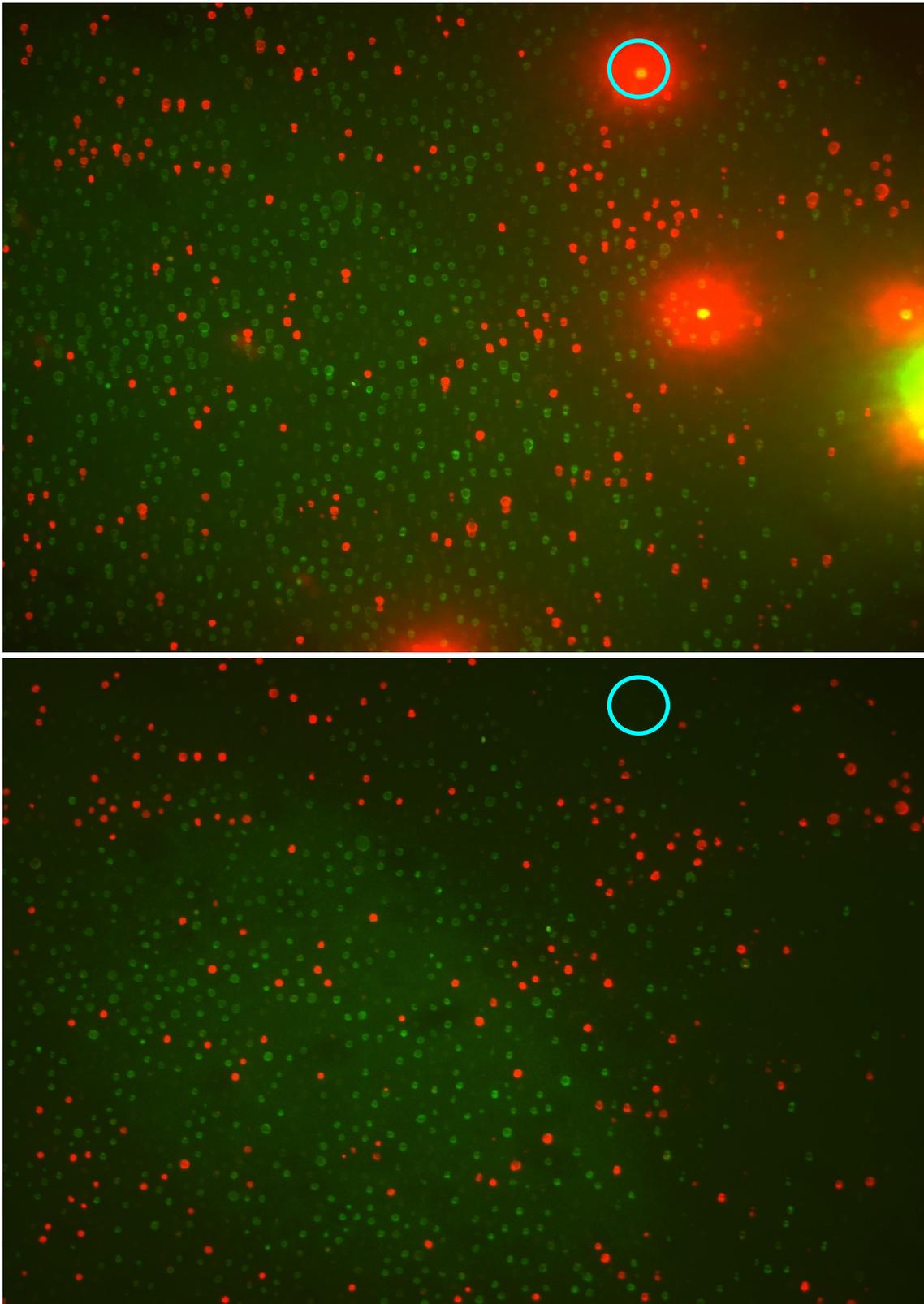
Durch die manuellen Prozesse und den teilautomatisierten Übertragungsschritt konnten im jetzigen Stadium der Entwicklung zwischen 2 und 8 Assay Plates von einer Carrier Plate hergestellt werden (Abb.5.107 und Abb.5.108), bis die Kreuzkontaminationen zu stark wurden (ca. 15 min nach Beginn des ersten Transfers).

Bei vollständiger Automatisierung der Übertragung von der Carrier Plate zur Assay Plate und damit entsprechender Zeiteinsparung könnten deutlich mehr Assay Plates mit einer Carrier Plate hergestellt werden.



**Abb.5.107: Carrier Plate und 4. Assay Plate**

Die Carrier Plate (oben) enthielt Beads mit LIPODOT-Fluorescein, LIPODOT-Rhodamin und der LIPODOT-Ankerverbindung. Rechts auf der Carrier Plate befand sich eine Kontamination (dünne Faser), die den LIPODOT-Transfer verhinderte. Die 4. Assay Plate (unten) zeigt sehr deutlich LIPODOT-Rhodamin (rot). Der blaue Kreis markiert einen „besonderen“ LIPODOT, da er auf der Carrier Plate scheinbar keine Entsprechung findet (vergleiche hierzu Abb.5.108).



**Abb.5.108: 7. und 10. Assay Plate der Carrier Plate aus Abb.5.107**

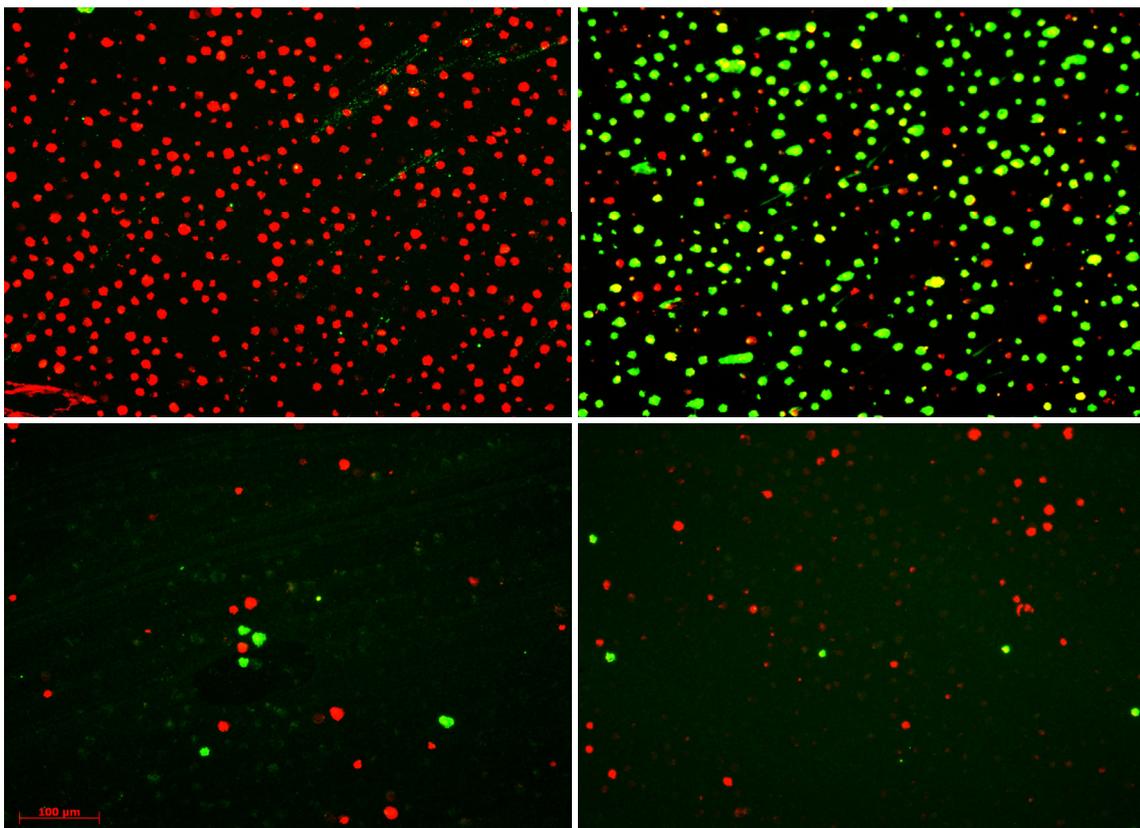
Die 7. Assay Plate (oben) erklärt (hellblauere Kreis), warum die 4. Assay Plate (Abb.5.107 unten) einen „unerklärlichen“ roten LIPODOT besitzt, der nicht auf der Carrier Plate (Abb.5.107 oben) zu finden war. Beim Transfer bleiben selten Beads auf der Assay Plate haften und lösen sich so aus der Carrier Plate. Das „verlorene“ Bead erzeugte dementsprechend noch auf der 4. Assay Plate einen roten LIPODOT, aber nicht mehr auf der 10. Assay Plate (unten). Zudem waren auf der 10. Assay Plate die LIPODOTs deutlich schwächer, was durch eine längere Belichtungszeit kompensiert wurde.

Bisher konnten manuell maximal ein Dutzend Assay Plates von einer Carrier Plate hergestellt werden.

### 5.1.15 Bindungsassays mit der $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion

Von den 5 Carrier Plates mit der  $\beta$ -Tetrapeptid-Kollektion wurden jeweils 9 Assay Plates hergestellt. Somit standen 9 Sätze mit allen 289 Teilkollektionen zur Verfügung.

Ein Satz der Kollektion wurde nach dem Blocken mit 2% BSA und 2% TopBlock mit einem biotinylierten Rezeptor inkubiert und die Biotinylierung mit einem Streptavidin-QDot detektiert. Entsprechend der Kompartimentierung der Carrier Plates konnten die Transferkontrolle (Abb.5.109 oben links), die Biotinkontrolle (Abb.5.109 oben rechts) sowie spezifische Bindungen im Bereich der Teilkollektionen (Abb.5.109 je unten) nachgewiesen werden.

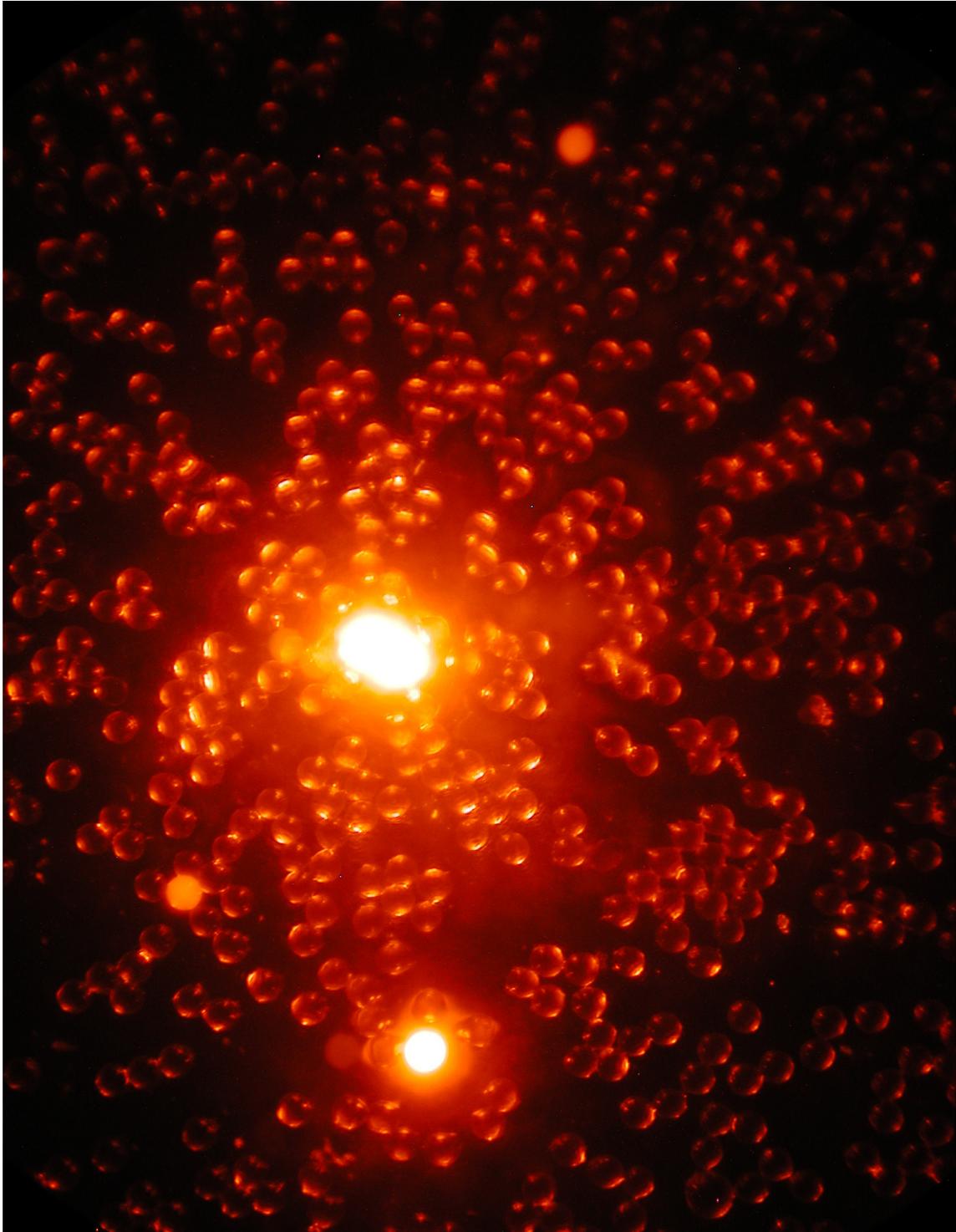


**Abb.5.109: Aufnahmen verschiedener Kompartimente einer Assay Plate**

LIPODOT-Rhodamin (rot) und Streptavidin-QDots (grün) erzeugten die Fluoreszenz. Die Transferkontrolle (links oben) bestand nur aus LIPODOT-Rhodamin. Die Biotinkontrolle (rechts oben) enthielt LIPODOT-Biotin und LIPODOT-Rhodamin. In allen Teilkollektionen (links und rechts unten) befand sich LIPODOT-Rhodamin. Anbindung von QDots in diesen Bereichen zeigten eine spezifische Interaktion mit dem biotinylierten Rezeptor.

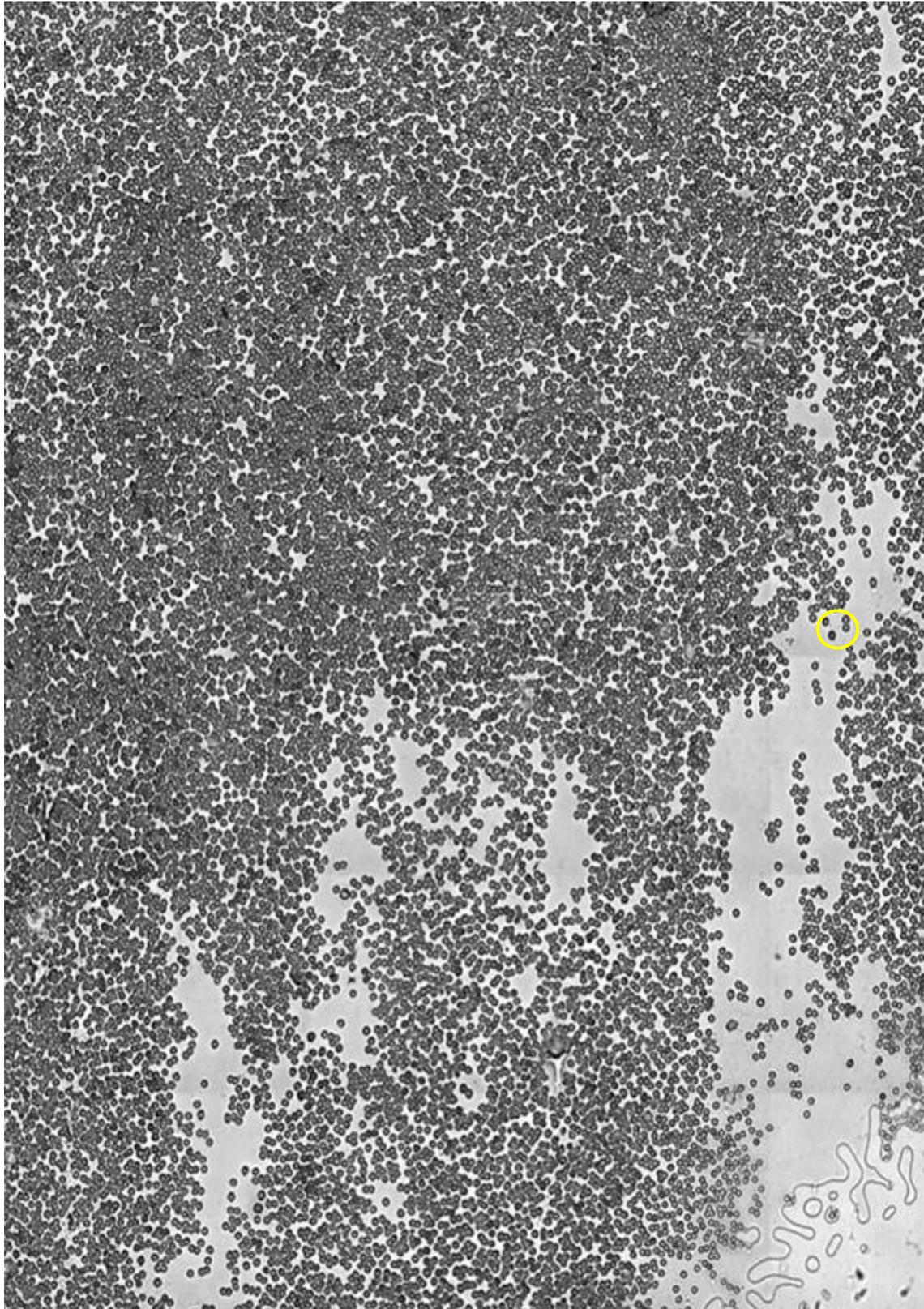
### 5.1.16 Abbildungen von Assay Plates und Carrier Plates

In diesem Bereich sind noch einige Aufnahmen (Abb.5.110 bis Abb.5.112) untergebracht, die besonders sehenswert sind.



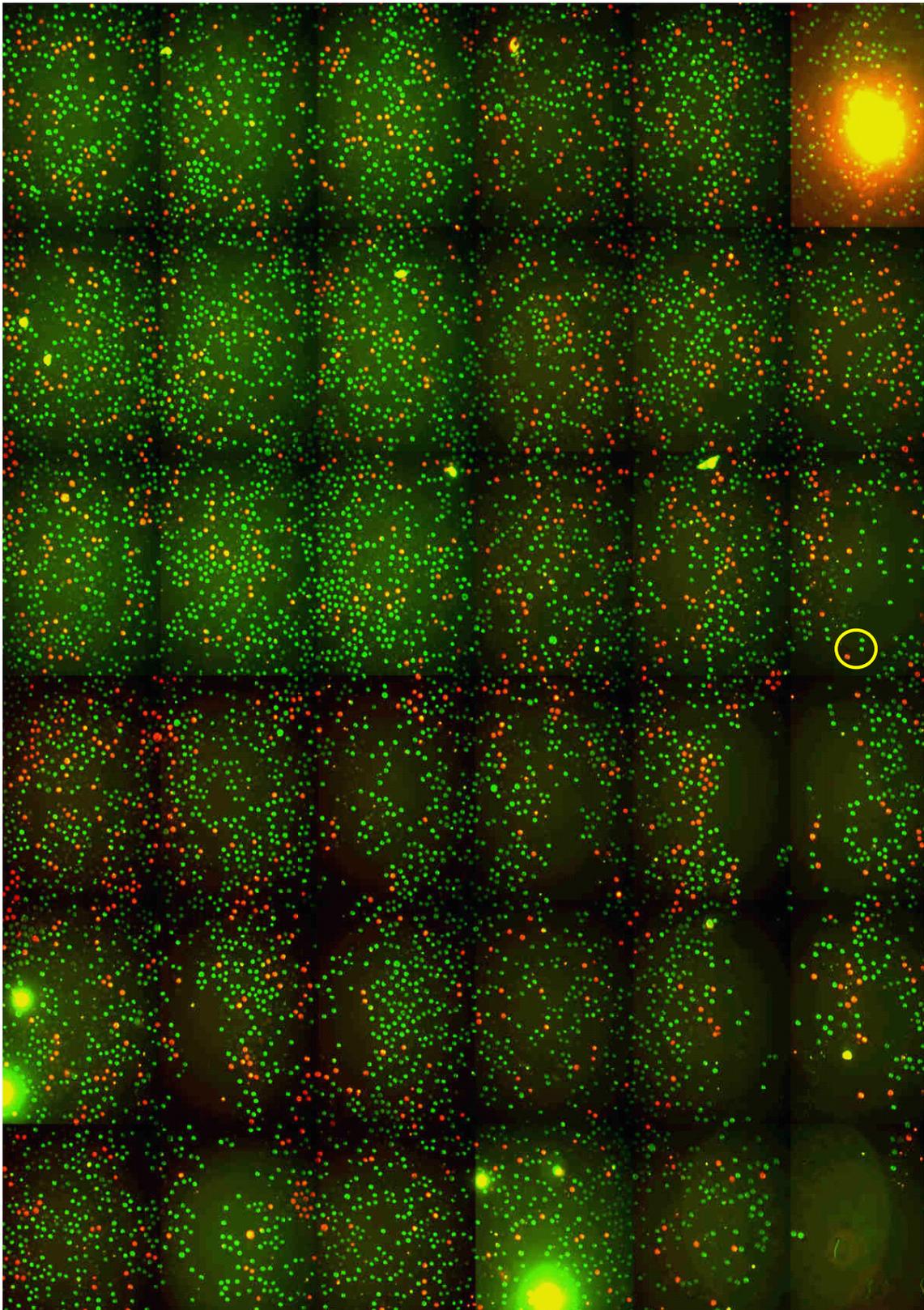
**Abb.5.110: Rhodaminfluoreszenz einer Carrier Plate**

Die LIPODOT-Rhodamin Beads leuchten hell auf. LIPODOT-Fluorescein Beads leuchten schwächer auf. Interessanter Weise verhalten sich die Beads mit LIPODOT-Ankerverbindung wie Kristallkugeln und spiegeln das Licht der LIPODOT-Rhodamin Beads entsprechend wider.



**Abb.5.111: Aufnahmen einer Carrier Plate**

Diese Aufnahme entspricht ca. 4 x 2 mm und enthält knapp 30.000 Beads. Solche Randzonen einer Carrier Plate wurden stets als signifikante Bereiche ausgewählt. Um die Allokation durchzuführen, wurden von einem Bead die exakten Koordinaten bestimmt.



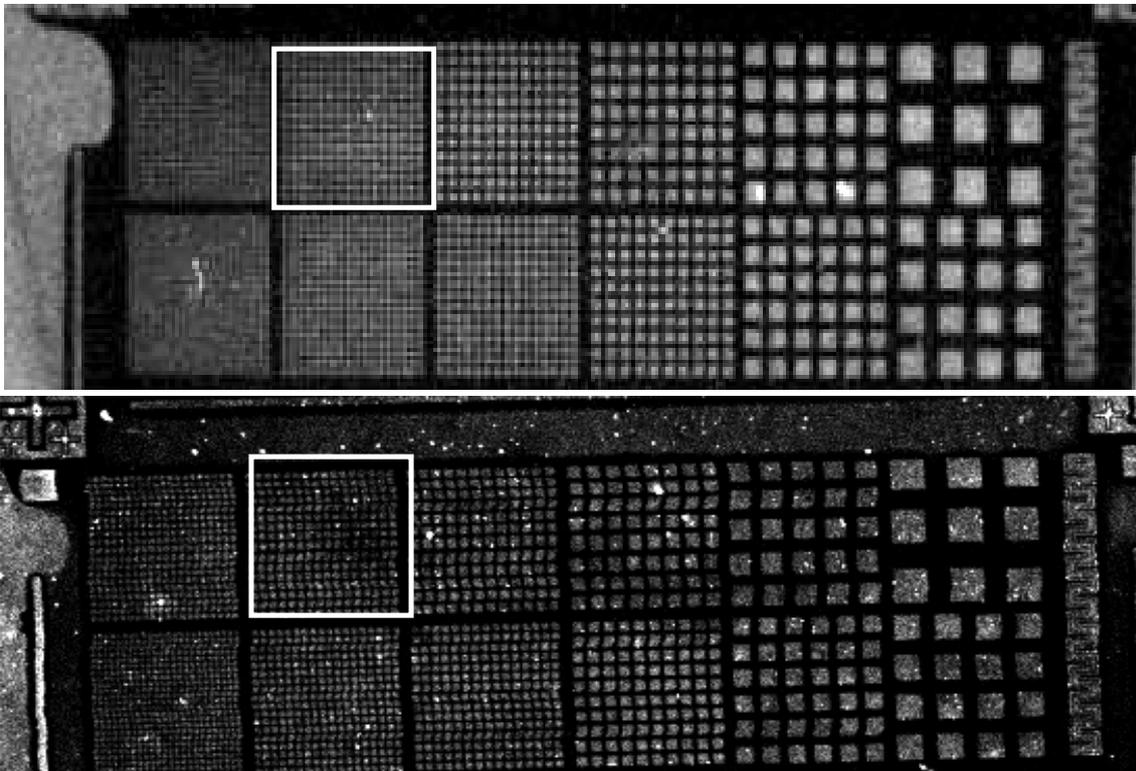
**Abb.5.112: Aufnahmen der allokierten Assay Plate**

Die Allokation funktioniert so ähnlich wie ein „Suchspiel“ in einer Zeitschrift. Man vergleicht zwei Bilder (hier Abb.5.112 und 5.111) miteinander und sucht signifikante identische Muster. Beispielhaft wurden mit dem gelben Kreis zwei grüne und ein roter Punkt markiert. Diese stammen von den drei Beads (im gelben Kreis) aus Abb.5.111. Die Allokation erlaubt es nun jedem Punkt das entsprechende Bead zuzuordnen. Der Leser sei hier aufgefordert selbst einige Zuordnungen zu finden (insgesamt sind etwa 30.000 Zuordnungen möglich).

### 5.1.17 Mikroarrayscanner und LIPODOTs

Heutige Mikroarrayscanner bieten im Normalfall eine Auflösung von 10  $\mu\text{m}$  pro Pixel. Damit ist es in keinster Weise möglich, einen LIPODOT quantitativ auf Fluoreszenz zu erfassen.

Die Firma Biorad bietet seit Mitte 2004 Mikroarrayscanner <sup>[365]</sup> mit 2  $\mu\text{m}$  Auflösung an und erklärte sich bereit, eine entsprechende Mikrostruktur zu vermessen. Da die SMA LIPODOT-Arrays zu „unregelmäßig“ sind, wurde eine gestempelte Probe an Biorad verschickt. Der Stempel enthielt Strukturen zwischen 5 und 50  $\mu\text{m}$  und erlaubte somit eine Abschätzung der Strukturauflösung und Erfassungsgenauigkeit des Scanners (Abb.5.113).

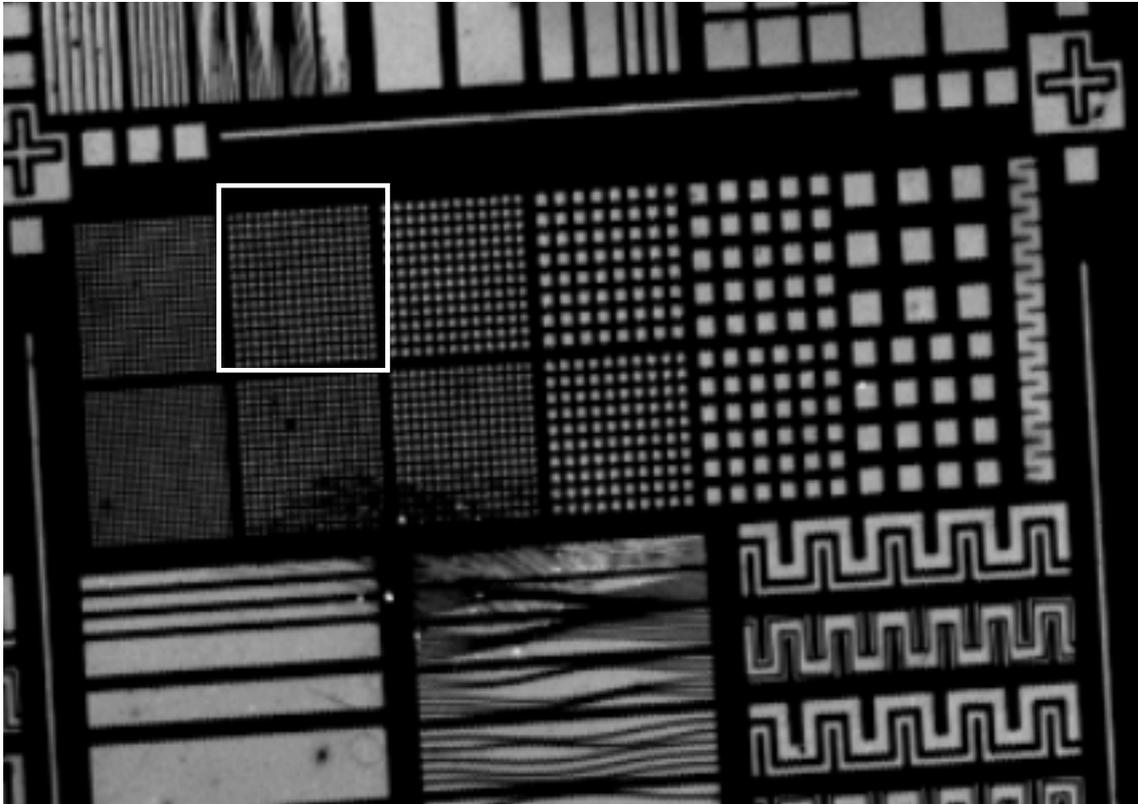


**Abb.5.113: Scanneraufnahme von Biorad eines gestempelten Mikroarrays**

Das Mikroarray wurde mit LIPODOT-Rhodamin auf eine hydrophobe Oberfläche gestempelt und mit einem Minirad Mikroarrayscanner mit 5  $\mu\text{m}$  (oben) und 2  $\mu\text{m}$  (unten) aufgenommen. Strukturen mit der Größe von LIPODOTs sind weiß markiert. Eine Auflösung mit 5  $\mu\text{m}$  war unscharf und bei 2  $\mu\text{m}$  Auflösung zeigten sich Lauffehler (verzittertes Bild) des Scanners.

Man sah, dass 5  $\mu\text{m}$  Auflösung nicht ausreichten, um einzelne LIPODOTs zu identifizieren. Bei 2  $\mu\text{m}$  zeigt sich ein Lauffehler des Scanners während der Aufnahme. Es ließen sich Strukturen in der Größe von LIPODOTs zwar noch identifizieren (Abb.5.113), aber nicht mehr quantifizieren.

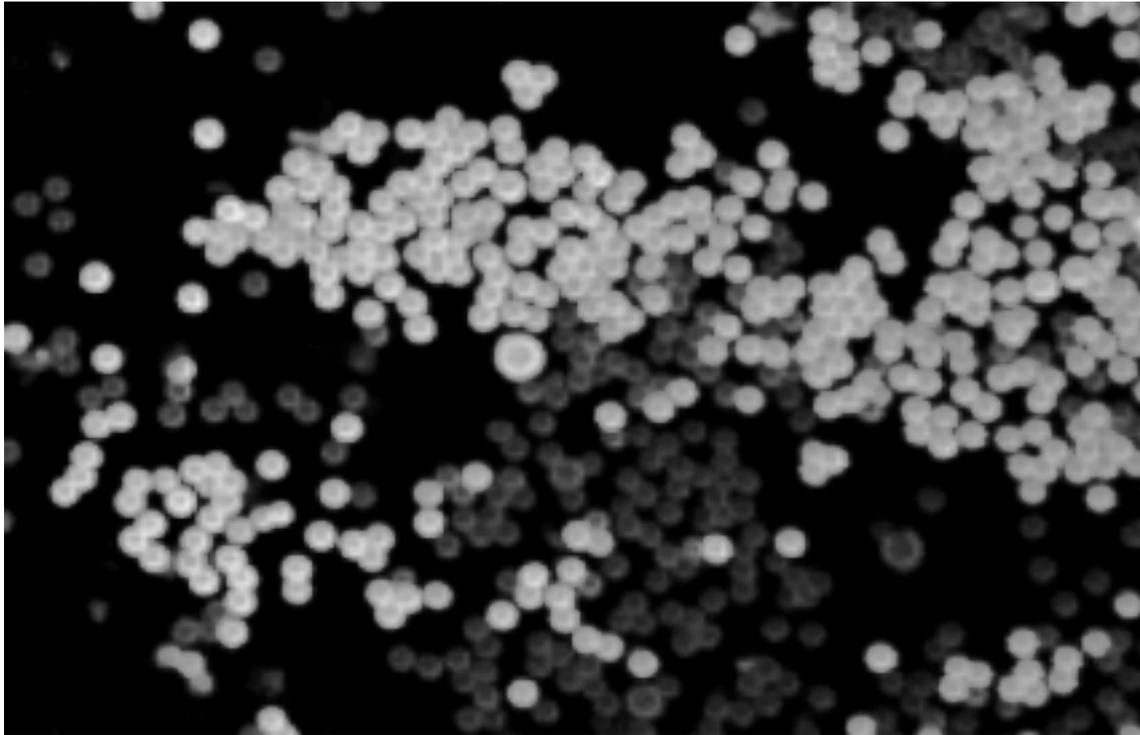
Bei einer Gerätevorführung eines Axon-Scanners der Firma Biozym ergab sich die Möglichkeit, ein gestempeltes Array mit einer Fluoreszenzkontrolle (Abb.5.114) und einem Bindungsassay gegen LIPODOT-Biotin, das 1:100 mit LIPODOT-Ankerverbindung verdünnt wurde, zu scannen.



**Abb.5.114: Scanneraufnahme eines gestempelten Mikroarrays mit einem Axon-Scanner**

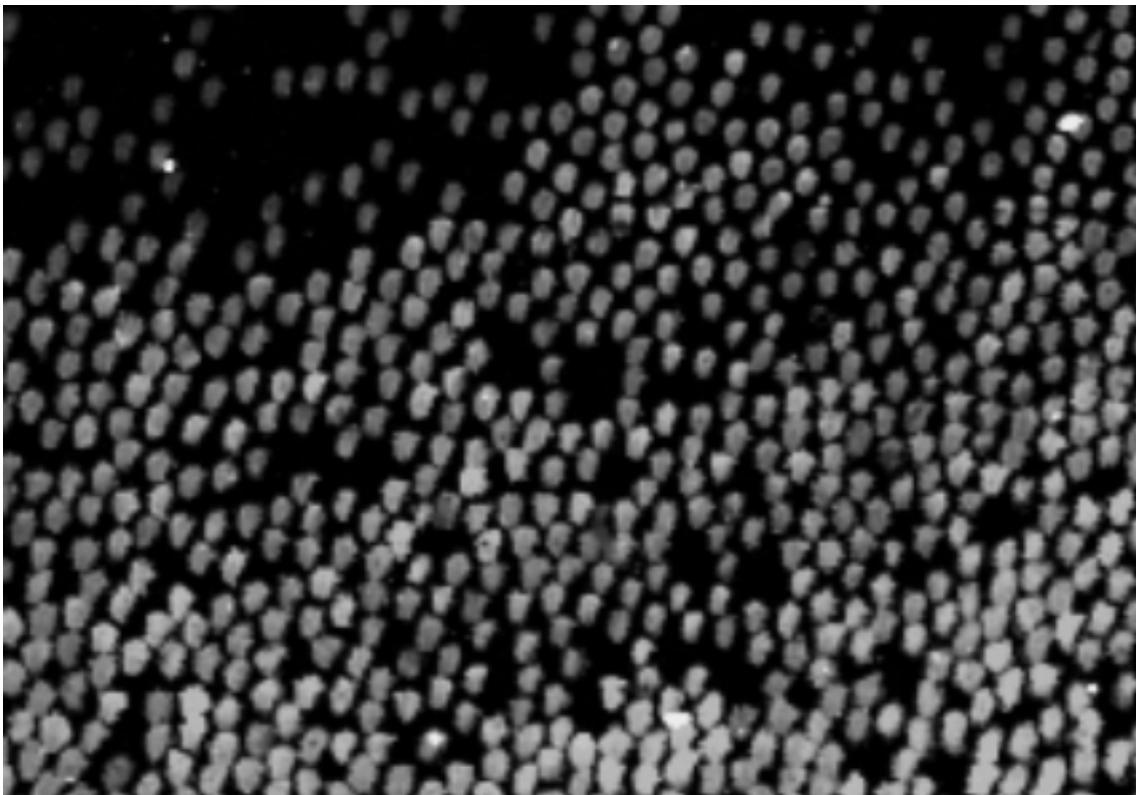
Das Mikroarray wurde mit LIPODOT-Rhodamin auf eine hydrophobe Oberfläche gestempelt und mit 5  $\mu\text{m}$  Auslösung erfasst. Strukturen mit der Größe von LIPODOTs sind weiß markiert.

Leider besitzt der Scanner nur eine Auflösung von 5  $\mu\text{m}$  pro Pixel, was sich deutlich bei den kleinen Strukturen durch eine entsprechende Konturunschärfe und ein Moiré-Muster zeigte. Allerdings verfügte der vorgestellte Scanner über eine exzellente Optik und Signalverstärkung. Dieser konfokale Scanner besitzt zudem die technische Möglichkeit, in einem bestimmten Abstand ober- oder unterhalb zu scannen. Daher wurde eine Carrier Plate 10  $\mu\text{m}$  oberhalb der Oberfläche gescannt (Abb.5.115). Da das Gerät zur freien Verfügung stand, wurde versuchsweise eine Carrier Plate und eine Assay Plate (Abb.5.116) eingescannt. Beide Plates zeigten im Rhodaminkanal eine Fluoreszenz, die zu einem Übersteuern der Photomultiplier führte. Diese wurden dann im unteren nicht-linearen Messbereich betrieben, um keine Sättigung zu erhalten. Bei der Carrier Plate war ein Sättigungssignal nicht zu umgehen (Abb.5.115).



**Abb.5.115: Scanneraufnahme (Axon, Biozym) im Fluoresceinkanale einer Carrier Plate**

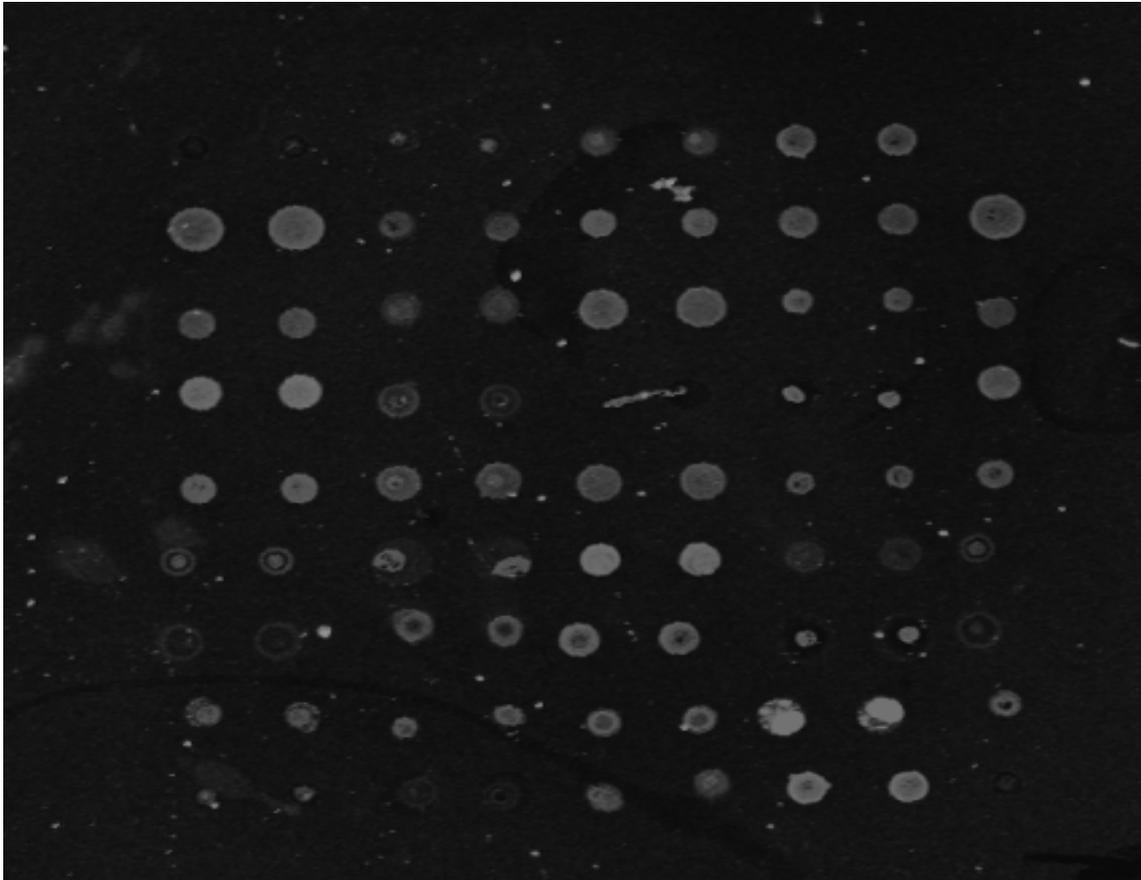
Die Aufnahme des Fluoresceinkanals zeigt Rhodaminbeads (hell) und Fluoresceinbeads (dunkel). Erstaunlicherweise war die Fluoreszenz der Rhodaminbeads extrem stark. Zudem strahlen die Beads so stark, dass sie wie eine Multilayer erscheinen. Im Rhodaminkanal waren die Beads nicht zu vermessen.



**Abb.5.116: 2-Kanal-Scanneraufnahme (Axon, Biozym) einer Assay Plate**

Das Rhodaminsignal konnte aufgrund seiner Stärke nicht mehr erfasst werden. Daher erscheinen alle LIPODOTs grün. Weiterhin erlaubt die Auflösung des Scans weder eine Quantifizierung noch eine Identifizierung der LIPODOTs.

Unter identischen Aufnahmebedingungen wurde ein Protein-Mikroarray\* vermessen. Hier zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität der Kontrollspots (Abb.5.117) um den Faktor 80 bis 400 schwächer war als das Signal der LIPODOTs.



**Abb.5.117: Scanneraufnahme (Axon, Biozym) eines konventionellen Protein-Mikroarrays**

Das Protein- und Antikörper-Mikroarray zeigte ein 80 bis 400-fach schwächeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den Einstellungen und Intensitäten der LIPODOTs.

Im Vergleich zu den Mikroskopaufnahmen zeigte sich sehr deutlich, dass heutige Scanner aufgrund der Auflösung noch nicht in der Lage sind, Statistische Mikroarrays zu erfassen. Ebenfalls konnte eine Carrier Plate nicht hoch genug aufgelöst werden. Zur Einzelidentifikation von Beads auf der Carrier Plate würde man eine Auflösung von 1  $\mu\text{m}$  benötigen. Interessanterweise ist die Fluoreszenzintensität so hoch, dass ein Filter für die Aufnahmen verwendet werden müsste. Bei 5  $\mu\text{m}$  Auflösung benötigten die Scanner ca. 45 min für ein Zweikanal-Bild. Bei 1  $\mu\text{m}$  Auflösung wären dies knapp 19 h. Zudem ist mit einem Scanner keine Allokation möglich.

---

\* Herstellung und Assaydurchführung durch Oda Stoevesandt (Arbeitskreis Priv. Doz. Brock, Tübingen)

### 5.1.18 Zusammenfassung der LIPODOT-Ergebnisse

Unter der Prämisse, dass die Herstellungszeit unabhängig von der Anzahl der zu transferierenden Verbindungen sein sollte, wurde eine Methode zur Herstellung eines Mikroarrays entwickelt.

- Eine chemische Ankerverbindung des Lipopeptids der Struktur Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>3</sub>K(β-Ala-β-Ala-NH<sub>2</sub>)-NHMe wurde mit einem photolabilen Linker auf monodispersen 20 μm Beads synthetisiert.
- An der Aminogruppe des β-Ala der Ankerverbindung konnten weitere Synthesen durchgeführt werden. Es wurden sowohl einzelne Verbindungen, als auch komplette Verbindungskollektionen auf dieser Ankerverbindung synthetisiert.
- Die Beads wurden zu einer Monolayer auf einer Carrier Plate aufgeklebt und so ein statistisches Bead-Array generiert. Verschiedene Verfahren zur Herstellung der Monolayer und einer strukturierten Monolayer wurden etabliert.
- Beim LIPODOT-Transfer wurden die Verbindungen auf den Beads durch UV-Licht freigesetzt und von den Beads auf der Carrier Plate auf eine Assay Plate übertragen. Jedes Bead erzeugte dabei eine kreisförmige Fläche (LIPODOT), auf der sich die Verbindung verankerte, wodurch ein Statistisches Mikroarray entstand. Für den Transfer wurden entsprechende Apparaturen und Methoden entwickelt.
- Die erzeugten Mikroarrays auf den Assay Plates und das Bead-Array auf der Carrier Plate wurden mittels einer Allokation einander zugeordnet, so dass jedes Bead dem entsprechenden LIPODOT zugeordnet und so ein internes Koordinatensystem etabliert werden konnte.
- Mittels Silanisierung wurden hydrophobe Oberflächen erzeugt, die als Assay Plate verwendet werden konnten. Es ist anzunehmen, dass die Pam<sub>3</sub>Cys-Gruppe eine molekulare Monolayer auf der Assay Plate Oberfläche mit 1,5 Molekülen pro nm<sup>2</sup> erzeugt.
- Verschiedene Verbindungen wurden als Statistisches Mikroarray auf Assay Plates übertragen und Bindungsassays durchgeführt. Die Protokolle der Bindungsassays wurden für die hydrophobe Oberfläche optimiert und spezifische Anbindungen von Streptavidin, Antikörpern und Vancomycin

konnten nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse waren identisch zu herkömmlichen Mikroarrays und Bindungsassays, die an softlithographischen Mikrostrukturen durchgeführt wurden.

- Anhand einer Fluoreszenzverdünnungsreihe wurde gezeigt, dass sich die Bindung auf einem LIPODOT quantifizieren lässt.
- Es wurden so innerhalb von 15 Sekunden bis zu 83.526 Verbindungen einer Tetrapeptid-Kollektion mittels eines LIPODOT-Transfer auf eine Assay Plate übertragen und damit ein Statistisches Mikroarray mit bis zu 1,3 Millionen LIPODOTs erzeugt. Die Dauer des Transferschrittes ist hierbei komplett unabhängig von der Anzahl der Verbindungen, der Beads, der Redundanz und der Größe und Form der Carrier Plate. Der Transferprozess wurde mehrfach wiederholt und so von jeder Carrier Plate bis zu 10 chemische Kopien als Assay Plates hergestellt.
- Die Detektion der Bindung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop, da eine Auflösung von mind. 2  $\mu\text{m}$  pro Pixel benötigt wurde, um das Statistische Mikroarray abzubilden. Handelsübliche Mikroarrayscanner besitzen zwischen 5 und 10  $\mu\text{m}$  pro Pixel Auflösung und erwiesen sich als ungeeignet.
- Aus der Carrier Plate konnten gezielt einzelne Beads wiedergewonnen werden und stehen so einer Analyse zur Verfügung.

Insgesamt ist die Dauer des LIPODOT-Transfers unabhängig von der Zahl der verwendeten Verbindungen. Es entsteht dabei ein Statistisches Mikroarray mit 12  $\mu\text{m}$  durchmessenden Dots und bis zu 200.000 Verbindungen pro  $\text{cm}^2$ . Bindungsassays lassen sich auf diesen Oberflächen vergleichbar zu Standardtechniken durchführen und sind ebenfalls mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop auszulesen.

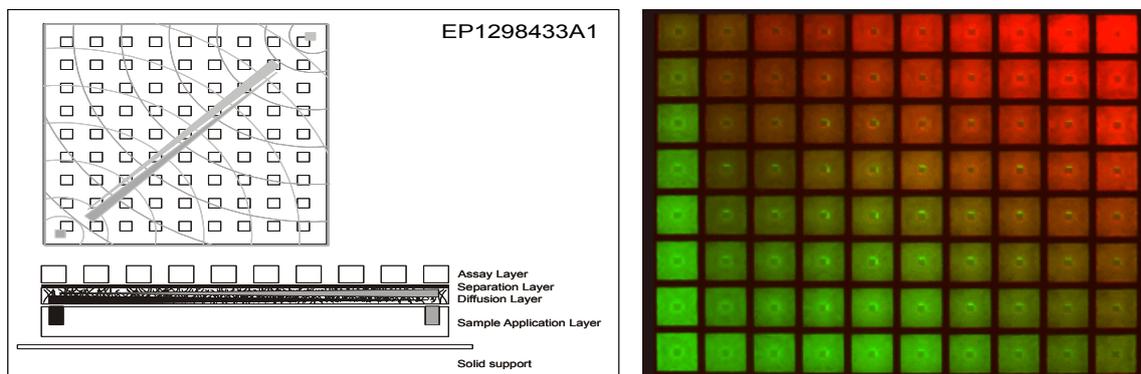
Statistische Mikroarrays mit bis zu 1,3 Millionen LIPODOTs und nahezu 84.000 Verbindungen lassen sich so innerhalb von Sekunden aus einer Carrier Plate herstellen.

## 5.2 Diffusionsvorrichtung

Die Diffusionsvorrichtung wurde entwickelt um einen Zwei-Komponenten-Assay mit so wenig Pipettierschritten wie nötig und so viel Information aus einem zellulären Assay wie möglich zu gewinnen.

### 5.2.1 Design der Diffusionsvorrichtung

Erste Experimente zu einer Erzeugung eines Gradienten über Diffusion wurden mit einer Nanotiterplatte durchgeführt. Unter die Nanotiterplatte (15x15 mm) wurde eine Agarosematrix gelegt und an den jeweils gegenüberliegenden Ecken ein Tropfen einer Fluorophorlösung pipettiert. Sobald der Diffusionsgradient die Agarose durchtränkt hatte, wurde sie abgenommen und die Fluoreszenz der Nanotiterplatte vermessen (Abb.5.118). Entsprechend diesem Ansatz wurde schon vor Beginn der Doktorarbeit ein Patent von der Firma EMC microcollections GmbH, Tübingen, angemeldet <sup>[366;367]</sup>.

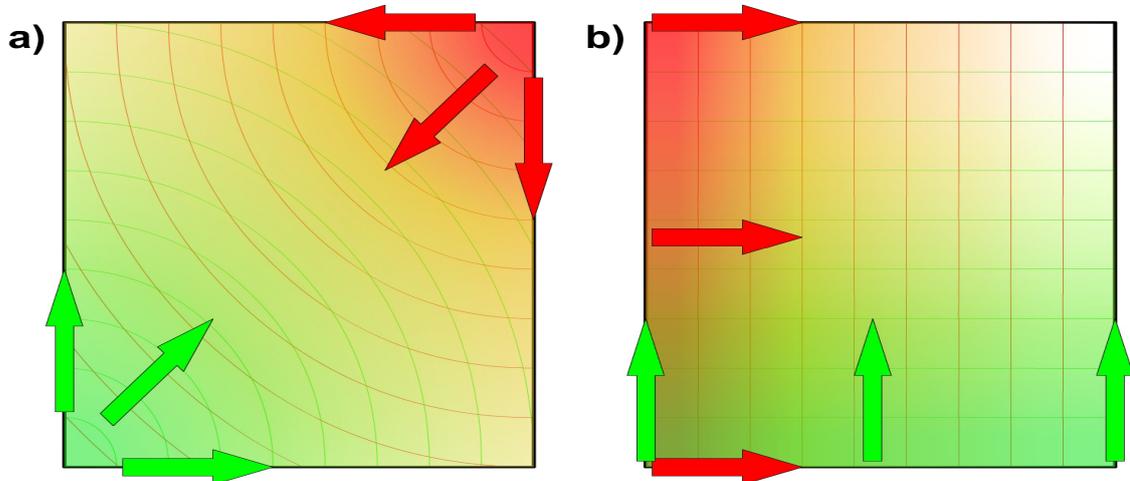


**Abb.5.118: Patent zur Gradientenerzeugung durch Diffusion (Quelle R. Brock)**

Der Gradient wird über eine Diffusionsmatrix hergestellt, indem an den gegenüberliegenden Ecken jeweils eine Punktquelle einer Verbindung erzeugt wird (jeweils links unten und rechts oben in der Diffusionsmatrix). Der Patententwurf (links) wurde am Beispiel von Fluorescein und Rhodamin wurde die Machbarkeit an einer Nanotiterplatte gezeigt (rechts).

Dieser Vorversuch zeigte schon die Durchführbarkeit, allerdings ist die Berechnung eines Gradienten, der aus zwei Punktquellen erzeugt wurde, recht aufwändig. Ein Punkt innerhalb eines zweidimensionalen Gradienten kann entweder durch die Konzentrationen der einzelnen Komponenten  $c_A$  und  $c_B$  oder durch das Teilverhältnis  $\alpha = c_A / (c_A + c_B)$  und die Gesamtkonzentration  $c_{A+B}$  charakterisiert werden. Wird der Gradient über zwei Punktquellen A und B erzeugt, so ist es nicht möglich alle  $\alpha$  und  $c_{A+B}$  (Abb.5.119a) zu erzeugen.

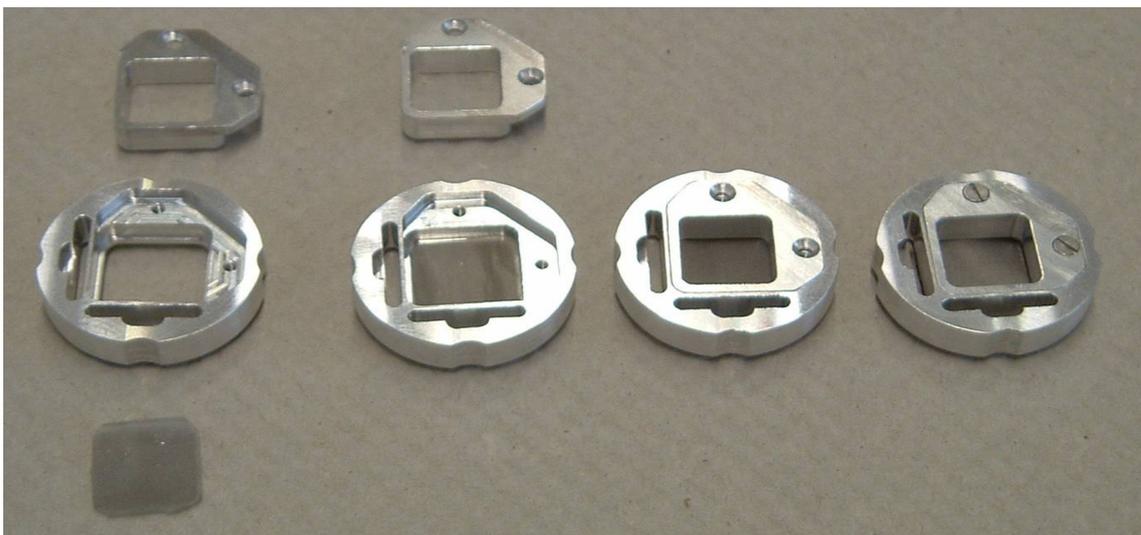
Verwendet man allerdings zwei ausgedehnte „lineare“ Quellen, die senkrecht zueinander angeordnet sind, so kann jede Kombination an  $\alpha$  und  $c_{A+B}$  (Abb.5.119b) erreicht werden.



**Abb.5.119: Schematische Darstellung des Gradienten bei unterschiedlichen Quellen**

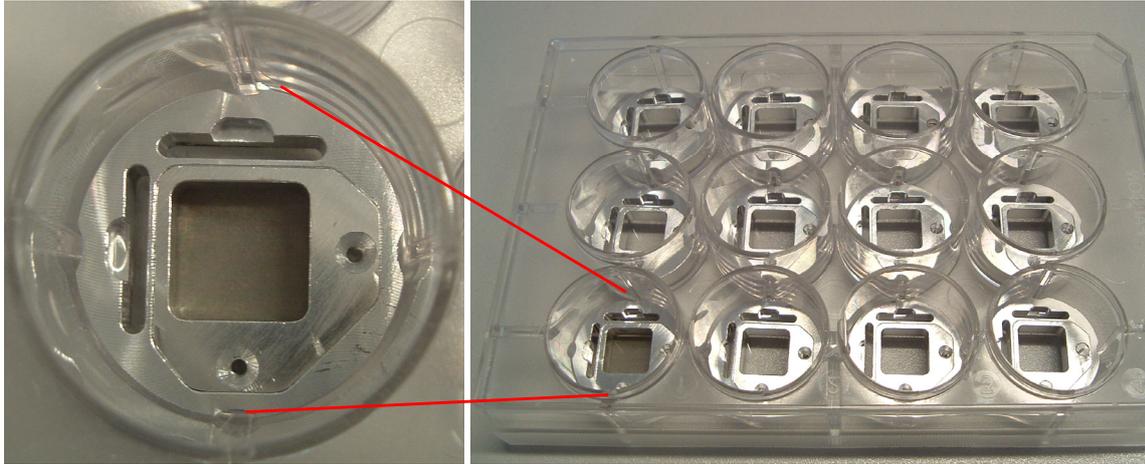
Die Verwendung von Punktquellen (a) ergibt einen Gradienten aus kreisförmigen Konzentrationshöhenlinien. Dabei ist eine Hälfte des Gradienten spiegelsymmetrisch zur anderen. Ausgedehnte „lineare“ Quellen, die im rechten Winkel zueinander angeordnet sind, erzeugen einen Gradienten, dessen einzelne Konzentrationshöhenlinien sich senkrecht schneiden (b).

Daher wurde eine Diffusionsvorrichtung entworfen, die über zwei „lineare“ Quellen verfügt, die rechtwinklig zueinander angeordnet sind. Die Vorrichtung ist passgenau für ein Well einer 12-Well-Platte (Abb.5.121) und besitzt im Inneren eine freie Fläche, über die der Gradient zugänglich ist. Mit einem „Deckel“ kann ein Siebdrucknetz in die Vorrichtung eingespannt werden (Abb.5.120). Dieses Netz ist für den unter Kapitel 4.4.4.2 beschriebenen Siebdruck-ELISA essentiell.



**Abb.5.120: Zusammenbau einer Diffusionsvorrichtung**

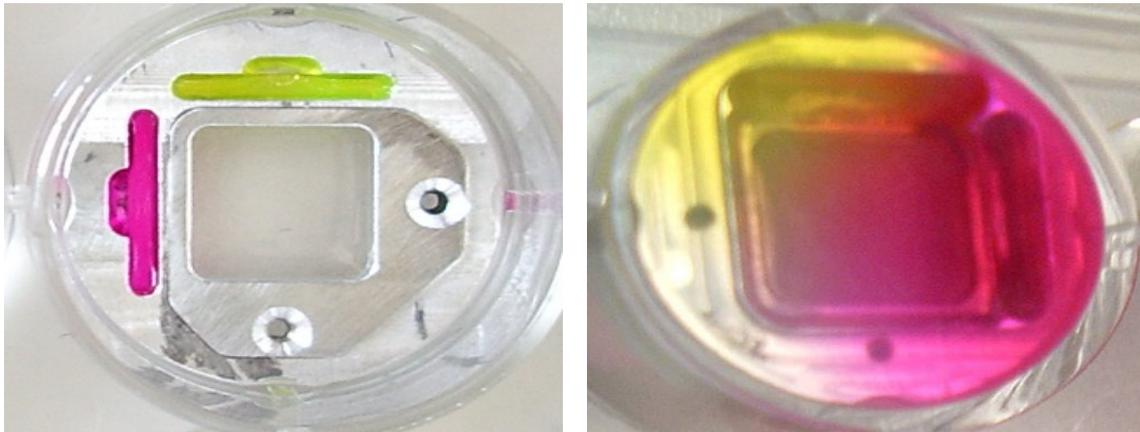
Die Diffusionsvorrichtung besteht aus einem Deckel, der Vorrichtung und einem Siebdrucknetz (links). Nachdem das Sieb eingelegt wurde (mitte) wird der Deckel eingesetzt (c) und verschraubt (rechts), wodurch das Siebdrucknetz fixiert ist.



**Abb.5.121: Diffusionsvorrichtungen in einer 12-Well-Platte**

Durch die Anpassung der Diffusionsvorrichtung an eine 12-Well-Platte sind parallele Versuchsdurchführungen möglich.

Die 12-Well-Platte wurde mit Diffusionsmatrix (Agarose oder Gelatine) vorbefüllt und die Vorrichtungen eingesetzt. Über die beiden Zugabeschlitze wurde jeweils die Lösung einer Verbindung zugegeben, die dann in die Diffusionsmatrix einsickerte und den Gradienten aufbaute (Abb.5.122).

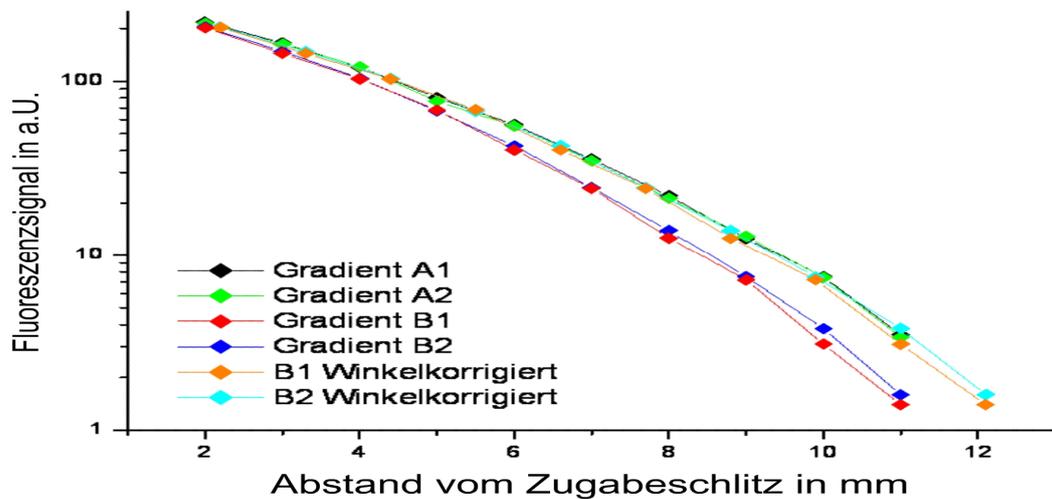


**Abb.5.122: Aufbau des Gradienten**

In die beiden Schlitze wurden Rhodamin- und Fluorescein-Lösung zugegeben (a). Nach 16 Stunden bei Raumtemperatur (b) zeigte sich schon sehr deutlich der zwei-dimensionale Gradient. Je nach verwendeten Diffusionsverbindungen wurden unterschiedlich lange Diffusionszeiten gewählt. Der Gradient wurde mittels Fluoreszenz ermittelt.

Für die Erfassung des Gradienten wurde die 12-Well-Platte in eine Halterung eingespannt und der Gradient durch den Boden der Platte hindurch vermessen. Hierdurch ergaben sich Vorzugsrichtungen für die Datenerfassung in Richtung der x- und y-Bewegung des Mikroskoptisches. Ist eine Diffusionsvorrichtung gegenüber der anderen „verdreht“, so entstehen augenscheinlich zwei unterschiedliche Gradienten (Abb.5.123). Entsprechend Kapitel 5.1.8 konnte auch

hier wieder über die Position der Schraublöcher in der Diffusionsvorrichtung eine Allokation durchgeführt werden. Berücksichtigt man diesen Drehwinkel ergaben sich nahezu identische Gradienten.



**Abb.5.123: Vermessung von Gradienten**

Mit zwei Diffusionsvorrichtungen wurde ein Gradient (x-Richtung) in 2% Agarose für 8 h aufgebaut und dieser für 2 verschiedenen y-Positionen vermessen. Es zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit innerhalb einer Vorrichtung. Wurde die „Verdrehung“ einer Vorrichtung gegenüber der anderen mittels einer Allokation berücksichtigt, ergaben sich nahezu identische Gradienten.

Deutlich einfacher ist jedoch die Verwendung einer Einsetzhalterung\* (Abb.5.124) mit der die Diffusionsvorrichtungen definiert in die 12-Well-Platte eingesetzt werden.

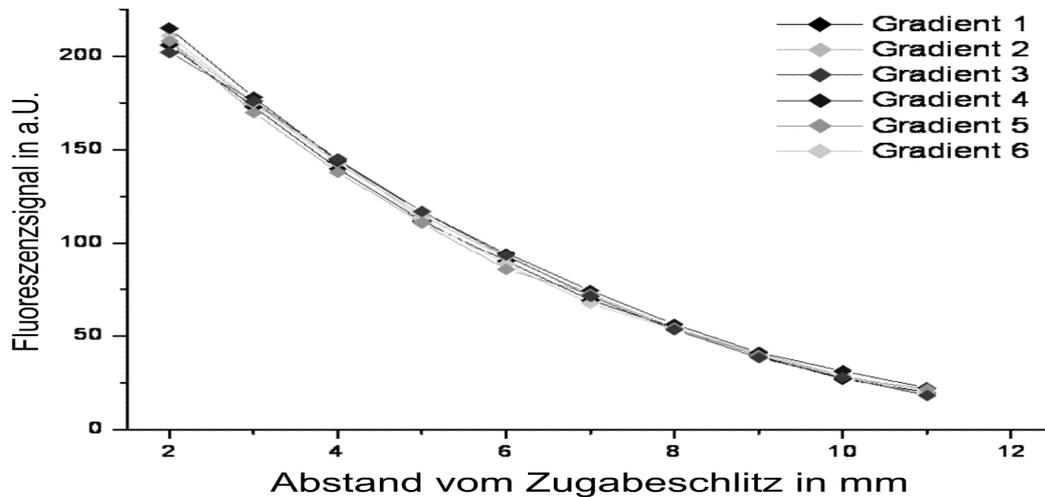


**Abb.5.124: Einsetzvorrichtung für die Diffusionsvorrichtungen**

Erste Pläne von Alexander Ganser zur parallelen Ausrichtung und einem Einsetzen auf gleicher Höhe aller Diffusionsvorrichtungen wurden modifiziert, um zusätzlich eine automatische Zentrierung der Diffusionsvorrichtungen zu erhalten (links). Hierdurch konnten die Diffusionsvorrichtungen reproduzierbar genau eingesetzt werden und nahezu identische Gradienten wurden erzeugt (rechts).

\* Grundidee von Alexander Ganser (Arbeitskreis Priv. Doz. Brock, Tübingen)

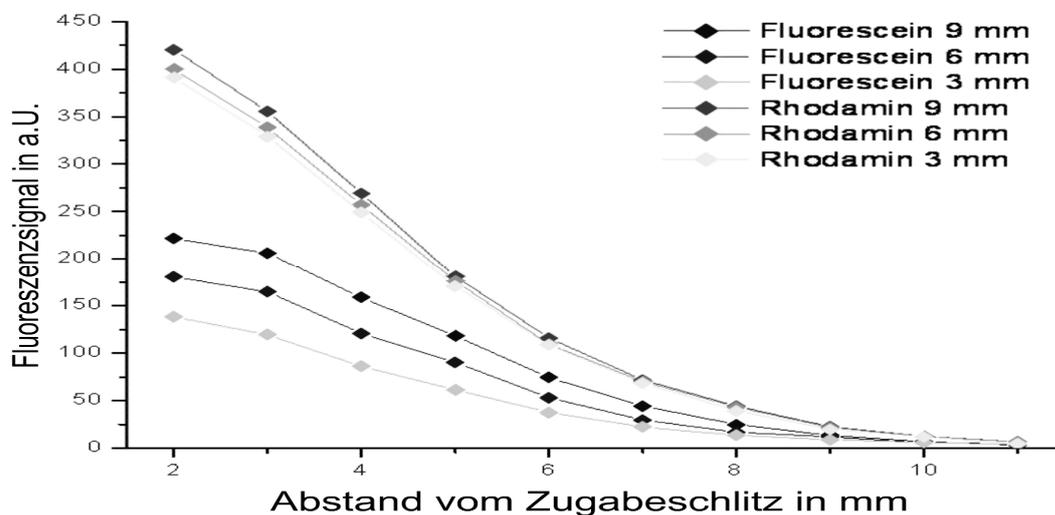
Mit dieser Einsetzhalterung konnten Gradienten (Abb.5.125) zwischen einzelnen Diffusionsvorrichtungen direkt miteinander verglichen werden.



**Abb.5.125: Vergleich der Fluoreszenzgradienten verschiedener Diffusionsvorrichtungen**

Es wurde jeweils mit Rhodamin ein Gradient mit 2% Agarose für 16 h in 6 Diffusionsvorrichtungen erstellt und vermessen. Durch die Einsetzvorrichtung können diese direkt miteinander verglichen werden.

Erste Versuche zeigten, dass bei der zeitgleichen Verwendung von Rhodamin und Fluorescein die Fluoreszenzgradienten, je nach Abstand zum Zugabeschlitz des jeweils anderen Fluorophors, voneinander abwichen (Abb.5.126).



**Abb.5.126: Fluoreszenzverlauf bei zeitgleicher Diffusion mit Rhodamin und Fluorescein**

In Agarose wurden je 3 Gradienten an unterschiedliche Positionen im Bezug auf den Zugabeschlitz des jeweils anderen Fluorophors gemessen (3, 6 und 9 mm Abstand). Es zeigte sich, dass die Fluorescein-Gradienten besonders deutlich voneinander abwichen.

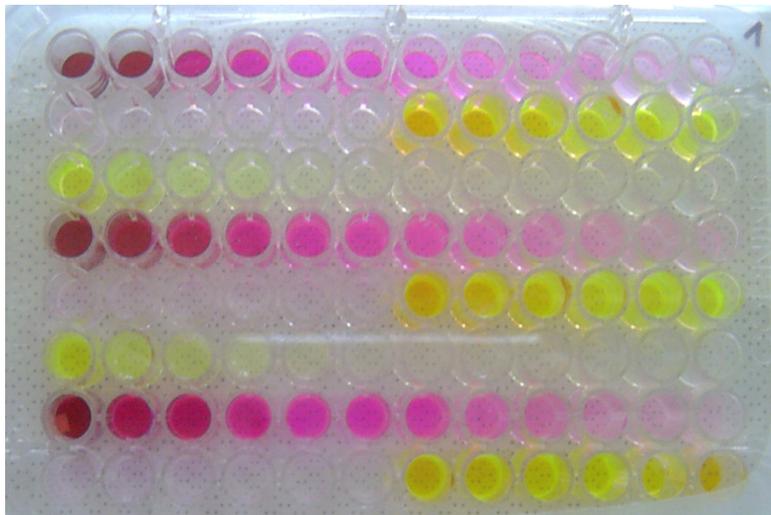
Dieses Ergebnis widersprach auf den ersten Blick der Theorie der unbeeinflussten Diffusion. Jedoch ist zu beachten, dass ein Fluoreszenzsignal nur bedingt der „wahren“ Konzentration entspricht.

## 5.2.2 Kalibrierung der Fluoreszenz zur Konzentration

Zur Quantifizierung der Konzentrationen im Gradienten anhand der Fluoreszenz und zur Bestimmung von Diffusionskonstanten innerhalb der Diffusionsmatrizen wurde eine Kalibrierung\* vorgenommen.

### 5.2.2.1 Kalibrierung der Konzentrationen einzelner Fluorophore

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Fluoreszenz durch die Diffusionsmatrix wurden je 100 µl der Diffusionsmatrix in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und fluorophorhaltige Lösungen hinzugegeben. Nach 48 h war die Matrix homogen mit dem Fluorophor durchtränkt (Abb.5.127) und wurde entsprechend Kapitel 4.4.5 vermessen.



**Abb.5.127: Konzentrationsreihe zur Erfassung der Fluoreszenz**

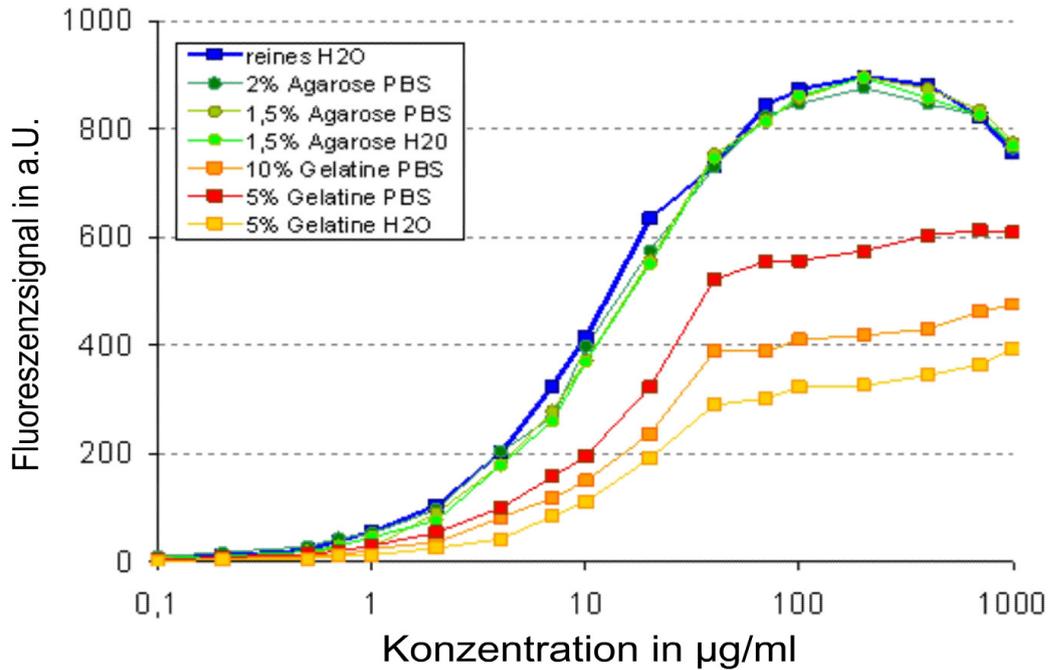
Fluorescein und Rhodamin wurden auf verschiedene Diffusionsmatrizen pipettiert, für 48 h inkubiert und die Fluoreszenz vermessen.

Die Fluoreszenz der Konzentrationsreihe mit Fluorescein (Abb.5.128) und Rhodamin (Abb.5.129) wies mit Agarose, unabhängig von der Agarosekonzentration und unterschiedlichen Puffern, eine hohe Reproduzierbarkeit auf und war nahezu identisch zu den in Wasser gelösten Fluorophoren.

Die Fluoreszenz der Konzentrationsreihe mit Fluorescein (Abb.5.128) und Rhodamin (Abb.5.129) wies mit Gelatine jedoch abhängig von der Agarosekonzentration und unterschiedlichen Puffern, deutliche Unterschiede zu dem in Wasser gelösten Fluorophor auf.

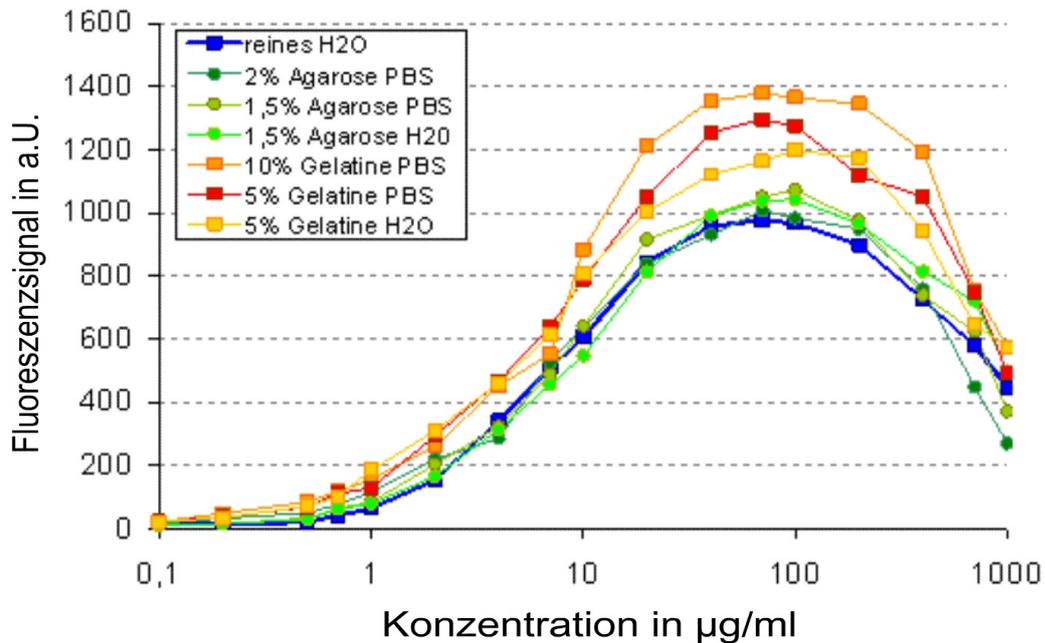
---

\* Mitarbeit und unabhängige Zweitkalibrierung zu Vergleichszwecken von Alexander Ganser (Arbeitskreis Priv. Doz. Brock, Tübingen)



**Abb.5.128: Konzentrationskalibrierung von Fluorescein in unterschiedlichen Medien**

Die Intensität einer Fluorescein-Konzentrationsreihe in verschiedenen Diffusionsmatrizen wurde aufgenommen. Agarose zeigte einen Intensitätsverlauf entsprechend des in Wasser gelösten Fluoresceins. Gelatine erzeugte dagegen ein deutlich abweichendes schwächeres Signal.



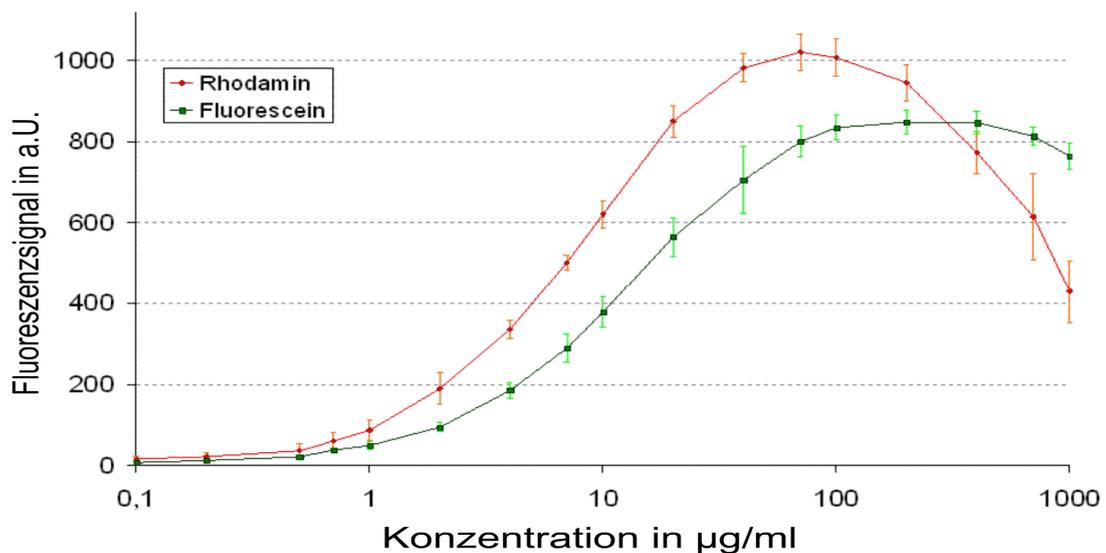
**Abb.5.129: Konzentrationskalibrierung von Rhodamin in unterschiedlichen Medien**

Die Intensität einer Rhodaminkonzentrationsreihe in verschiedenen Diffusionsmatrizen wurde aufgenommen. Agarose zeigte einen Intensitätsverlauf ähnlich zu in Wasser gelöstem Rhodamin. Gelatine erzeugte dagegen ein deutlich abweichendes und vor allem höheres Signal.

Beide Fluorophore zeigten unabhängig vom Medium für hohe Konzentrationen ein deutliches Quenching, das besonders stark bei Rhodamin zum Tragen kam. Beispielsweise lieferte die Konzentrationen von 10 µg/ml und 700 µg/ml Rhodamin in Wasser ein nahezu identisches Signal.

Besonders bemerkenswert war die Abschwächung des Fluoresceinsignals und die Verstärkung des Rhodaminsignals in Gelatine im Vergleich zur wässrigen Lösung der Fluorophore. Mit zunehmender Gelatine- und Pufferkonzentration verstärkt sich dieser Effekt und es ist daher anzunehmen, dass Gelatine als „FRET-Partner“ für beide Fluorophore dient. Es wirkt als Akzeptor für Fluorescein und als Donor für Rhodamin.

Aufgrund der höheren Reproduzierbarkeit und der stabileren und wenig beeinflussten Fluoreszenz wurde für weitere Untersuchungen Agarose als Diffusionsmatrix eingesetzt. Für die Kalibrierung der Konzentration anhand der Fluoreszenzintensität wurden alle Messwerte gemittelt (Abb.5.130) und für alle weiteren Konzentrationsberechnungen verwendet.



**Abb.5.130: Konzentrationskalibrierung für Diffusion in Agarose**

Diese Kalibrierung wurde für die Berechnung der Konzentrationen anhand der gemessenen Fluoreszenz verwendet.

Diese Fluoreszenzkalibrierung kann damit auf jedes beliebige Fluoreszenz-Mikroskop übertragen werden, indem drei Konzentrationen des Fluorophors und ein Leerwert in wässriger Lösung vorgelegt und vermessen wurden. Das so erhaltene Fluoreszenzsignal wird, unabhängig von der Größe der Messzonen, dem Auswertungsprogramm, der Inhomogenitäten des Strahlengangs oder der

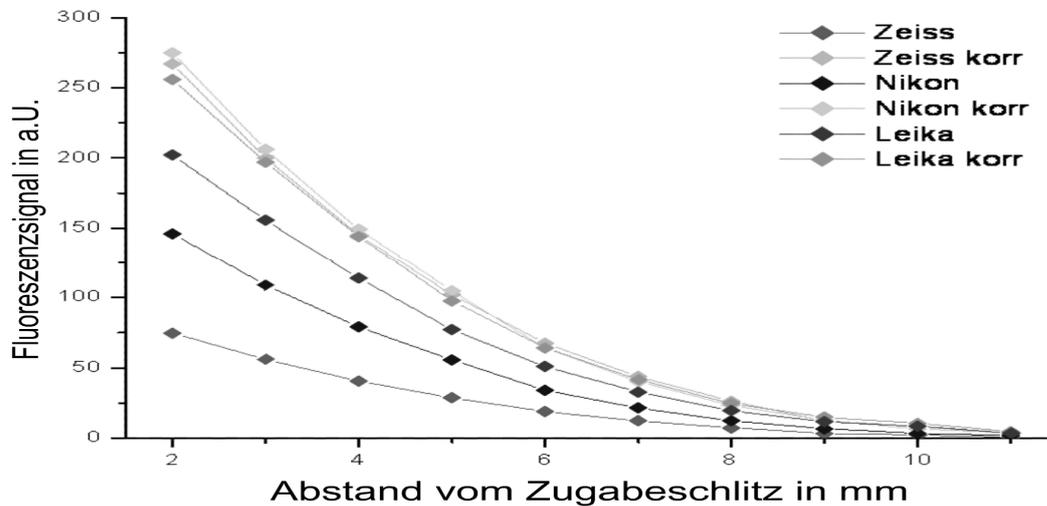
Intensität der Quecksilberdampfampe, mit einem konstanten Faktor  $\kappa$  multipliziert, so dass alle 3 Intensitäten mit der Kalibrierung übereinstimmen. Für jeden der „neuen“ Intensitätswerte wird entsprechend Abb.5.130 die zugehörige Kalibrierungsintensität entnommen und  $\kappa$  berechnet.

$$\kappa = \frac{I_{\text{Kalibrierung}} - I_{\text{Kalibrierung, Leerwert}}}{I_{\text{Messung}} - I_{\text{Messung, Leerwert}}}$$

So können alle weiteren Intensitäten berechnet werden.

$$I_{\text{berechnet}} = \kappa \cdot (I_{\text{Messung}} - I_{\text{Messung, Leerwert}}) + I_{\text{Kalibrierung, Leerwert}}$$

Anhand von 3 verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen wurde diese Kalibrierung nachgeprüft (Abb.5.131).



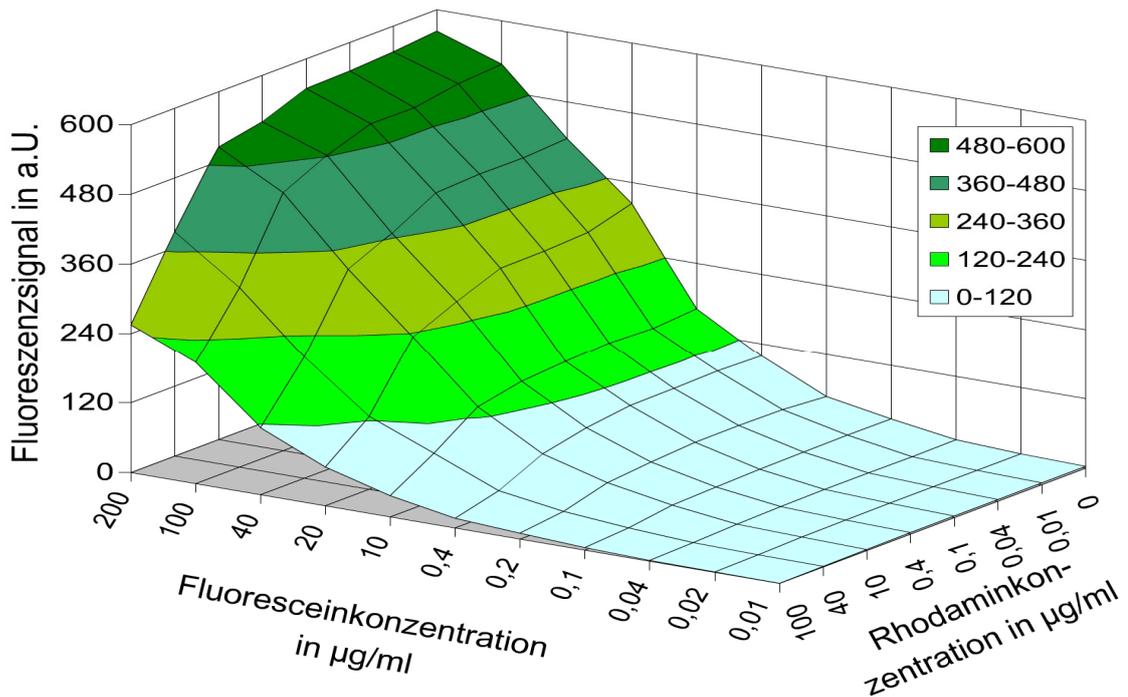
**Abb.5.131: Anwendung der Kalibrierung auf unterschiedliche Mikroskope**

Ein Leica DMI 4000B , ein Zeiss Axiovert 200 M und ein Nikon TE2000 wurden verwendet, um die Geräteunabhängigkeit der Kalibrierung anhand eines Fluorescein-Gradienten nachzuweisen. Nach Rekalibrierung der Kurven mit dem Umrechnungsfaktor (korr) sind alle ermittelten Gradienten nahezu identisch.

Somit kann an jedem Fluoreszenzmikroskop mit jedem Grafikprogramm, das die mittlere Pixelhelligkeit berechnen kann, anhand des Fluoreszenzsignals die Konzentration des Fluorophors berechnet werden.

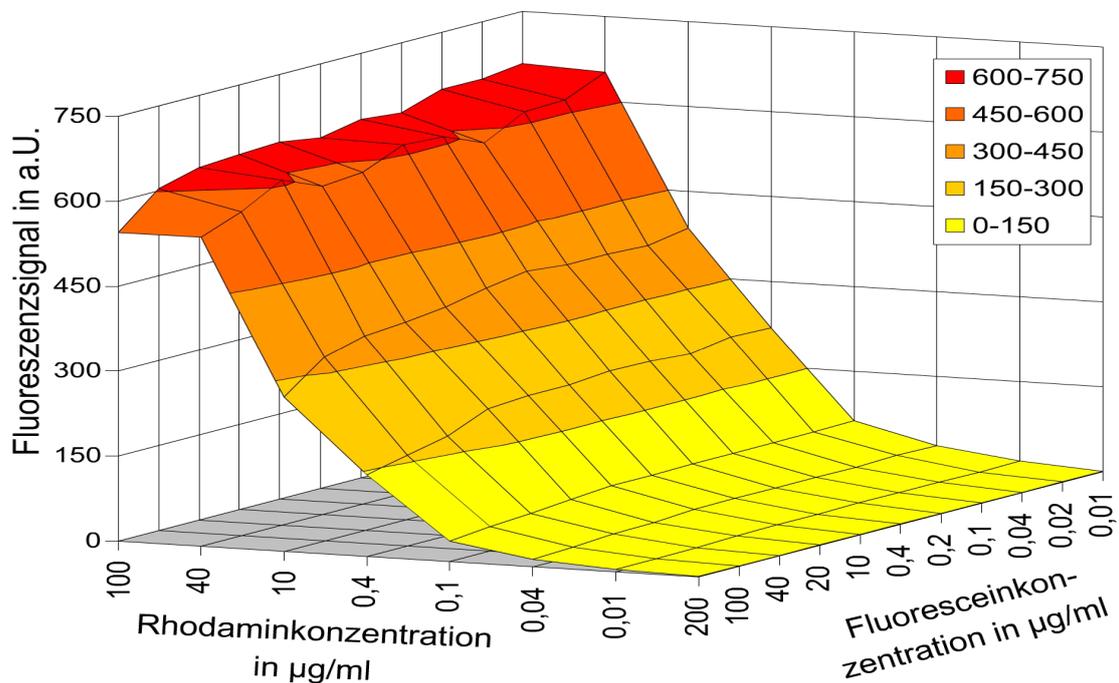
### 5.2.2.2 Parallele Kalibrierung zweier Fluorophore

Um die gegenseitige Beeinflussung zweier Fluorophore in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zu erfassen, wurden 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200  $\mu\text{l}$  Agarose befüllt und jeweils 5  $\mu\text{l}$  einer Fluorophor-Mischung aus Rhodamin und Fluorescein zugegeben. Dieser „künstliche 2D-Gradient“ wurde dann separat für den Fluoresceinkanal (Abb.5.132) und den Rhodaminkanal (Abb.5.133) ausgewertet.



**Abb.5.132: Fluoresceinsignal des „künstlich pipettierten 2D-Gradienten“**

Für verschiedene Fluorescein- und Rhodaminkonzentrationen wurde die Fluoreszenz des Fluoresceins vermessen. Die Intensität bezieht sich auf ein Pixel und eine Millisekunde Bilderfassung. Für Rhodaminkonzentrationen größer als 10 µg/ml wurde das Fluoresceinsignal deutlich gequencht.



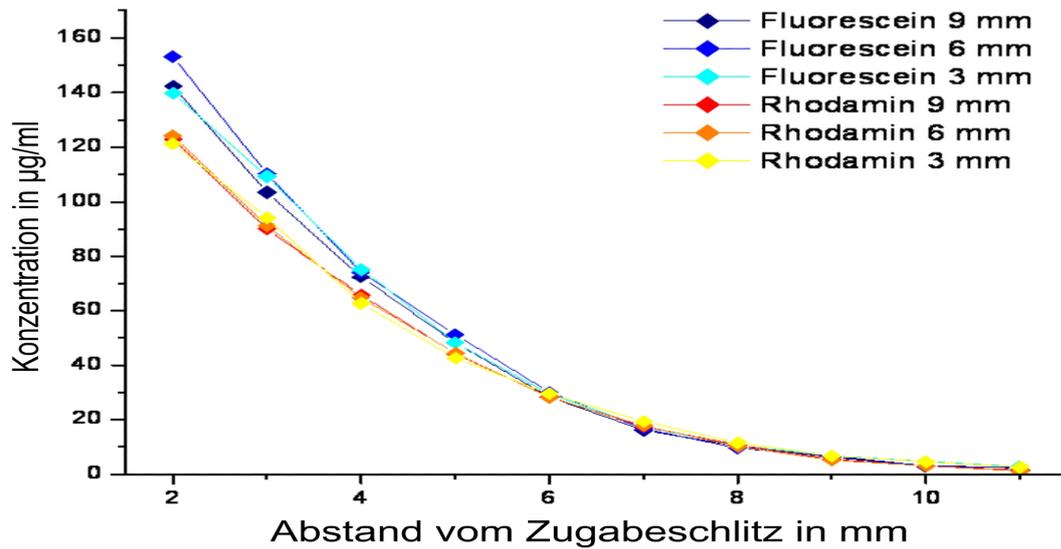
**Abb.5.133: Rhodaminsignal des „künstlich pipettierten 2D-Gradienten“**

Für verschiedene Fluorescein- und Rhodaminkonzentrationen wurde die Fluoreszenz des Rhodamins vermessen. Die Intensität bezieht sich auf ein Pixel und eine Millisekunde Bilderfassung. Nur für die höchste Fluoresceinkonzentration von 200 µg/ml wurde das Rhodaminsignal deutlich gequencht.

Die Werte zeigten, dass sich die Fluorophore in ihrer Fluoreszenz gegenseitig jeweils konzentrationsabhängig beeinflussen.

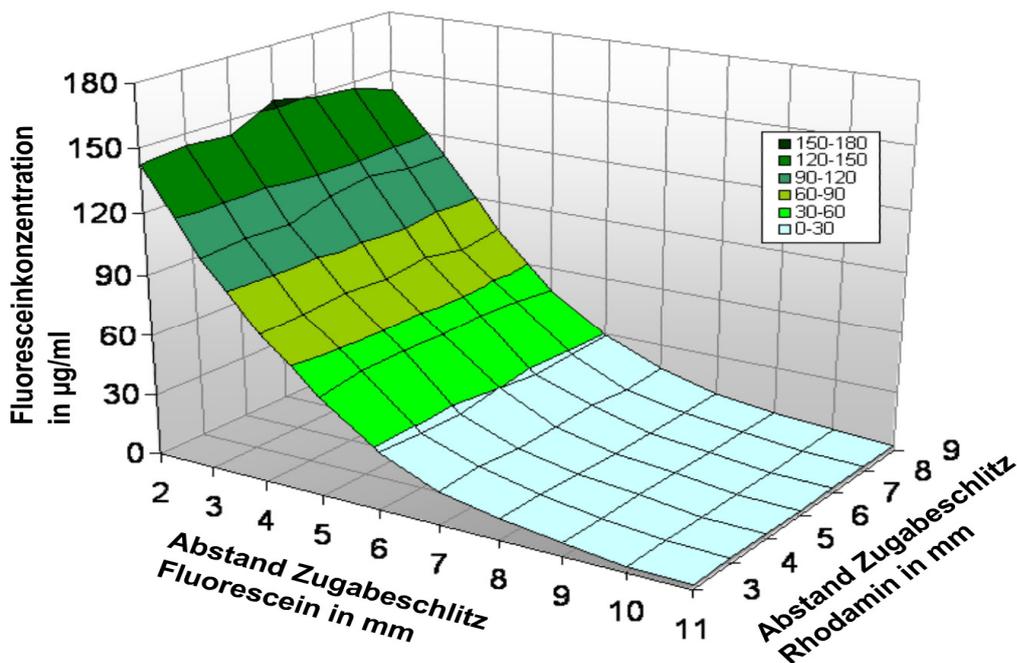
### 5.2.3 Vermessung des 2D-Diffusionsgradienten

Mit den Werten der Kalibrierung wurden die Messwerte aus Abb.5.126 in Konzentrationen umgerechnet (Abb.5.134) und ein 2D-Gradient aus Fluorescein (Abb.5.135) und Rhodamin (Abb.5.136) vermessen.



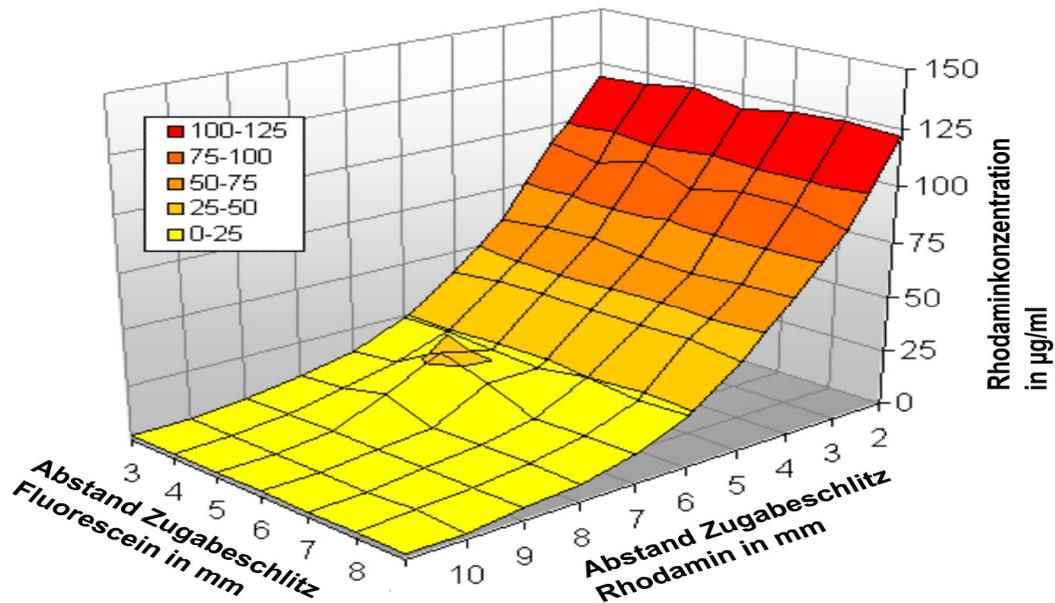
**Abb.5.134: Konzentrationsverlauf bei zeitgleicher Diffusion mit Rhodamin und Fluorescein**

Die Fluoreszenzwerte aus Abb.5.126 wurden in Konzentrationen umgerechnet. Dabei wurden sowohl das Selbstquenching und das Quenching von Fluorescein durch Rhodamin berücksichtigt. Da Fluorescein stark durch Rhodamin in seiner Fluoreszenz beeinflusst wird variieren die Konzentrationswerte stärker.



**Abb.5.135: Konzentrationsverlauf von Fluorescein in einem 2D-Gradienten**

Jeweils 400 µg Fluorescein und 400 µg Rhodamin wurden in die Zugabeschlitze appliziert und der Gradient nach 24 h vermessen.



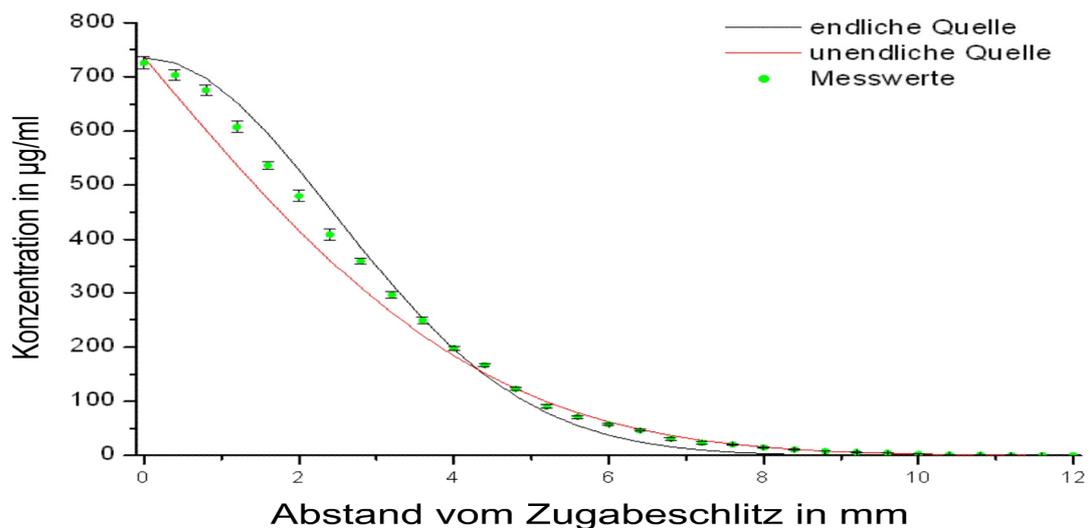
**Abb.5.136: Konzentrationsverlauf von Rhodamin in einem 2D-Gradienten**

Jeweils 200 µg Fluorescein und 200 µg Rhodamin wurden in den Zugabeschlitzen appliziert und der Gradient nach 24 h vermessen. Der kleine „Hügel“ im gelben Bereich des Gradienten ließ sich auf eine eingeschlossene Luftblase zurückführen.

Somit beeinflussen sich Fluorescein und Rhodamin nicht gegenseitig in ihrer Diffusion, auch wenn sich ihre Fluoreszenz gegenseitig stört.

### 5.2.3.1 Die Art der Quelle?

Um die zeitliche Änderung des Gradienten und damit den Konzentrationsverlauf abzuschätzen zu können, musste geklärt werden ob sich das Diffusionsprofil (Abb.5.137) entsprechend einer endlichen oder unendlichen Quelle verhält.

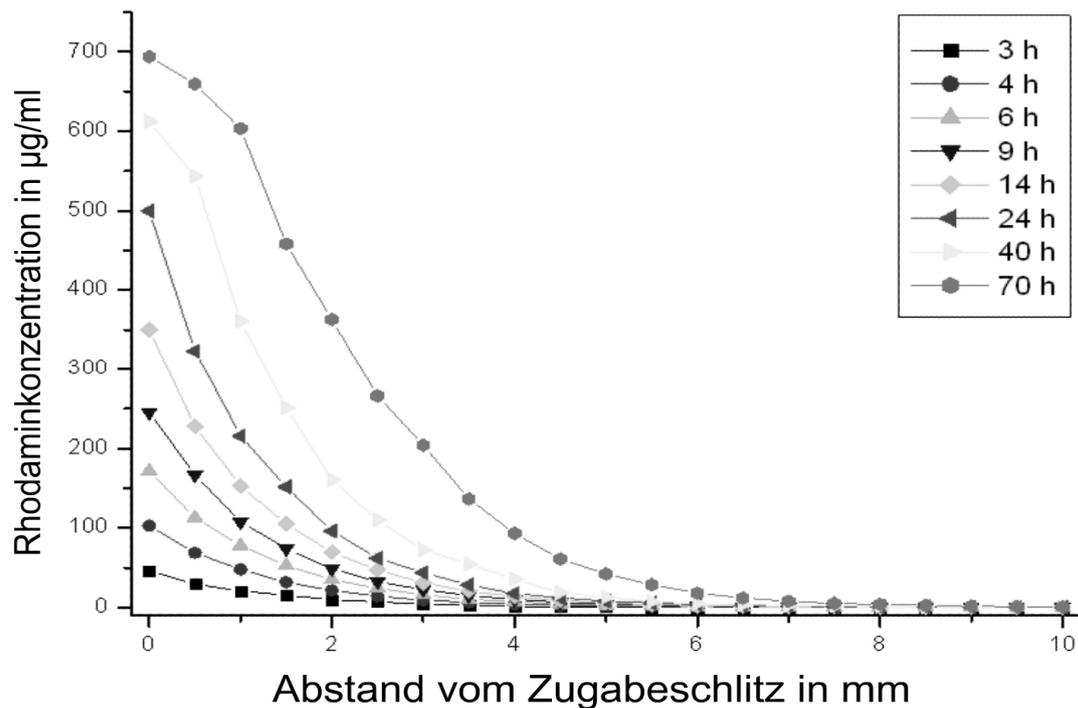


**Abb.5.137: Konzentrationsverlauf in der Diffusionsvorrichtung**

400 µg Fluorescein wurden in den Zugabeschlitz gegeben, der Gradient wurde nach 48 h vermessen und die Konzentrationen berechnet. Zusätzlich wurden die Kurven für eine endliche und eine unendliche Quelle eingezeichnet.

Eine Vielzahl von Konzentrationsgradienten verhielt sich in der Nähe der Zugabeschlitze entsprechend einer endlichen Quelle und für größere Abstände jedoch wie bei einer unendlichen Quelle.

Daher wurde der Aufbau des Gradienten zeitlich verfolgt (Abb.5.138) und es zeigte sich, dass der Gradient sich anfangs wie eine unendliche Quelle verhält und dann im Laufe der Zeit zu einer endlichen Quelle wird.



**Abb.5.138: Zeitlicher Aufbau eines Diffusionsgradienten**

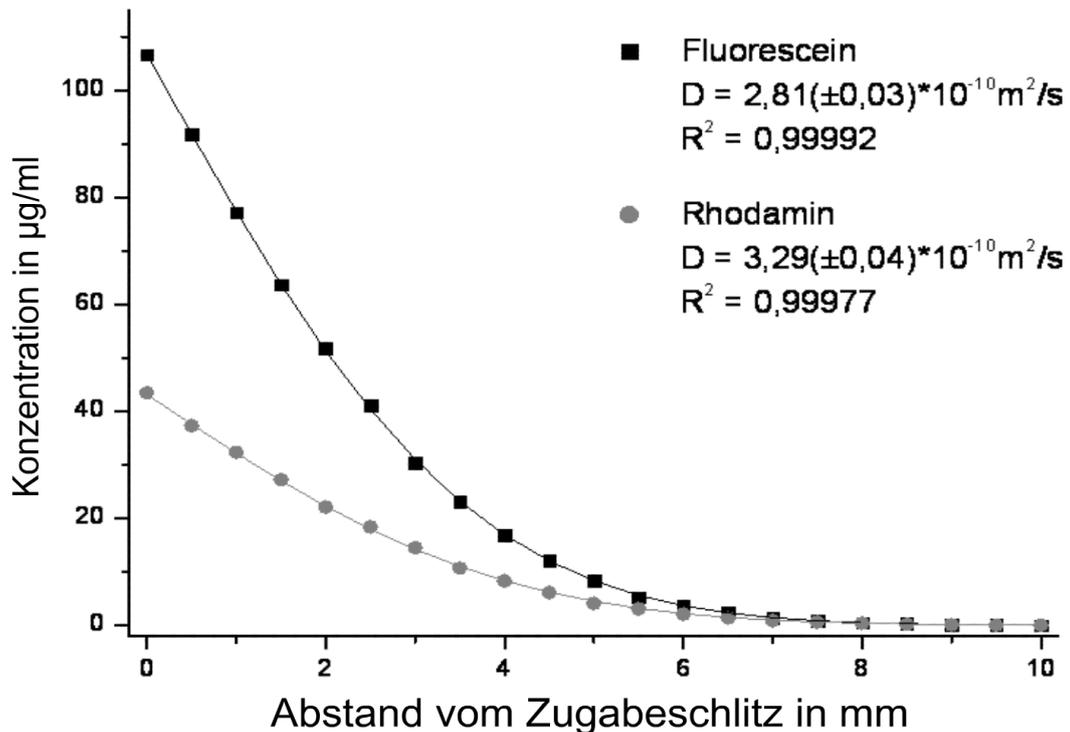
Anfänglich verhielt sich der Gradient entsprechend einer unendlichen Quelle. Nach ca. 24 h war ein Übergang zu einer endlichen Quelle zu beobachten.

Diese Beobachtung lässt sich durch die Anwendung der Diffusionsvorrichtung selbst erklären. Beim Einpipettieren in den Zugabeschlitz bildet sich anfänglich ein Gleichgewicht zwischen (Farbstoff-)Molekülen im zugegebenen Lösungsmittel und (Farbstoff-)Molekülen, die in die Diffusionsmatrix eingedrungen sind. Dieses Gleichgewicht erzeugt eine konstante Konzentration an der Oberfläche und entspricht somit einer unendlichen Quelle. Wenn sämtliche Moleküle in die Diffusionsmatrix eindiffundiert sind, beginnt dort die Konzentration zu fallen und der Zugabeschlitz ist „nur noch“ eine endliche Quelle.

Solange die Diffusionsvorrichtung sich wie eine unendliche Quelle verhält, kann sie daher dazu verwendet werden, Diffusionskonstanten zu bestimmen.

### 5.2.3.2 Bestimmung von Diffusionskonstanten

Die Konzentrationsprofile ließen erkennen, dass innerhalb der Diffusionszeiten zwischen 3 und 8 h sich die Diffusionsvorrichtung wie eine unendliche Quelle verhält. Daher wurden an etlichen Messkurven, die diesen Zeitvorgaben entsprachen, die Diffusionskonstanten von Fluorescein und Rhodamin bestimmt (Beispielhafte Vermessung eines Gradienten in Abb.5.139).



**Abb.5.139: Beispiel für eine Berechnung der Diffusionskonstanten**

Bei gegebener Diffusionszeit (hier 4 Stunden) wurde eine Errorfunktion an den Konzentrationsgradienten angefitet und hieraus die Diffusionskonstante berechnet.

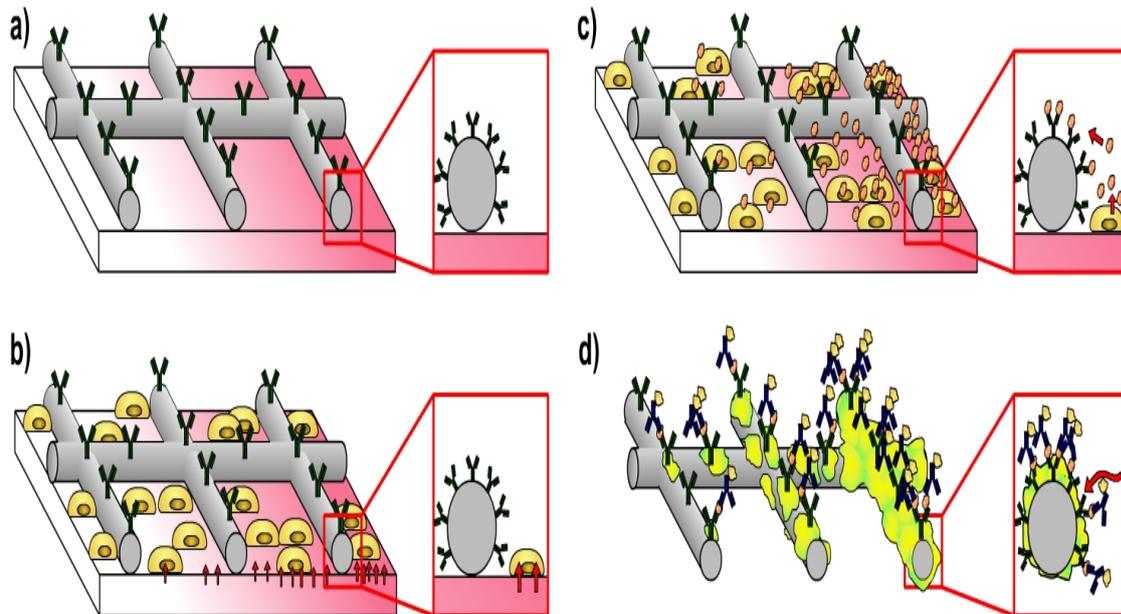
Die Kurvenanpassungen an die Messungen zeigten durchweg ein  $R^2 > 0,999$ , was für die Anwendung der Errorfunktion spricht. Über alle Messungen hinweg ergab sich:

Fluorescein	$D = 2,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
Rhodamin	$D = 3,0 \pm 0,4 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$

Diese Werte sind den Literaturwerten von  $D = 2,4 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  für Fluorescein und  $D = 2,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  <sup>[368]</sup> in Wasser ähnlich. Somit diffundieren die Farbstoffe ungehindert durch die Agarosematrix und zudem stellt die Diffusionsvorrichtung (zusätzlich zur eigentlichen Anwendung) ein effizientes Werkzeug zur Bestimmung von Diffusionskonstanten kleiner Moleküle dar.

## 5.2.4 Der Siebdruck-ELISA

Zur weiteren Anwendung (Abb.5.140) der Diffusionsvorrichtung sollten Zellen auf dem Gradienten aktiviert und diese Aktivierung nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Aktivierung wurden Siebdrucknetze verwendet, auf denen ein ELISA-Test durchgeführt wurde.



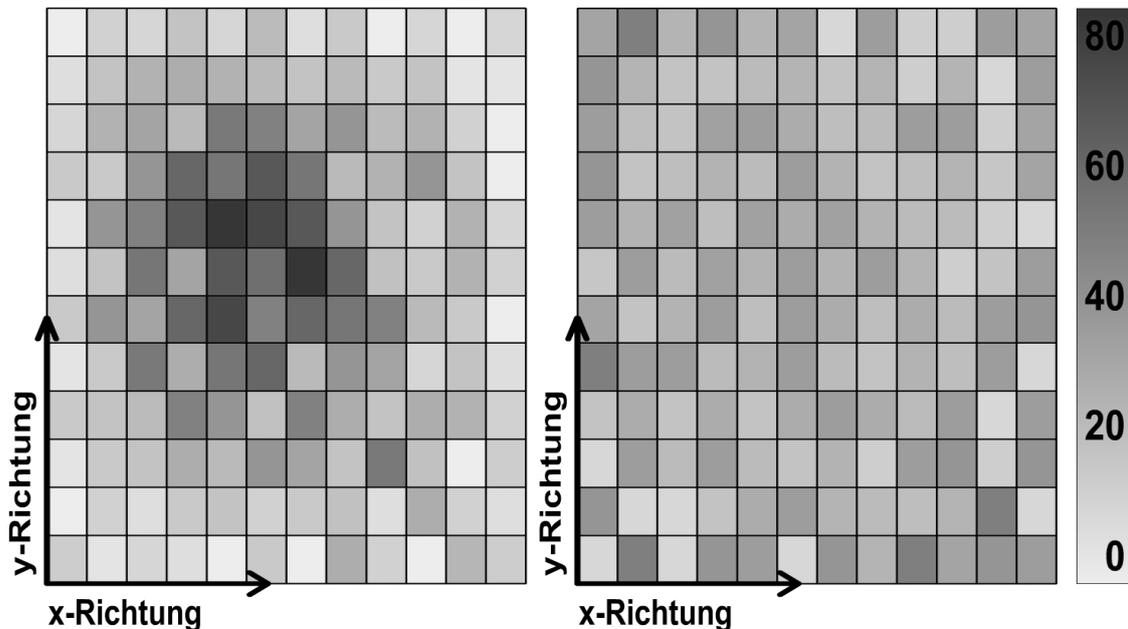
**Abb.5.140: Siebdruck-ELISA mit IL8**

Ein Siebdrucknetz (a) wird mit Antikörpern gegen IL8 beschichtet und befindet sich auf dem Gradienten. Zellen (b) werden ausgesät und nehmen die Moleküle des Gradienten auf. Reagieren die Zellen auf die Moleküle des Gradienten, schütten sie IL8 aus, das von den Antikörpern gebunden wird (c). Das Siebdrucknetz wird entnommen und es wird ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Die Detektion wird mit Antibiotin-Antikörpern gelabelter Alkalischer Phosphatase und ELF-97 als Substrat durchgeführt (d). Das entstehende Produkt ist fluoreszent und präzipitiert auf dem Netz.

Das Siebdrucknetz wird entweder direkt zusammen mit den stimulierten Zellen oder nachträglich mit Zellüberstand inkubiert. Danach wird das ausgeschüttete Antigen wie mit einem herkömmlichen ELISA nachgewiesen. Der abschließende Detektionsschritt findet mit Alkalischer Phosphatase statt, die ELF-97 umsetzt. Das entstehende Produkt präzipitiert auf der Oberfläche des Siebdrucknetzes, wodurch die orts aufgelöste Information der einzelnen Netzmaschen erhalten bleibt. Man könnte den Siebdruck-ELISA daher als hochauflösenden „Enzyme Linked Immuno Spot Assay“ (HR-ELISPOT) bezeichnen.

### 5.2.4.1 Zellverteilung

Nach Ausbildung des Gradienten wurde eine Zellsuspension in den mittleren Öffnungsbereich der Diffusionsvorrichtung pipettiert. Es zeigte sich, dass durch mehrfaches Aufziehen und Ausspülen der Zellsuspension mit einer Pipette eine gleichmäßige Verteilung (Abb.5.141) der Zellen erreicht werden konnte.



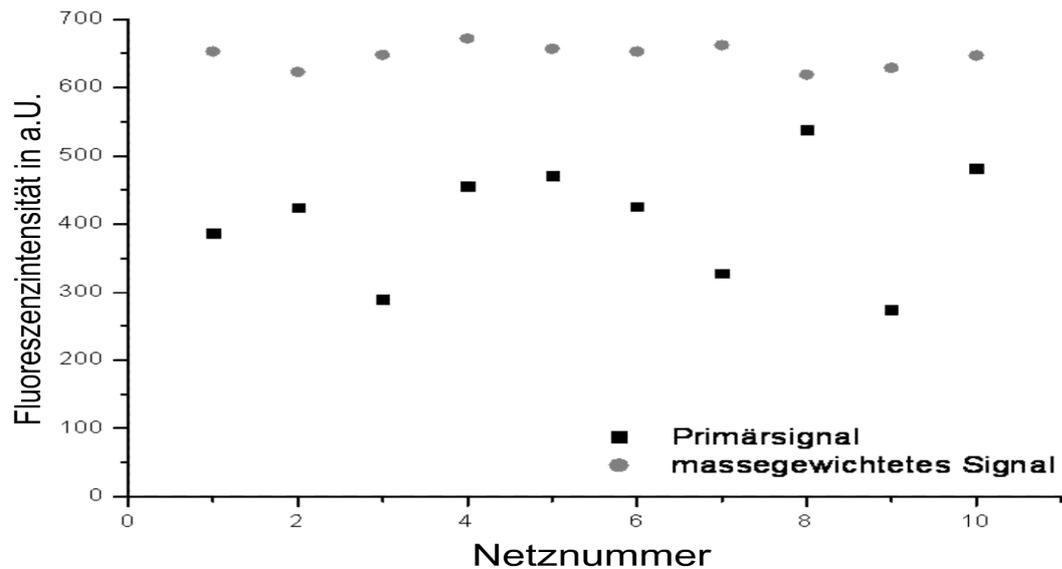
**Abb.5.141: Zellverteilung in den Maschen des Siebdrucknetzes**

Durch einfaches Einpipettieren (links) entstand eine inhomogene Zellverteilung, die hauptsächlich durch den Punkt des Einpipettierens bestimmt wurde. Durch mehrfaches Aufziehen und wieder Ausspülen der Zellsuspension konnte eine deutlich homogenere Zellverteilung (rechts) erreicht werden.

Im Randbereich der mittleren Öffnung der Diffusionsvorrichtung konnte keine homogene Zellverteilung erreicht werden. Daher wurde dieser Randbereich von ca. 1 mm Stärke bei den folgenden Messungen nicht berücksichtigt

### 5.2.4.2 Vergleich des Siebdruck-ELISAs mit einem Standard-ELISA

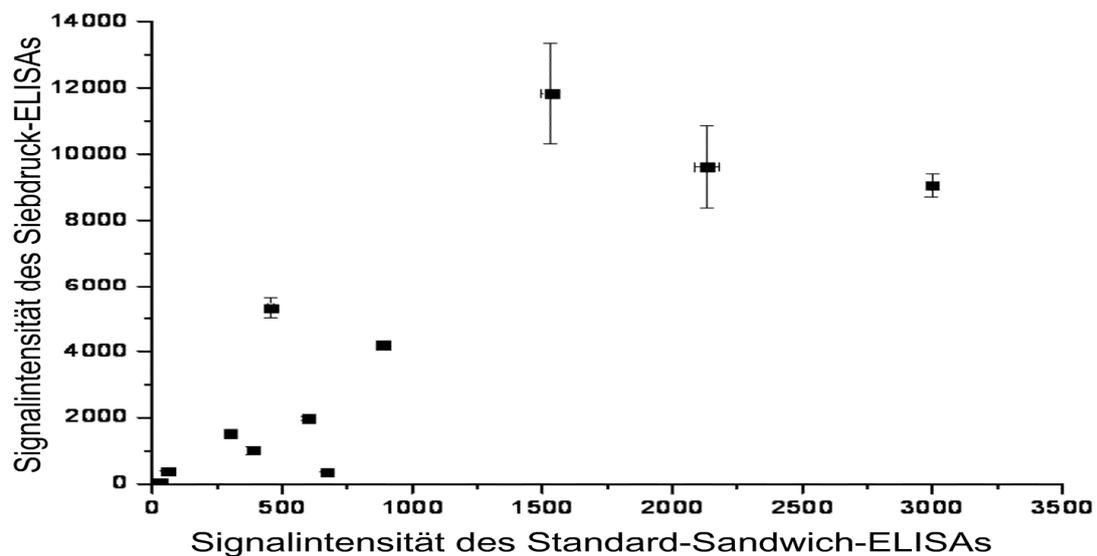
Verschiedene Siebdrucknetze wurden mit einer identischen Menge an IL8 inkubiert und ein ELISA durchgeführt, was zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führte (Abb.5.142 schwarze Quadrate). Wurde jedoch die Größe der Siebdrucknetze, die Webart, die Drahtstärke und die Maschenweite berücksichtigt und daraus das Signal für 1 cm<sup>2</sup> effektive Fläche berechnet, so ergaben sich kaum Unterschiede, wie es bei einer identischen IL8-Menge zu erwarten war (Abb.5.142 rote Kreise).



**Abb.5.142: Primärsignale und flächenkorrigierte Signale eines Siebdruck-ELISAs**

Eine IL8-haltige Probe wurde in 10 Aliquots aufgeteilt und damit ein ELISA mit 10 unterschiedlichen Siebdrucknetzen durchgeführt. Die Primärsignale (schwarz) wurden auf eine effektive Fläche von 1 mm<sup>2</sup> (rot) zurückgerechnet.

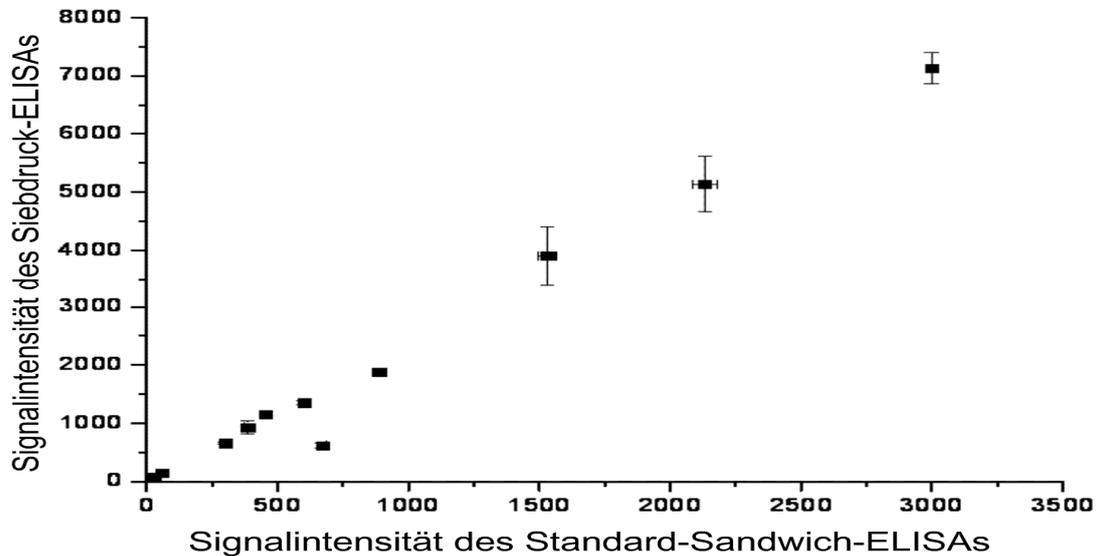
Die Flächenkorrektur zeigte, dass der Siebdruck-ELISA unabhängig von der Netzgröße und Form reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Daher wurden IL8-haltige Proben parallel mit einem Standard-IL8-ELISA in 96-Well-Mikrotiterplatten und mit einem Siebdruck-ELISA vermessen. Die Platten und die Siebdrucknetze wurden identisch behandelt. Es zeigte sich, dass mit dem Siebdruck-ELISA ein deutlich höheres Signal (Abb.5.143) generiert wurde.



**Abb.5.143: Vergleich Standard-ELISA und Siebdruck-ELISA gegen IL8**

Die Detektion erfolgte über einen Streptavidin-HRP und den Umsatz des Substrats MTB. Die einzelnen Proben wurden direkt vor dem Versuch in 2 Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit einem Standard-ELISA in einer 96-Well-Mikrotiterplatte detektiert. Das andere Aliquot wurde mit einem Siebdruck-ELISA vermessen.

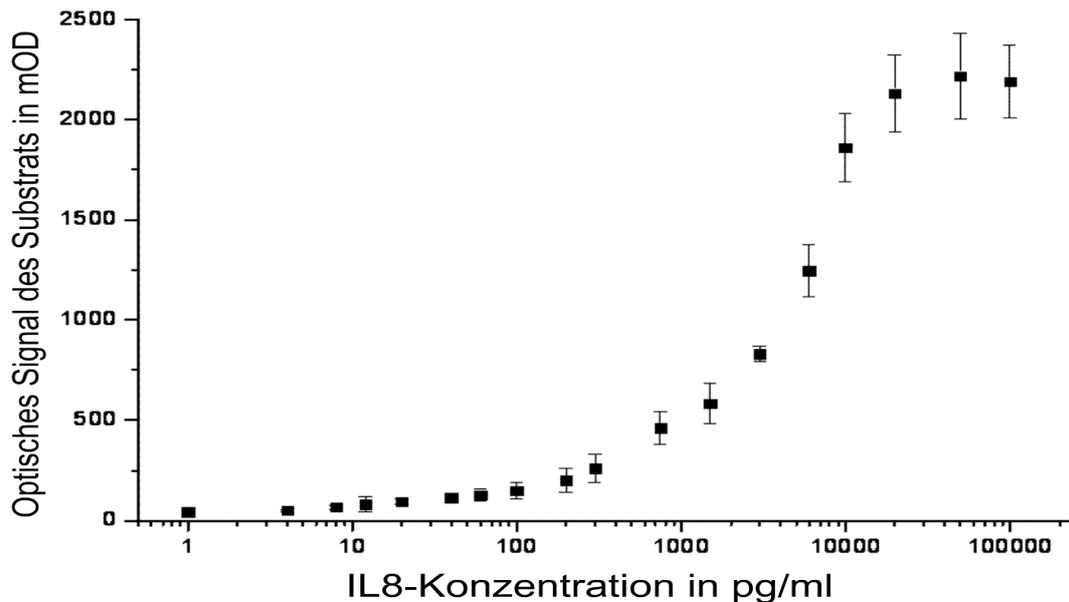
Wurde die effektive Fläche des Siebs berücksichtigt, zeigte sich, dass die Signalgenerierung von einem Siebdruck-ELISA und einem herkömmlichen Sandwich-ELISA gleich ausfällt (Abb.5.144).



**Abb.5.144: Vergleich Standard-ELISA und flächenkorrigierter Siebdruck-ELISA**

IL8-haltige Proben wurden in 6 Aliquots aufgeteilt und mit jeder ELISA-Technik eine 3-fach Bestimmung durchgeführt. Es wurde mit Streptavidin-HRP detektiert und mit MTB das Signal erzeugt.

Mit einer Konzentrationsreihe wurde die minimale Nachweisgrenze des Siebdruck-ELISAs auf ca. 10 pg/ml IL8 bestimmt (Abb.5.145).



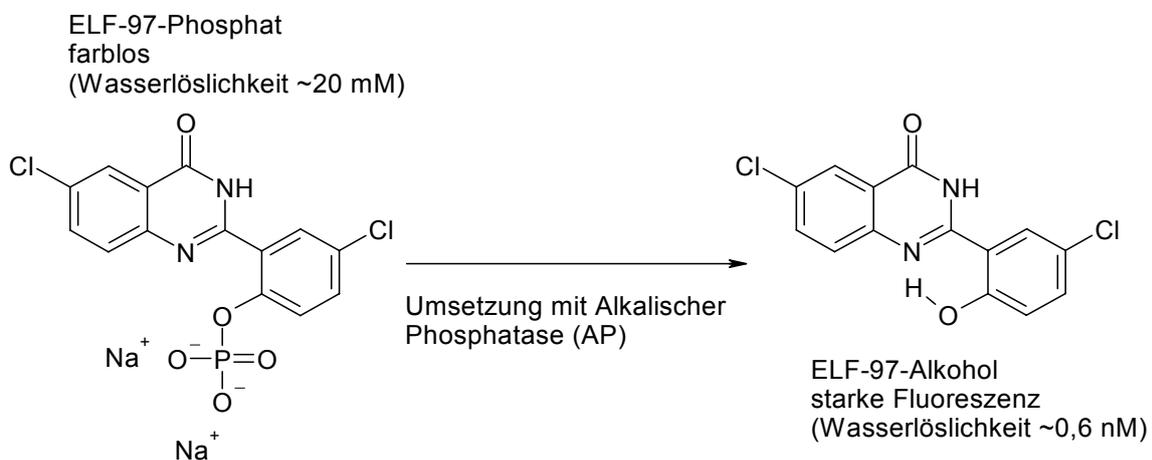
**Abb.5.145: IL8-Konzentrationsreihe mit einem Siebdruck-ELISA und HRP detektiert**

Mit bekannten IL8-Konzentrationen wurde der Siebdruck-ELISA kalibriert. Das erhaltene Signal entspricht einer effektiven Fläche von 1 cm<sup>2</sup>, was etwa 41 mm<sup>2</sup> eines Netzes mit 70 µm Drahtstärke und 150 µm Maschenweite entspricht.

### 5.2.4.3 Der orts aufgelöste Siebdruck-ELISA

Für die Vergleichbarkeit eines Siebdruck-ELISAs mit einem Sandwich-ELISA wurden bisher nur Substrate verwendet, die im umgebenden Medium löslich und mittels Extinktion messbar waren. Um jedoch dem Siebdrucknetz eine orts aufgelöste Information entnehmen zu können, muss auch die Substratumsetzung orts aufgelöst bleiben. Hierfür kommt nur eine Präzipitatbildung in Frage. Für das bisher verwendete Streptavidin-HRP war kein entsprechendes Substrat erhältlich.

Jedoch ist für Streptavidin-AP das Substrat ELF-97-Phosphat (Abb.5.146) erhältlich, das schon in in subnanomolarer Konzentration als fluoreszentes Präzipitat ausfällt.



**Abb.5.146: Enzymatische Dephosphorylierung von ELF-97-Phosphat**

Die Phosphatgruppe von ELF-97 unterbindet die Fluoreszenz des aromatischen Systems und erhöht zugleich die Wasserlöslichkeit. Nach Abspaltung des Phosphats durch Alkalische Phosphatase bildet sich eine interne Wasserstoffbrücke, wodurch die Löslichkeit drastisch reduziert wird und die Verbindung präzipitiert. Zeitgleich wird das Produkt ELF-97-Alkohol fluoreszent.

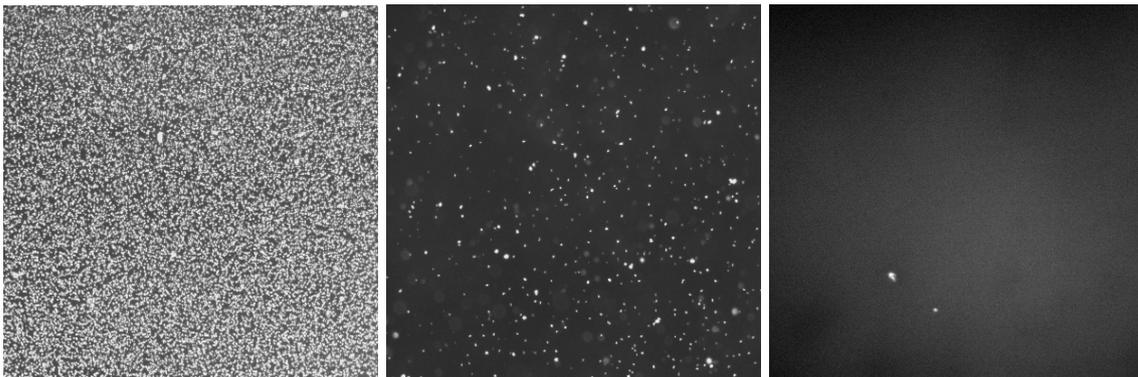
Erste Bindungstests mit Streptavidin-AP zeigten jedoch keine Fluoreszenz. Wurde ELF-97-Phosphat jedoch direkt mit Streptavidin-AP versetzt, bildeten sich sofort ca. 1 µm große, stark fluoreszente Partikel.

Parallel durchgeführte Messungen eines Sandwich-ELISAs gegen IL8 in einer 96-Well-Mikrotiterplatte zeigten ebenfalls keine Bindung, sobald Streptavidin-AP und ELF-97-Phosphat verwendet wurde.

Berücksichtigt man die Größe von Streptavidin mit 85 kD , HRP mit 60 kD und AP mit 140 kD , könnte die Anbindung von Streptavidin an das Biotin des verwendeten sekundären Anti-IL8-Antikörpers durch das im Vergleich zu HRP ungleich größere AP sterisch eingeschränkt oder unterbunden sein.

Diese Hypothese bestätigte sich durch Bindungsmessungen in 96-Well-Mikrotiterplatten, die mit unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern beschichtet wurden. Mit jedem der biotinylierten Antikörper konnte ein hohes Signal mit Streptavidin-HRP und MTB erzeugt werden.

Jedoch konnte mit keinem einzigen der verfügbaren biotinylierten Antikörper ein signifikantes Signal mit Streptavidin-AP und ELF-97-Phosphat erzeugt werden (Abb.5.147 mitte). Erst mit der Verwendung eines Antibiotin-Antikörpers, der mit AP gelabelt war, gelang eine deutliche Signalgenerierung (Abb.5.147 links).

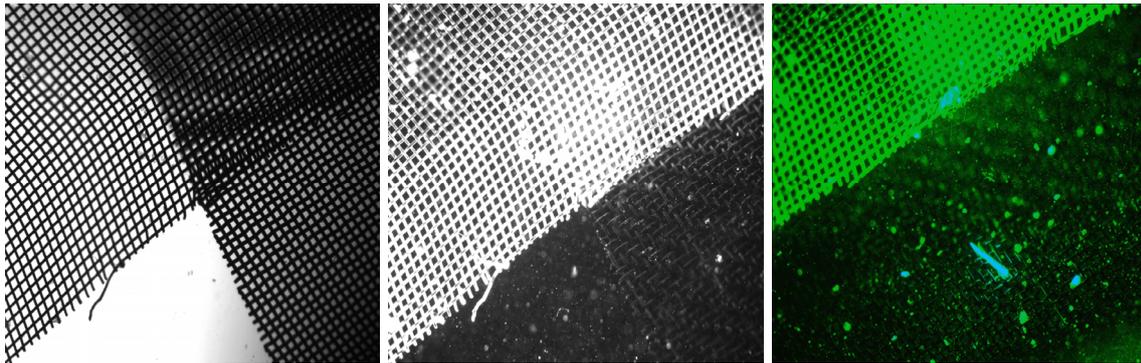


**Abb.5.147: Signalgenerierung mit ELF-97-Phosphat**

Eine Mikrotiterplatte wurde mit biotinylierten Antikörpern beschichtet. Die Inkubation mit einem AP-gelabelten Antibiotin-Antikörper erzeugte mit ELF-97-Phosphat eine homogen mit Präzipitaten bedeckte Oberfläche (links). Bei Inkubation mit Streptavidin-AP wurden kaum Präzipitate erzeugt (mitte). Wenn auf der Oberfläche kein Biotin vorhanden war, wurden keine Präzipitate erzeugt (rechts).

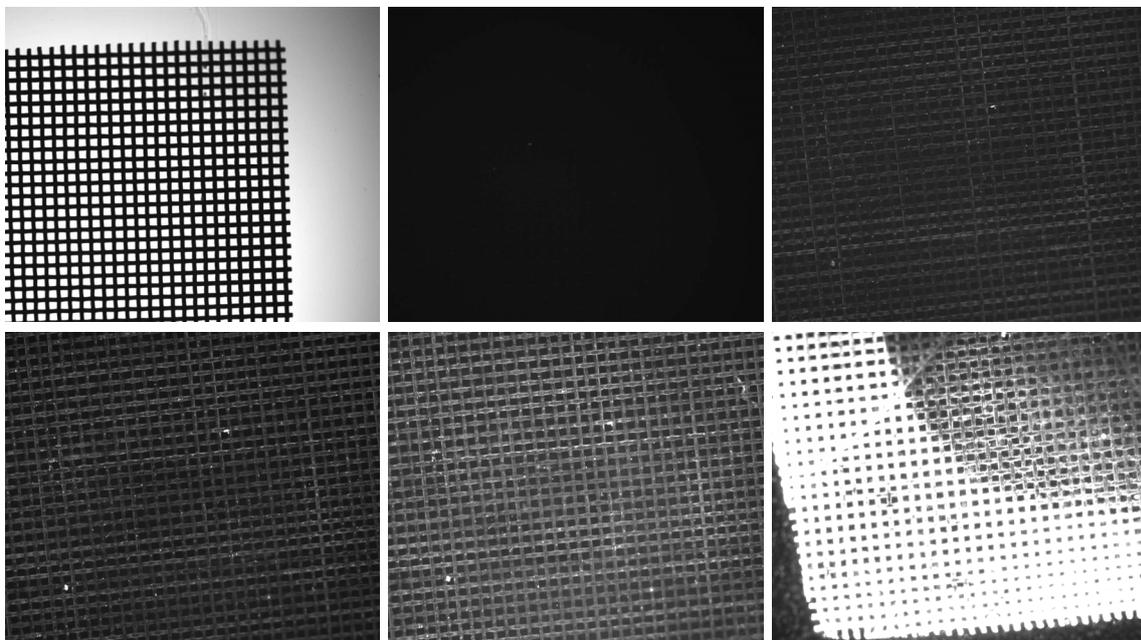
Durch Abschätzung der Fluoreszenz pro Flächeneinheit kann postuliert werden, dass der AP-gelabelte Antibiotin-Antikörper etwa 1400-fach so gut bindet wie Streptavidin-AP. Da Streptavidin eine deutlich höhere Affinität zu Biotin besitzt als ein Antikörper, kann davon ausgegangen werden, dass die Alkalische Phosphatase, die an das Streptavidin gelabelt ist, die Streptavidin-Biotin-Bindung sterisch hindert und unterbindet. Daher wurde der Siebdruck-ELISA im Folgenden nur noch mit AP-gelabelten Antibiotin-Antikörpern anstatt mit Streptavidin-AP durchgeführt.

Für erste Versuche wurden Siebdrucknetze direkt in eine IL8-haltige Lösung eingetaucht und für 90 min inkubiert. Danach wurde ein Sandwich-ELISA gegen IL8 durchgeführt. Zunächst wurde die Spezifität der Fluoreszenzfärbung getestet und die zeitliche Entwicklung der Präzipitatbildung und der Fluoreszenz untersucht. Es zeigte sich ein sehr spezifisches Signal (Abb.5.148), das durch die Gegenwart von UV-Licht während der enzymatischen Reaktion deutlich reduziert (Abb.5.149) wurde.



**Abb.5.148: Spezifität des Anti-IL8-Siebdruck-ELISA**

Ein Siebdrucknetz wurde mit 100 pg/ml IL8 inkubiert. Das andere wurde mit Zelllysat inkubiert. Danach wurden die Siebdrucknetze identisch behandelt. In der Durchlichtaufnahme (links) ist kein Unterschied festzustellen. Jedoch zeigte die Fluoreszenzaufnahme (mitte) ein starkes Signal des IL8-inkubierten Netzes. Durch Mehrkanalaufnahmen (rechts) war es zusätzlich möglich, Staubpartikel (zyanblau) von der ELF-97-Fluoreszenz (grün) zu unterscheiden.

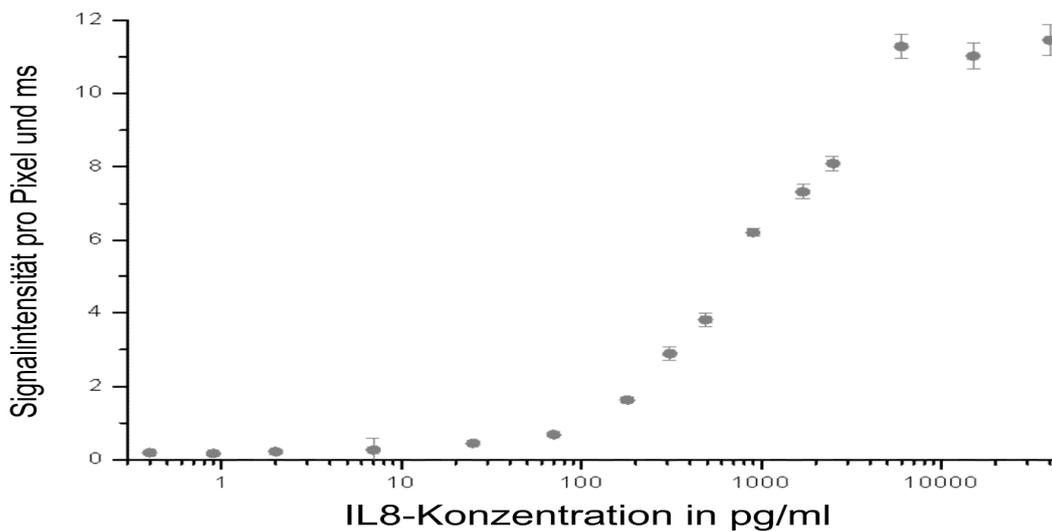


**Abb.5.149: Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz mit AP und ELF-97-Phosphat**

Das Siebdrucknetz (oben links) zeigte anfangs keine Fluoreszenz (oben Mitte). Bereits nach 30 s (oben rechts) war ein Fluoreszenzsignal zu sehen, das kontinuierlich zunahm. 90 s (unten links) und 240 s (unten Mitte). Allerdings wurde die Präzipitatbildung durch die UV-Belichtung deutlich reduziert (unten rechts). Der „dunklere“ Halbkreis wurde für die Fluoreszenzaufnahmen mit UV-Licht bestrahlt. Der „äußere“ weiße Bereich entwickelte sich unbeeinflusst von UV-Strahlung.

Es zeigte sich, dass die Entwicklung der fluoreszenten Präzipitate mit ELF-97-Phosphat stark von der Inkubationszeit und der Konzentration des IL8 abhing. Besonders hohe Konzentrationen an IL8 und damit AP beschleunigten die Präzipitatbildung dermaßen, dass bereits nach 3 min die komplette Netzoberfläche gesättigt mit Präzipitaten bedeckt war. Bei sehr geringen IL8 und damit AP Konzentrationen setzte die Präzipitatbildung erst langsam ein, da zuerst die

Löslichkeitskonzentration des ELF-97-Alkohols überschritten werden musste. Um diese Verzögerung auszuschließen, wurde die ELF-97-Phosphat-Lösung mit ELF-97-Alkohol gesättigt. Um evtl. entstandene fluoreszente Präzipitate zu entfernen, wurde direkt vor der Anwendung die Lösung mit einem 0,6 µm Filter sterilfiltriert. Nach Optimierung der Inkubations- und Waschschrte wurde die Konzentrationsreihe mit IL8 anstelle mit Streptavidin HRP (Abb.5.145) nochmals mit dem AP-gelabelten Antibiotin-Antikörper wiederholt und die Nachweisgrenze auf ebenfalls 10 pg/ml IL8 bestimmt (Abb.5.150). Durch die Handhabung und die Waschschrte der Netze war jedoch die Reproduzierbarkeit etwas schlechter als bei einem herkömmlichen Sandwich-ELISA.



**Abb.5.150: IL8-Konzentrationsreihe eines Siebdruck-ELISA mit AP und ELF-97-Phosphat**

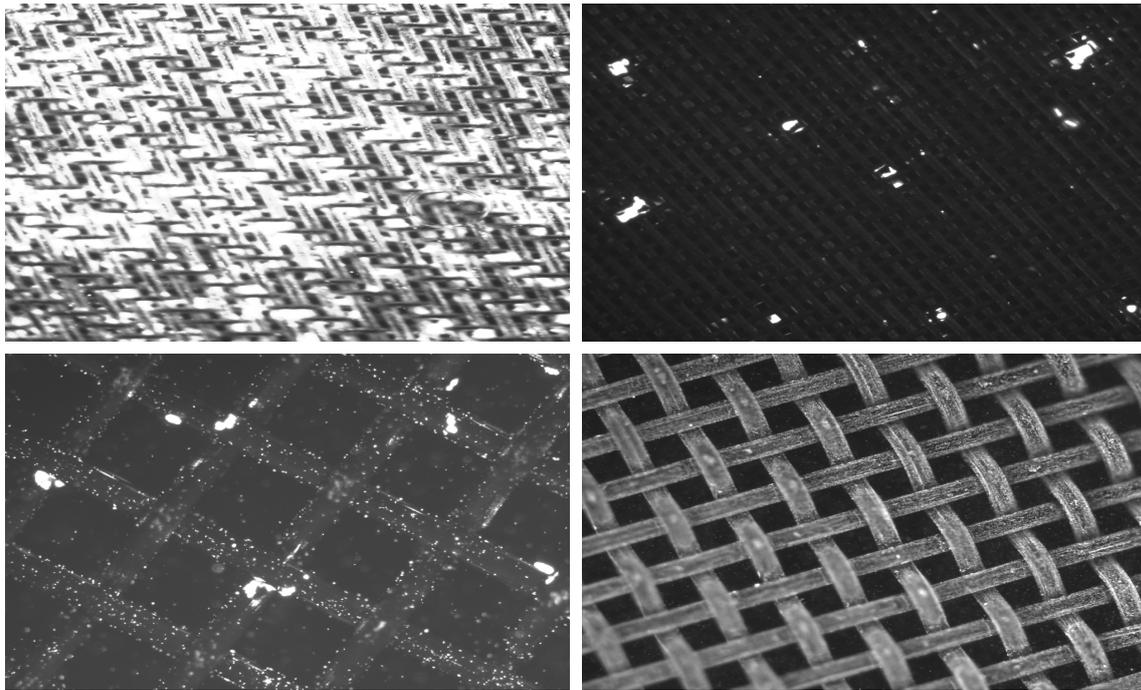
Mit bekannten IL8-Konzentrationen wurde der Siebdruck-ELISA kalibriert. Das erhaltene Signal entspricht einer effektiven Fläche von 1 cm<sup>2</sup> und einer (berechneten) Inkubation mit ELF-97-Phosphat für 5 min.

#### 5.2.4.4 Kalibrierung des Siebdruck-ELISAs in der Diffusionsvorrichtung

Die bisherigen Versuche wurden in Wells einer Mikrotiterplatte durchgeführt, um zu zeigen, dass der Siebdruck-ELISA zu einem klassischen Sandwich-ELISA vergleichbare Ergebnisse liefert.

Nun wurden entsprechend Kapitel 4.4.4 die Siebdrucknetze in Gegenwart von Agarose in einer Diffusionsvorrichtung mit IL8 in RPMI-Medium inkubiert.

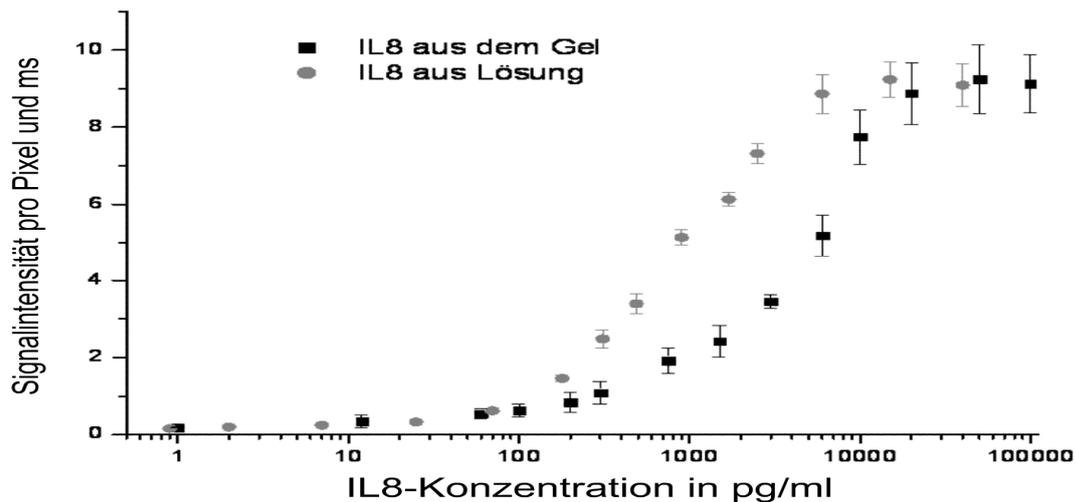
Durch den Kontakt mit der Diffusionsmatrix wurden die Siebdrucknetze mit kleinen Agarosepartikeln kontaminiert, die durch entsprechend stringentes Waschen jedoch entfernt werden konnten (Abb.5.151).



**Abb.5.151: Siebdruck-ELISA nach IL8-Inkubation in einer Diffusionsvorrichtung mit Agarose**

Ohne Waschschrte (links oben) bleiben Agarosepartikel im Siebdrucknetz hängen. Diese wird während des ELISAs mit AP kontaminiert, womit ELF-97-Alkohol an den Partikeln ausfällt. Dies zeigte sich deutlich, wenn das Netz mit BSA (rechts oben), mit 10 pg/ml IL8 (links unten) oder 250 pg/m (rechts unten) inkubiert wurde. Stringentes Waschen entfernte alle Agarosepartikel.

Es wurden zwei Konzentrationsreihen vermessen. Entweder wurde IL8-Lösung direkt in die Mittelfläche der Diffusionsvorrichtung pipettiert oder 24 h vor Beginn des Versuchs auf die Agarose pipettiert (Abb.5.152).



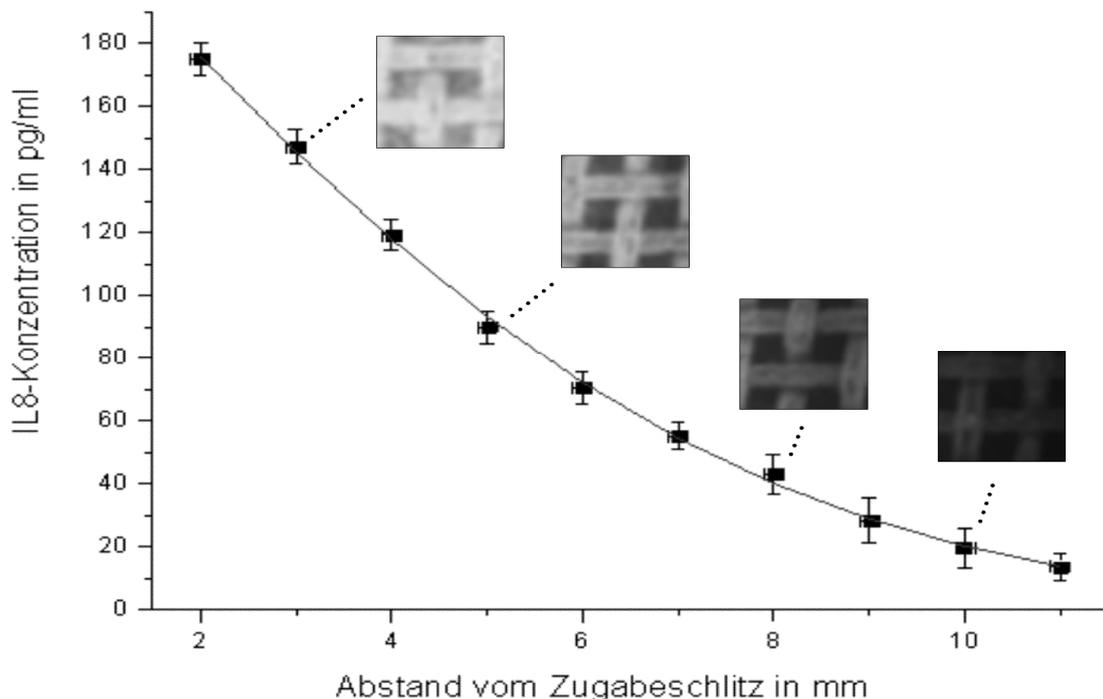
**Abb.5.152: IL8-Konzentrationsreihe eines Siebdruck-ELISA mit AP und ELF-97-Phosphat**

Alle Messungen wurden mit einer Diffusionsvorrichtung auf 2% Agarose durchgeführt. 200 µl der IL8-Lösung wurden entweder anstelle einer Zellsuspension in die Mittelfläche auf das Netz pipettiert (rot) oder 24 h vor dem Versuch auf die Agarose pipettiert und das Netz dann mit BSA-Lösung überschichtet. Das Netz wurde 4 h mit dieser Lösung inkubiert und dann ein Siebdruck-ELISA durchgeführt.

Wurde das IL8 direkt auf das Netz pipettiert, so wurden Werte entsprechend der Konzentrationsreihe (Abb.5.150) erhalten, bei der die Netze in Mikrotiterplatten inkubiert wurden.

Wurde das IL8 jedoch 24 h vor dem Versuch auf die Agarose pipettiert, so diffundierte es in diese Matrix ein. Daher fand bei der Messung eine Rückdiffusion ins Medium statt, die dementsprechend ein schwächeres aber deutlich detektierbares Signal lieferte. Somit ist es möglich, auch größere Biomoleküle in der Diffusionsvorrichtung diffundieren zu lassen und diese noch mittels eines ELISAs nachzuweisen.

Daher wurde in eine Diffusionsvorrichtung (ohne Siebdrucknetz) in einen Zugabeschlitz 10 µl einer 1 mg/ml IL8-Lösung pipettiert und für 48 h bei Raumtemperatur diffundiert. Die Diffusionsvorrichtung wurde gegen eine andere Diffusionsvorrichtung mit Siebdrucknetz ausgetauscht und 200 µl Blocklösung in die Mittelfläche gefüllt. Nach 4 h Inkubation wurde ein Siebdruck-ELISA durchgeführt und die Konzentration an IL8 vermessen (Abb.5.153). Dabei wurde die Diffusionskonstante von IL8 in 2% Agarose auf  $9,27 \pm 1,63 \cdot 10^{-11} \text{ m/s}^2$  bestimmt.



**Abb.5.153: Detektion eines IL8-Diffusionsgradienten**

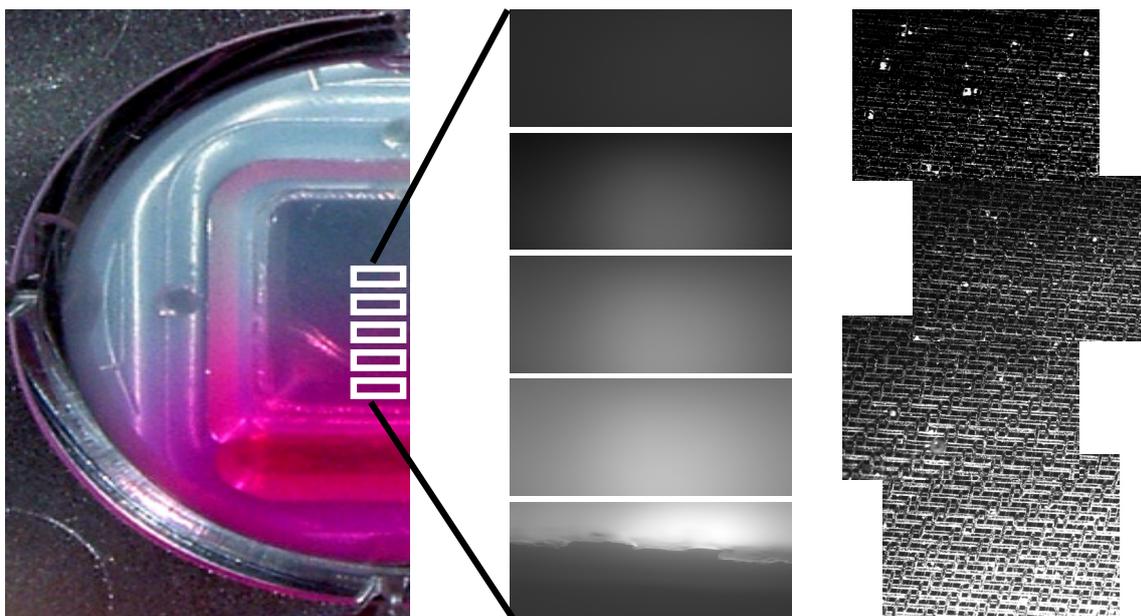
IL8 diffundiert für 48 h in einer Agarosematrix und ein Siebdrucknetz (Ausschnitt oben rechts) wurde dann für 4 h an diesem Gradienten inkubiert. Nach Durchführung eines Siebdruck-ELISAs wurde die IL8-Konzentration bestimmt und die Diffusionskonstante berechnet.

Somit wurde der erste Gradient eines diffundierten Biomoleküls quantitativ ohne die Verwendung einer Fluoreszenzmarkierung vermessen werden.

#### 5.2.4.5 Durchführung eines Aktivierungsassays mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>

Für die Aktivierung von THP1-Zellen wurde das im Teilbereich LIPODOT als Ankermolekül verwendete Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-OH verwendet. Es stimuliert diese Zellen zur Ausschüttung von IL8.

Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-OH wurde mit 5% LIPODOT-Rhodamin versetzt und lyophilisiert. Daraus wurde eine gesättigte Lösung mit PBS-Puffer hergestellt. Für alle Versuche wurden jeweils 20 µl dieser Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Lösung mit einer Diffusionsvorrichtung verwendet. Die Lösung diente einerseits zur Stimulation der Zellen, andererseits konnte die Fluoreszenz für die Ermittlung der Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Konzentration verwendet werden. Somit war es möglich die IL8-Konzentration mit dem Siebdruck-ELISA getrennt von der stimulierenden Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Konzentration zu bestimmen (Abb.5.154).

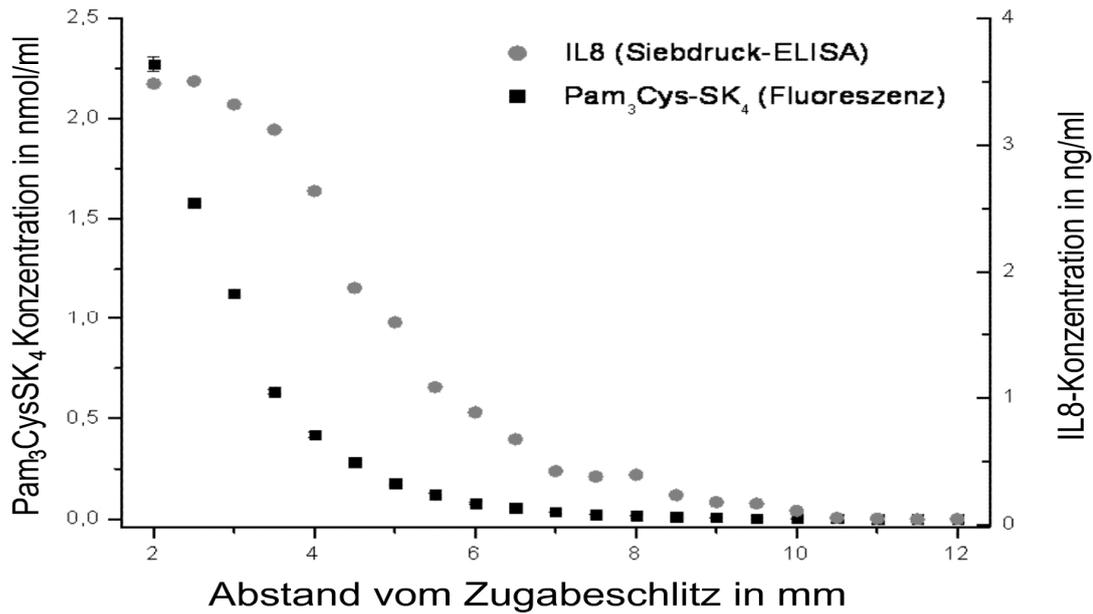


**Abb.5.154: Durchführung eines Aktivierungsassays**

Nach Einstellung des Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Gradienten (mitte) wurden die Zellen für 4 h in der Mittelfläche inkubiert (links). Danach wurde das Siebdrucknetz entnommen und ein Siebdruck-ELISA durchgeführt (rechts).

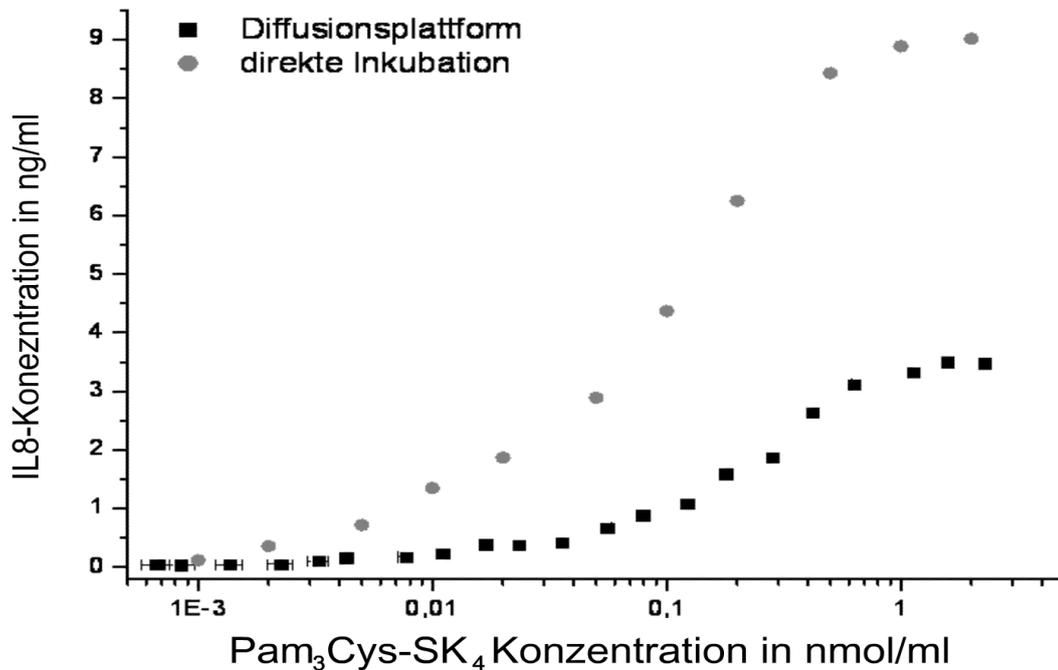
Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden zunächst entsprechend ihrer Position in der Diffusionsvorrichtung einer Konzentration zugeordnet (Abb.5.155) und dann ein Konzentrations-Wirkungsprofil (Abb.5.156 Quadrate) daraus erstellt. Zum Vergleich wurde die Wirkung in Form der IL8-Ausschüttung bei direkter Zugabe

der entsprechenden Menge an Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Konzentration separat vermessen (Abb.5.156 Kreise).



**Abb.5.155: Ortsabhängige Konzentration an IL8 und Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>**

Die IL8-Konzentration wurde mit einem Siebdruck-ELISA ermittelt. Die Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Konzentration anhand der Fluoreszenz eines beigemischten LIPODOT-Rhodamins. Die aus den Aufnahmen ermittelten Konzentrationen wurden entsprechend ihrer Position in der Diffusionsvorrichtung aufgetragen.



**Abb.5.156: Konzentrations-Wirkungsprofil von Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> auf IL8-Ausschüttung**

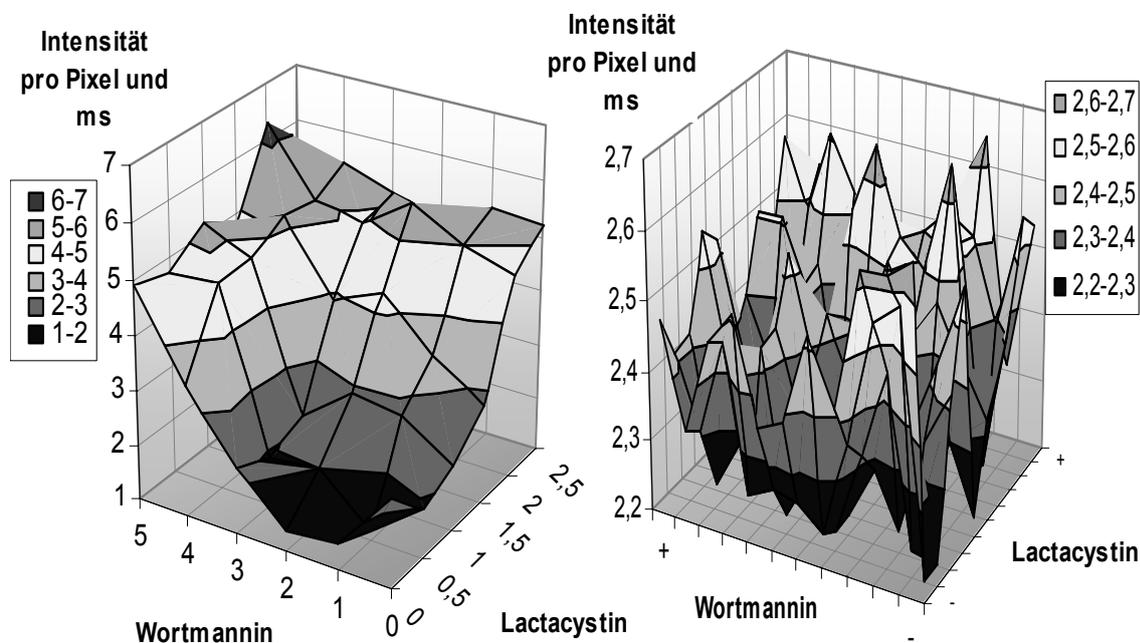
Entsprechend Abb.5.155 wurde die Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Konzentration gegen die von den stimulierten Zellen ausgeschüttete Konzentration an IL8 aufgetragen (schwarz). Zum Vergleich wurden Zellen unter identischen Bedingungen in einer Diffusionsvorrichtung direkt in der Lösung stimuliert (rot).

Somit war es möglich, mit der Diffusionsvorrichtung einen Gradienten aus Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> zu erzeugen und die IL8-Ausschüttung der stimulierten Zellen entsprechend ihres Ortes auf dem Gradienten zu vermessen. Der Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Gradient erzeugte dabei einen IL8-Gradienten.

Jedoch ergab direkte Inkubation der Zellen mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> ein deutlich stärkeres Signal. Es entsprach etwa der 8 bis 12-fachen Konzentration an Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> im Gradienten. Dies erscheint einleuchtend, da die Konzentration im Gel deutlich höher ist, als die effektive Konzentration an Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> in der Zellsuspension darüber.

#### 5.2.4.6 Zwei-Komponenten-Assay

Ein Zwei-Komponenten-Assay mit den IL8-Aktivatoren Wortmannin und Lactacystin wurde durchgeführt. Hierfür wurde die Diffusionsmatrix mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> vorinkubiert und je ein Gradient aus Wortmannin und Lactacystin eindiffundiert. Die IL8-Ausschüttung wurde mit einem Siebdruck-ELISA detektiert (Abb.5.157 rechts). Parallel dazu wurde eine „simulierte“ 2D-Konzentrationsmatrix aus Wortmannin und Lactacystin in eine Mikrotiterplatte und mit den Zellüberständen ein Siebdruck-ELISA durchgeführt (Abb.5.157 links).

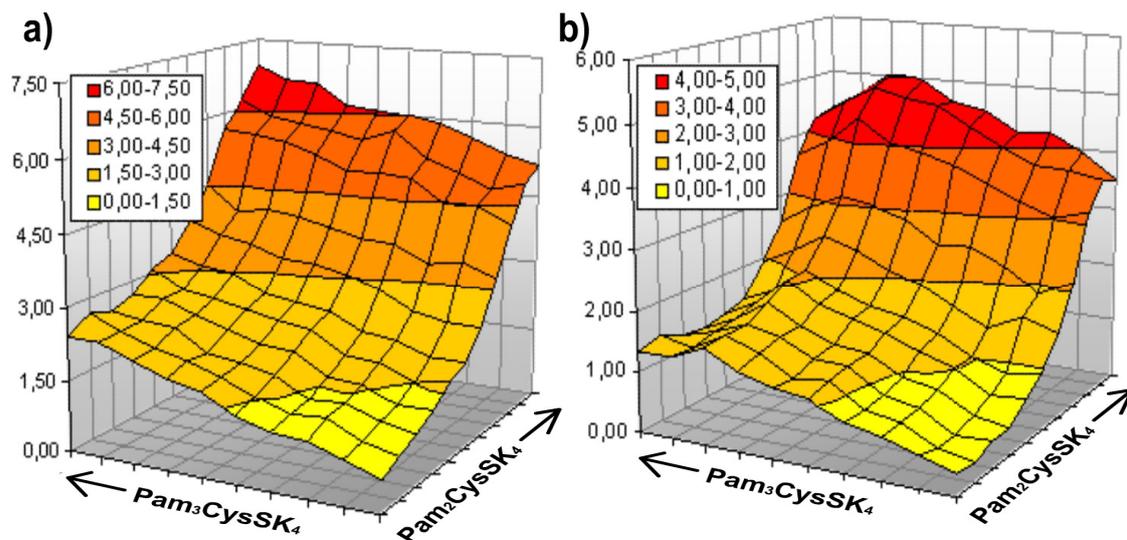


**Abb.5.157: IL8-Ausschüttung bei einem Wortmannin und Lactacystin 2D-Gradienten**

In einer Mikrotiterplatte wurden definierte Konzentrationsgemische aus Wortmannin und Lactacystin pipettiert und ein IL8-Assay mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> stimulierten Zellen durchgeführt (links). In einer Diffusionsvorrichtung wurde mit Wortmannin und Lactacystin ein 2D-Gradient aufgebaut. Die Matrix war homogen mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> durchtränkt und nach 4 h Inkubation der Zellen wurde ein IL8-Siebdruck-ELISA durchgeführt (rechts).

Es zeigte sich zwischen dem „2D-Gradienten“ der Mikrotiterplatte und der Diffusionsvorrichtung ein deutlicher Unterschied, sowohl in Form als auch in Intensität des ausgeschütteten IL8. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sowohl Wortmannin, als auch Lactacystin in Gegenwart von Agarose ausfielen und zudem kaum Aktivität zeigten. Daher bleibt zu überlegen, welche anderen Diffusionsmatrizen verwendbar wären.

Ein weiterer Zwei-Komponenten-Assay wurde daher mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> und Pam<sub>2</sub>Cys-SK<sub>4</sub> (Abb.5.158) durchgeführt, die sich nur durch eine Palmitinsäure unterscheiden und somit nahezu identisch diffundieren. Die beiden Verbindungen aktivieren die IL8-Ausschüttung durch Aktivierung unterschiedlicher Toll-like-Rezeptoren <sup>[369]</sup>. Entsprechende Gradienten wurden mit einer Diffusionsvorrichtung erstellt und vermessen. Zudem wurde mit den beiden Verbindungen ein 2D-Gradient in einer Mikrotiterplatte erstellt und parallel dazu vermessen.



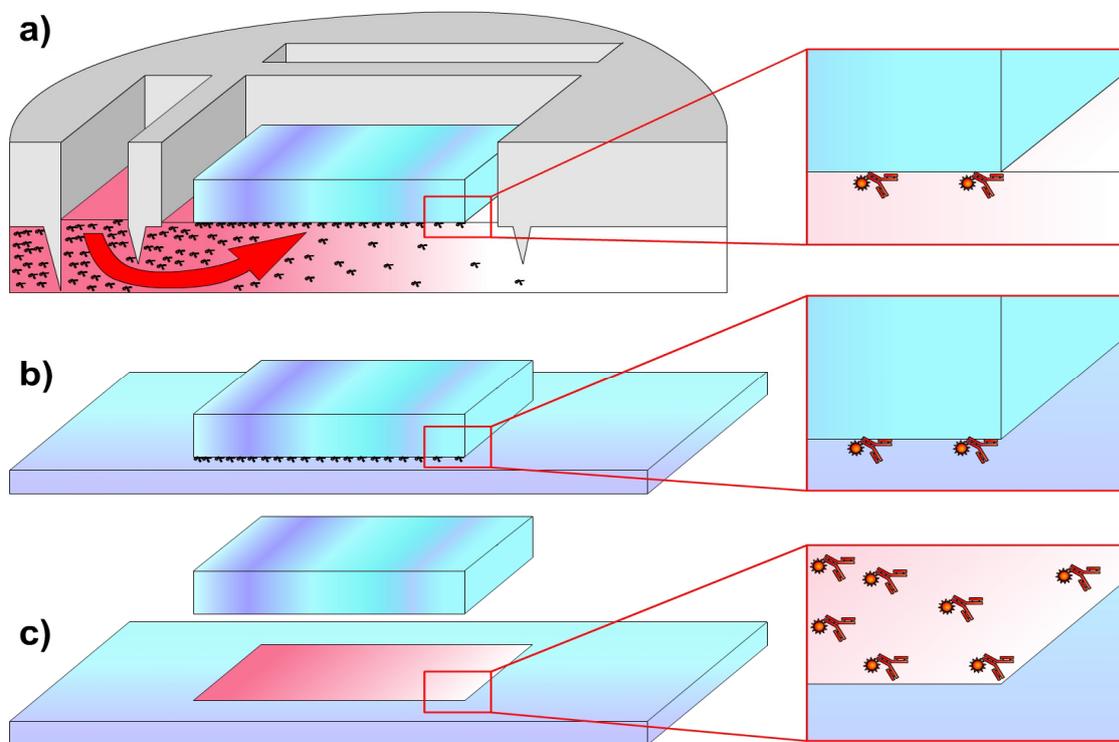
**Abb.5.158: IL8-Ausschüttung bei einem Pam<sub>2</sub>Cys-SK<sub>4</sub> und Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> 2D-Gradienten**

In einer Diffusionsvorrichtung wurde für 24 h mit Pam<sub>2</sub>Cys-SK<sub>4</sub> (mit 2% Pam<sub>2</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Rhodamin) und Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> (mit 6% Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Rhodamin) ein 2D-Gradient aufgebaut. Nach 4 h Inkubation der Zellen wurde ein IL8-Siebdruck-ELISA durchgeführt (b) und aus der Fluoreszenz die Konzentrationen berechnet. In einer Mikrotiterplatte wurden definierte Konzentrationsgemische aus Pam<sub>2</sub>Cys-SK<sub>4</sub> und Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> pipettiert und ein zellulärer IL8-Assay durchgeführt (a). Die Konzentrationen entsprechen 1/10 der in der Matrix berechneten Konzentrationen.

Die beiden „2D-Gradienten“ der Mikrotiterplatte und der Diffusionsvorrichtung stimmen hier sehr gut überein. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass die Konzentration in der Agarosematrix etwa das 10-fache gegenüber den Konzentrationen in der Mikrotiterplatte.

### 5.2.5 Übertragung eines 2D-Gradienten

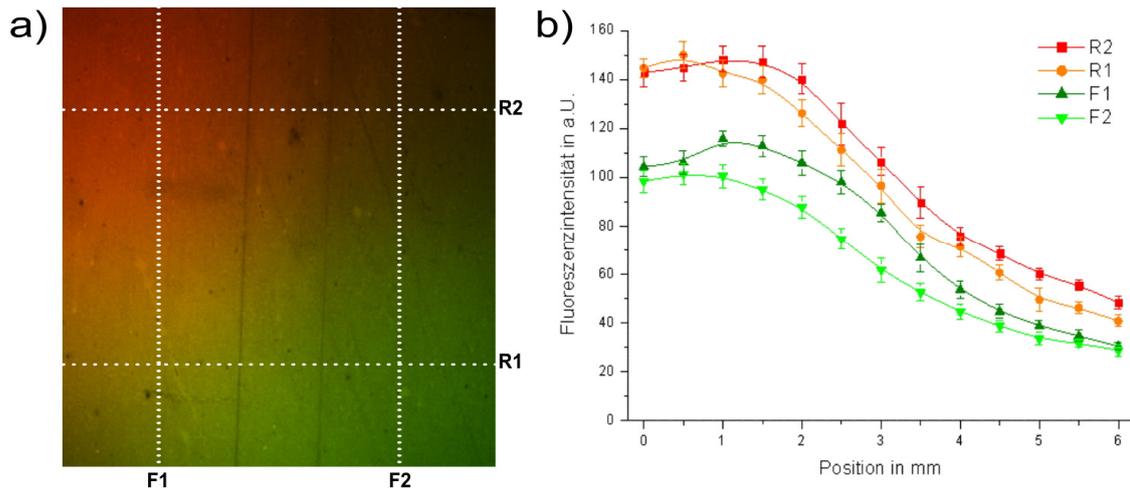
Aufgrund umfangreicher Erfahrungen mit Softlithographischem Kontaktprinting wurde versucht ein 2D-Gradient aus einer Diffusionsvorrichtung mit einem PDMS-Stempel <sup>[370]</sup> auf einen planaren Träger zu übertragen (Abb.5.159). Hierzu wurden die Gradienten mit einer Diffusionsvorrichtung ohne Siebdrucknetz erzeugt. Auf das Mittelfeld wurde dann ein PDMS-Stempel gelegt, so dass sich dort die Moleküle des Gradienten anlagern konnten. Agarose lagert sich aufgrund ihrer vielen Hydroxygruppen nicht an unmodifiziertes PDMS an. Nach 60 min Inkubation des Stempels auf dem Gradienten wurde der Stempel gereinigt und die angelagerten Moleküle transferiert.



**Abb.5.159: Transfer eines 2D-Gradienten aus einer Diffusionsvorrichtung auf eine Oberfläche**

Nach Ausbildung des 2D-Gradienten wurde ein unstrukturierter PDMS-Stempel (a) in die Mittelfläche der Diffusionsvorrichtung gelegt. Nach 60 min wurde der Stempel abgehoben und anhaftende Moleküle auf einen planaren Träger (b) transferiert. Hierdurch wird der Gradient der Diffusionsvorrichtung auf eine Oberfläche übertragen und immobilisiert(c).

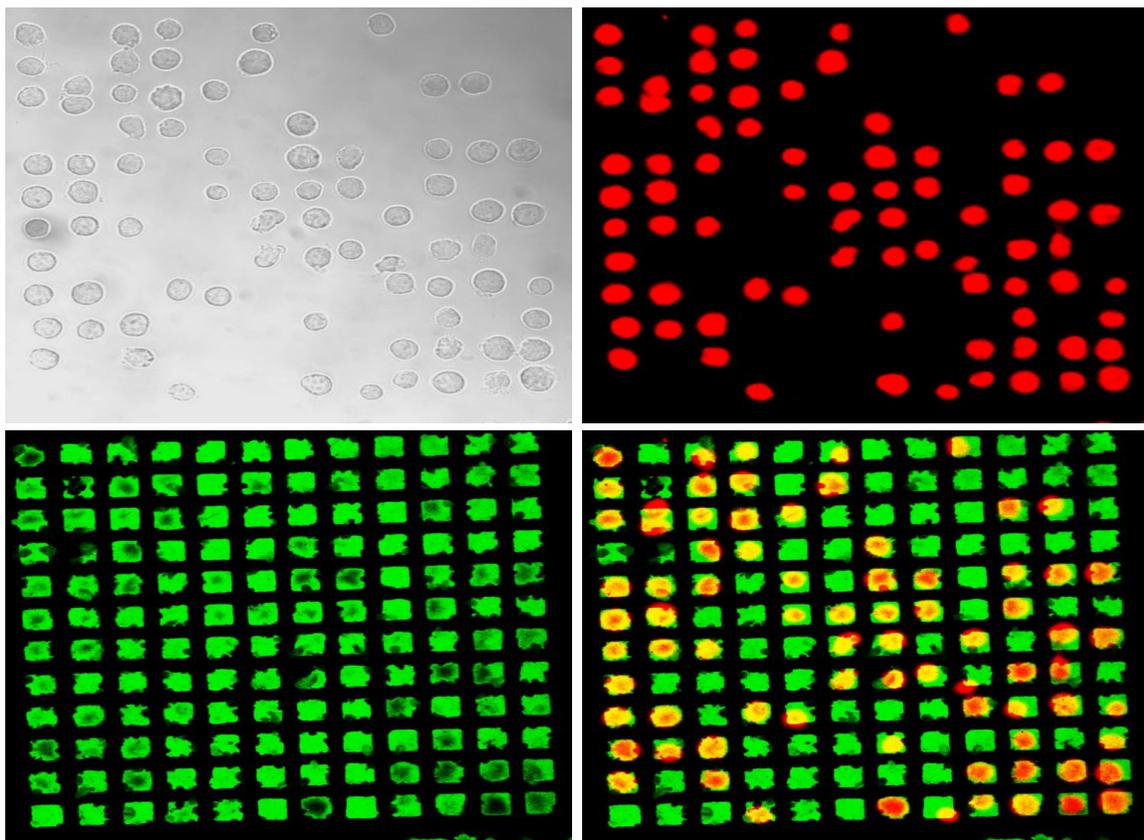
Ein 2D-Gradient wurde mit 20 µl gesättigtem LIPODOT-Rhodamin und 20 µl gesättigtem LIPODOT-Fluorescein erzeugt (Abb.5.160). Nach 30 h Diffusionszeit wurde der PDMS-Stempel für 60 min auf der Mittelfläche inkubiert und die LIPODOT-Verbindungen dann auf eine hydrophobe Oberfläche übertragen.



**Abb.5.160: Stempelübertragung eines 2D-Gradienten**

Der auf eine planare Oberfläche übertragene 2D-Gradient aus LIPODOT-Rhodamin und LIPODOT-Fluorescein (a) wurde entlang der eingezeichneten Linien auf seine Fluoreszenzintensität vermessen (b).

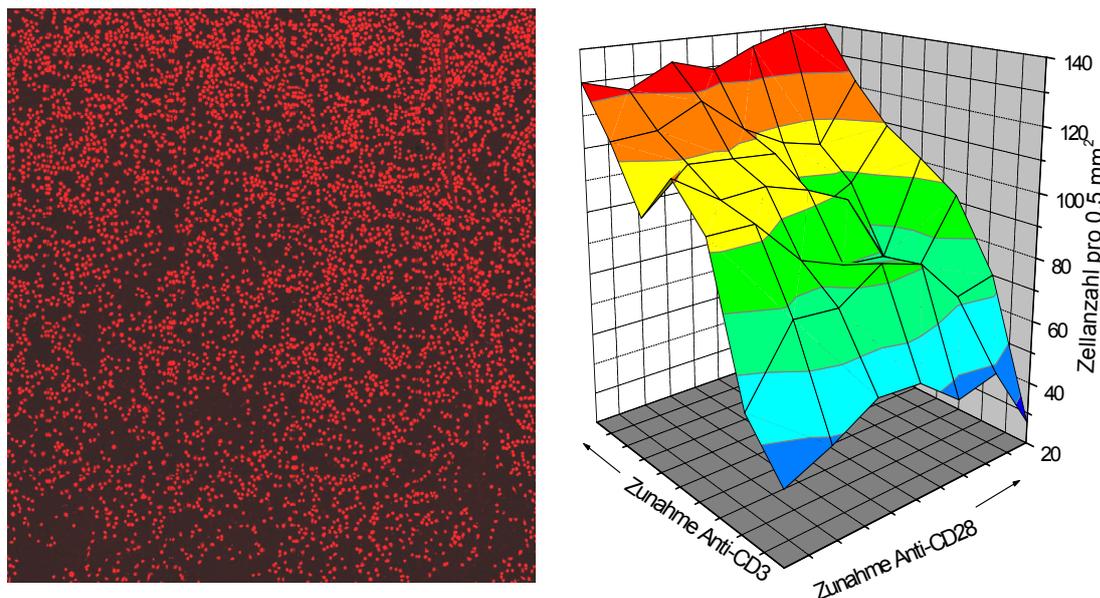
Nicht nur kleine Moleküle, sondern auch größere Biomoleküle wie Antikörper, können mit PDMS-Stempel übertragen werden (Abb.5.161).



**Abb.5.161: Zelladhäsion an Antikörper-Mikrostrukturierung durch PDMS-Stempel**

Ein Gemisch aus 80% Anti-CD3- und 20% Anti-CD28-Antikörper wurde mittels Soft-lithographischen Printings auf eine mit Piranha gereinigte Oberfläche übertragen. Die so erzeugte Oberfläche wurde mit BSA geblockt und dann mit Yurkat-T-Lymphom-Zellen inkubiert. Das Durchlichtbild (links oben) und die Kernfärbung (rechts oben) zeigen eine regelmäßige Anordnung der Zellen. Die Mikrostruktur aus Antikörper auf der Oberfläche (links unten) ist die Ursache für die Anordnung der Zellen, was besonders gut in der Überlagerung der Bilder (rechts unten) sichtbar ist.

Daher wurde ein 2D-Gradient aus Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern mit 108 h Diffusionszeit erzeugt. Ein unstrukturierter PDMS-Stempel wurde für 90 min auf der Diffusionsmatrix inkubiert und die angelagerten Moleküle auf eine mit Piranha gereinigte Glasoberfläche übertragen. Danach wurde auf dieser Oberfläche Jurkat-T-Lymphom-Zellen ausgesät\*, nach 30 min fixiert und der Zellkern mit TOPRO gefärbt. Die Zellen interagieren mit den Antikörpern und setzen sich entsprechend der Antikörperzusammensetzung auf der Oberfläche ab. Die Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde vermessen (Abb.5.162).



**Abb.5.162: Übertragener 2D-Gradienten aus Antikörpern mit „zellulärer Detektion“**

Jurkat T-Zelleukämiezellen auf einem 2D-Gradient (links) aus Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern setzen sich abhängig von der Antikörperzusammensetzung auf der Oberfläche ab. Die Zelldichte wurde mit Image Pro Plus ausgezählt (rechts).

Die Zellen setzten sich in klarer Abhängigkeit vom Anti-CD3-Gradienten, jedoch unabhängig vom Anti-CD28-Gradienten auf der Oberfläche ab. Somit war es möglich, einen Antikörper-Gradienten auf eine Oberfläche zu übertragen und seine biologische „Aktivität“ in einem Zelladhäsionstest nachzuweisen.

## 5.2.6 Zusammenfassung der Diffusionsvorrichtung-Ergebnisse

Es sollte eine Apparatur entwickelt werden, in der mit möglichst wenig Pipettierschritten ein zweidimensionaler Konzentrationsgradient aufgebaut werden und ein zellulärer Zwei-Komponenten-Assay durchgeführt werden kann.

\* Zellfärbung und Fixierung durch Karsten Köhler (Arbeitskreis Priv. Doz. Brock, Tübingen)

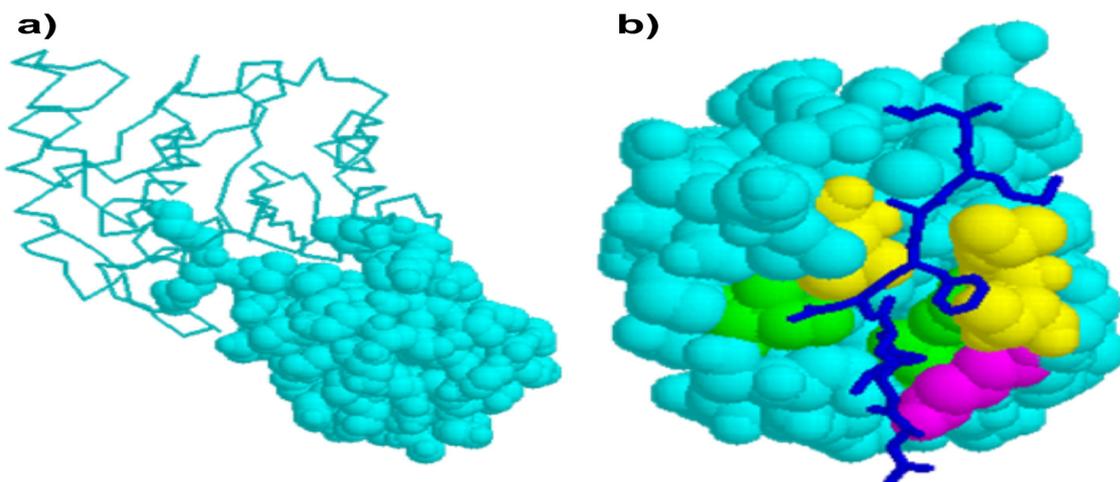
- Die Diffusionsvorrichtung ist kompatibel zu einer 12-Well-Platte und erlaubt eine parallele Versuchsdurchführung.
- Es werden insgesamt nur 3 Pipettierschritte benötigt; einen für das Einfüllen der Diffusionsmatrix und zwei zur Erzeugung der Gradienten.
- Die erzeugten Gradienten sind senkrecht zueinander und decken alle denkbaren Mischverhältnisse und Konzentrationen ab. Die Gradienten überdecken dabei üblicherweise 2 bis 3 Größenordnungen und werden durch die Diffusionszeit festgelegt.
- Ein Siebdrucknetz, das in die Diffusionsvorrichtung eingelegt werden kann, dient als Träger für einen quantifizierbaren und ortsaufgelösten ELISA. Am Beispiel eines IL8-Sandwich-ELISAs wurde die Vergleichbarkeit zur herkömmlichen Durchführung des ELISAs in einer Mikrotiterplatte gezeigt.
- Die Quantifizierung des IL8-ELISAs wurde sowohl mit Meerrettich-Peroxidase/TMB und ortsaufgelöst mit Alkalischer Phosphatase/ELF-97 durchgeführt.
- Die Diffusionsvorrichtung wurde zur Erzeugung eines 1D-Gradienten mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> verwendet und in einem zellulären Assay nachgewiesen, das ebenfalls ein 1D-Gradient aus IL8 von den Zellen ausgeschüttet. Der Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>-Gradient wurde mittels Fluoreszenz und der IL8-Gradient mit dem entwickelten Siebdruck-ELISA vermessen.
- Mit einem zellulären Zwei-Komponenten-Assays aus Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> und Pam<sub>2</sub>Cys-SK<sub>4</sub> konnte gezeigt werden, dass eine ähnliche Zellantwort in Form von IL8-Sekretion erzeugt wurde, wie in einer „simulierten 2D-Konzentraionsmatrix“ in einer Mikrotiterplatte. Ein vergleichbarer Zwei-Komponenten-Assay mit Wortmannin und Lactacystin zeigte keine Übereinstimmung.
- Die Übertragung eines 2D-Gradienten mit einem PDMS-Stempel auf eine planare Assay-Oberfläche wurde sowohl mit fluoreszenten Pam<sub>3</sub>Cys-Verbindungen als auch mit Antikörpern nachgewiesen.
- Zusätzlich konnten für kurze Diffusionszeiten die Diffusionskonstanten von fluoreszenten Molekülen in sehr einfacher Weise bestimmt werden.

## 5.3 Ubiquitin-Liganden

Aufgrund der Allgegenwart von Ubiquitin ist es nicht möglich potente Antikörper dagegen zu erzeugen. Zellen, die solche Antikörper erzeugen würden, würden sich schlichtweg selbst töten, indem sie ihre Proteinhomöostase aus dem Gleichgewicht bringen würden. Daher scheint es vorteilhaft aus Proteinen, die mit Ubiquitin interagieren kleine Peptide abzuleiten, die ebenfalls mit Ubiquitin interagieren und die Bindungsaffinität dieser Peptide zu erhöhen. Zudem sind Peptide deutlich einfacher in der Handhabung im Vergleich zu Antikörpern.

### 5.3.1 Auswahl der Ubiquitin-Liganden

Carboxyhydrolasen aus der E6-Familie <sup>[371;372]</sup> interagieren spezifisch mit Polyubiquitinketten und zerlegen diese in Monoubiquitin. Ausgehend von Kristallstrukturen Ubiquitin-interagierender Proteine wurden eine „Furche“ auf der Oberfläche von Ubiquitin identifiziert\* (Abb.5.163), über die unter anderem Ubiquitin-Carboxyhydrolasen an Ubiquitin „binden“. Insgesamt wurden fünf unterschiedliche Octapeptide (Tab.5.8) für die ersten Bindungsmessungen ausgewählt. Nach Identifizierung eines „Binders“, sollte die jeweilige Sequenz mit Peptid-Kollektionen auf für die Interaktion mit Ubiquitin wichtige Aminosäuren untersucht und mit Mikroarray-Experimenten optimiert werden.



**Abb.5.163: Veranschaulichung der „Bindungsfurche“ von Ubiquitin**

Abgeleitet aus einer Co-Kristallisation zwischen UCH1 (Hefe) und Ubiquitin (a) wurde eine Bindungsfurche identifiziert (b), die starke Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken (grün und violett) oder hydrophobe Interaktionen (gelb) mit der ausgewählten Peptidsequenz eingeht.

\* Molekulares Modelling und Auswahl der Sequenzen durch Dr. Jente Brünjes

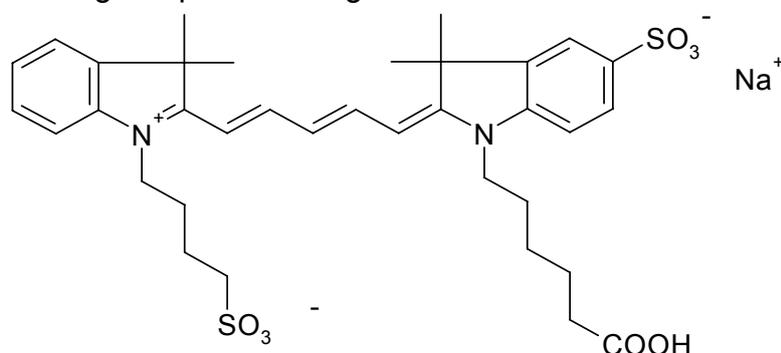


**Tab.5.9: Liste der synthetisierten FCS-Peptide**

Peptid	Abgeleitet aus	Sequenz
FCS1	UCH1 YEAST	Fluo-Ahx-DVLNFAML-NH <sub>2</sub>
FCS2	UCH1 HUMAN	Fluo-Ahx-GEVRFSAV-NH <sub>2</sub>
FCS3	UCH3 HUMAN	Fluo-Ahx-DELRFNAI-NH <sub>2</sub>
FCS4	UCH4 SCHPO	Fluo-Ahx-SPFFSLVA-NH <sub>2</sub>
FCS5	UCH DROME	Fluo-Ahx-NEVRFTVL-NH <sub>2</sub>
FCS6	Kontrolle	Fluo-Ahx-KIEKYDADLE-NH <sub>2</sub>

### 5.3.2.2 Zweite Synthese von Peptiden

Für weitere FCS-Messungen wurden neue Peptide (aufgrund guter Erfahrungen)<sup>[215;373]</sup> mit dem Cyaninfarbstoff S0387 (Abb.5.165) benötigt. Für RfS-Messungen wurden Cystein-haltige Peptide benötigt.



**Abb.5.165: Struktur von S0387**

S0387 besitzt ein Spektrum ähnlich zu Cy5, ist jedoch deutlich stabiler gegenüber Bleichung.

Dieser Fluorophor ist zwar deutlich photostabiler, allerdings auch hydrophober als das zuvor verwendete Carboxy-Fluorescein. Daher wurde der Spacer Ahx durch den hydrophilen Spacer 8-Amino-3,6-dioxa-oktansäure (Ado) ersetzt. Für die RfS-Messungen wurde anstelle des S0387 ein Cystein gekuppelt (Tab.5.10)

**Tab.5.10: Liste der synthetisierten Peptide für FCS und RfS**

Peptid	Abgeleitet aus	Sequenz
FCS7	UCH1 YEAST	S0387-Ado-DVLNFAML-NH <sub>2</sub>
FCS8	UCH1 HUMAN	S0387-Ado-GEVRFSAV-NH <sub>2</sub>
FCS9	UCH3 HUMAN	S0387-Ado-DELRFNAI-NH <sub>2</sub>
FCS10	UCH4 SCHPO	S0387-Ado-SPFFSLVA-NH <sub>2</sub>
FCS11	UCH DROME	S0387-Ado-NEVRFTVL-NH <sub>2</sub>
FCS12	Kontrolle	S0387-Ado-KIEKYDADLE-NH <sub>2</sub>
RIF1	UCH1 YEAST	C-Ado-DVLNFAML-NH <sub>2</sub>
RIF2	UCH1 HUMAN	C-Ado-GEVRFSAV-NH <sub>2</sub>
RIF3	UCH3 HUMAN	C-Ado-DELRFNAI-NH <sub>2</sub>
RIF4	UCH4 SCHPO	C-Ado-SPFFSLVA-NH <sub>2</sub>
RIF5	UCH DROME	C-Ado-NEVRFTVL-NH <sub>2</sub>
RIF6	Kontrolle	C-Ado-KIEKYDADLE-NH <sub>2</sub>

### 5.3.2.3 Dritte Synthese von Peptiden

Aufgrund der Ergebnisse aus Messungen mit den zuvor synthetisierten Peptiden wurden entsprechend der natürlichen Sequenzen, verlängerte Dodecapeptidamide synthetisiert (Tab.5.11). Aufgrund einer Veröffentlichung <sup>[18;337]</sup>, über ein in einem Screening-Verfahren entdecktes Ubiquitin-interagierendes Peptid, wurden diese Sequenzen ebenfalls synthetisiert.

**Tab.5.11: Liste der synthetisierten Peptide**

Peptid	Abgeleitet aus	Sequenz
FCS13	UCH3 HUMAN	S0387-Ado-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
FCS14/NMR1	UCH3 HUMAN	Fluo-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
RIF7	UCH3 HUMAN	C-Ado-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
NMR2/ITC1	UCH3 HUMAN	DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
ITC2	Nach <sup>[18]</sup>	RWDRYYF-NH <sub>2</sub>
ITC3	Nach <sup>[18]</sup>	WGLRALESRWDRYYF-NH <sub>2</sub>

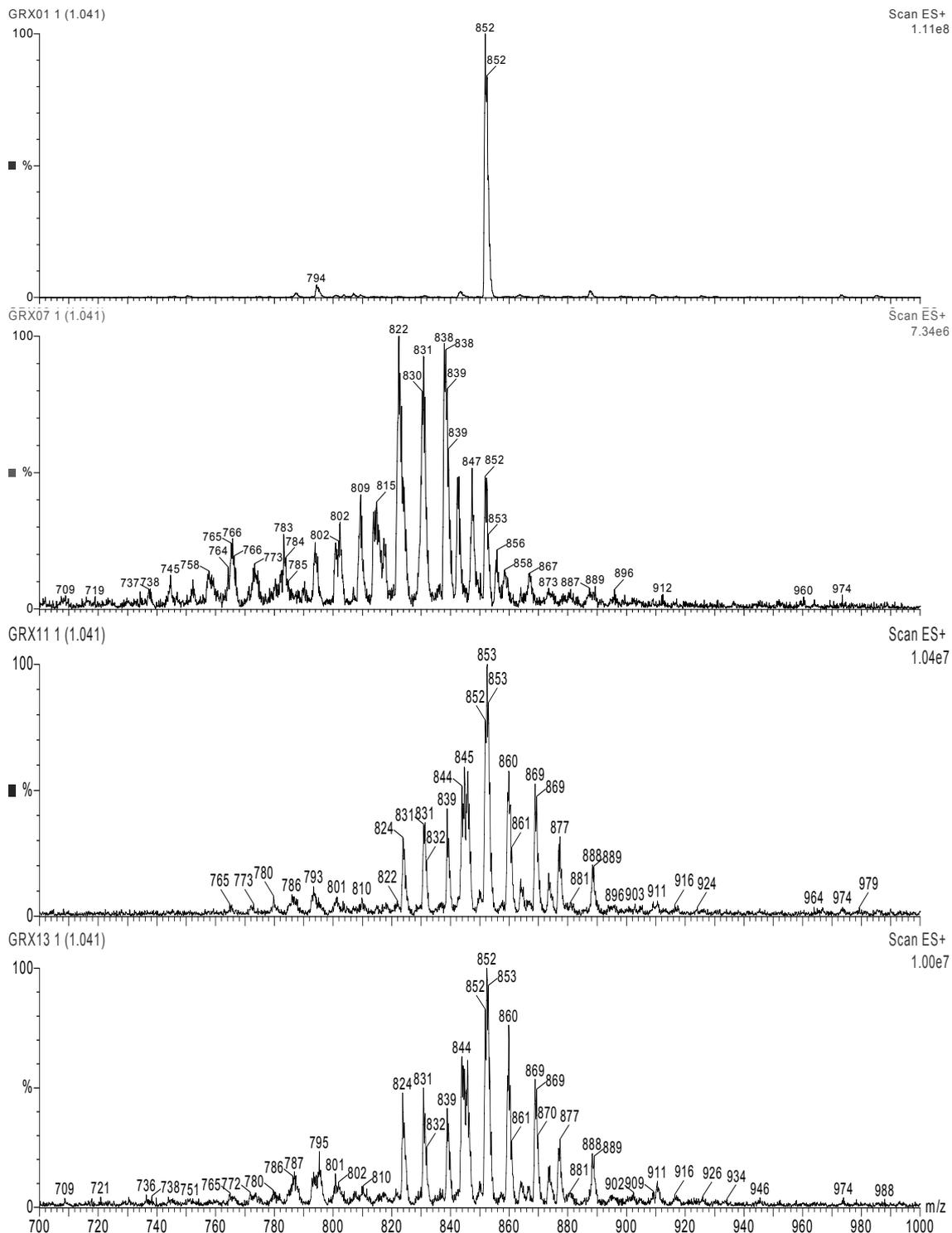
Zusätzlich wurden für Mikroarray-Experimente sowohl ein X-Scan als auch ein Ala-Scan (Tab.5.12) der Sequenz mit der höchsten im FCS detektierten Affinität durchgeführt. Da die Scans in Mikroarrays eingesetzt werden sollten, wurden zwei Aminhexansäuren als Spacer zwischen Cystein und Sequenz eingefügt.

**Tab.5.12: Liste der synthetisierten Scan-Kollektionen**

Beim Ala-Scan wurde je eine Aminosäure durch Alanin ersetzt. Beim X-Scan wurde je eine Position durch jede mögliche Aminosäure (mit Ausnahme von Cystein) ersetzt und so je Position eine Kollektion von 19 Aminosäuren erzeugt.

Sequenz für Ala-Scan	Sequenz für X-Scan
C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> <b>A</b> -NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> I <b>A</b> <b>X</b> -NH <sub>2</sub>
---	C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> I <b>X</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>A</b> <b>X</b> AL-NH <sub>2</sub>
---	C-Ahx-Ahx-DPDELRFN <b>X</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPDELRF <b>A</b> A <b>I</b> A <b>L</b> -NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDELRF <b>X</b> A <b>I</b> A <b>L</b> -NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPDELRF <b>A</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDELRF <b>X</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPDEL <b>A</b> F <b>N</b> A <b>I</b> A <b>L</b> -NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDEL <b>X</b> F <b>N</b> A <b>I</b> A <b>L</b> -NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPDE <b>A</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPDE <b>X</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DPD <b>A</b> L <b>R</b> F <b>N</b> A <b>I</b> A <b>L</b> -NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DPD <b>X</b> L <b>R</b> F <b>N</b> A <b>I</b> A <b>L</b> -NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-DP <b>A</b> E <b>L</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-DP <b>X</b> E <b>L</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-D <b>A</b> DE <b>L</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-D <b>X</b> DE <b>L</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>
C-Ahx-Ahx-D <b>A</b> PDE <b>L</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>	C-Ahx-Ahx-D <b>X</b> PDE <b>L</b> R <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L-NH <sub>2</sub>

Die Identität der Verbindungskollektionen wurde ebenfalls mit ESI-MS bestätigt (Abb.166).



**Abb.5.166: Ausgewählte ESI-MS-Spektren der X-Scan-Kollektion**

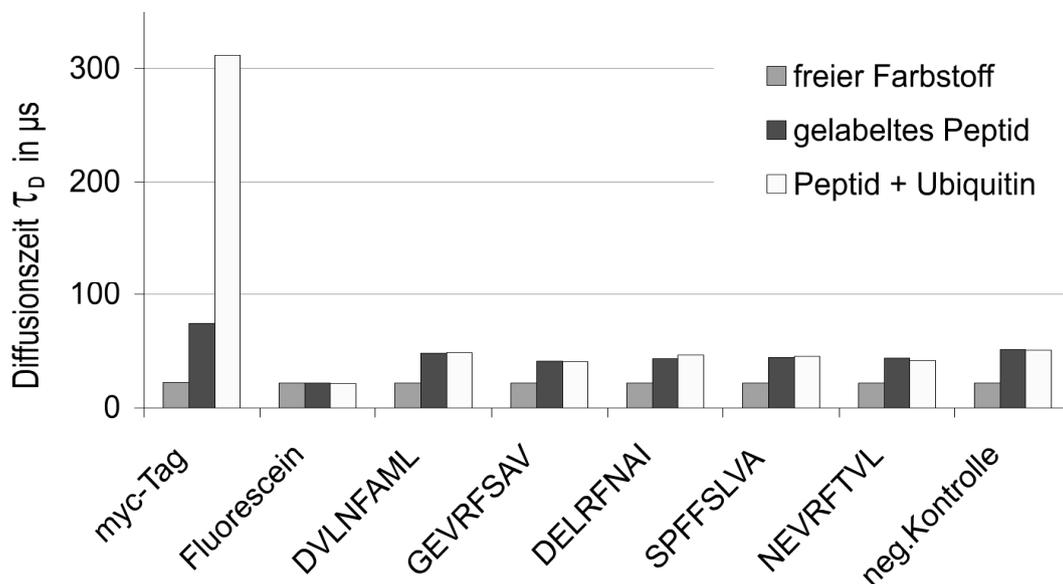
Die Kontrollverbindung C-Ahx-Ahx-DPDELRFN~~X~~AIAL-NH<sub>2</sub> (oben) besitzt eine Masse von 1703,4 D, womit 852,5 dem  $[M+2H]^{2+}$  Ion entspricht. Wurde, wie in der Verbindungskollektion C-Ahx-Ahx-DPDELR~~X~~AIAL-NH<sub>2</sub> (2.Spektrum) eine „schwere“ Aminosäure wie Phenylalanin variiert, so verschob sich das Spektrum zu geringeren Massen. Die Spektren der Verbindungskollektionen C-Ahx-Ahx-DP~~X~~ELRFN~~X~~AIAL-NH<sub>2</sub> (3.Spektrum) und C-Ahx-Ahx-~~X~~PDELRFN~~X~~AIAL-NH<sub>2</sub> (unten) waren identisch, da jeweils die Asparaginsäure, wenn auch an unterschiedlicher Position, variiert wurde.

### 5.3.3 Fluoreszenz-Korrelations-Messungen (FCS)

Die FCS-Messungen erlauben eine schnelle Detektion einer biomolekularen Interaktion in Lösung. Daher wurde diese Methode für eine Ja/Nein-Abschätzung einer Bindung eingesetzt.

#### 5.3.3.1 FCS-Messungen

Die ersten FCS-Messungen (Abb.5.167) wurden mit den Peptiden aus Kapitel 5.3.2 entsprechend Kapitel 4.5.1 durchgeführt.



**Abb.5.167: Erste FCS-Messungen**

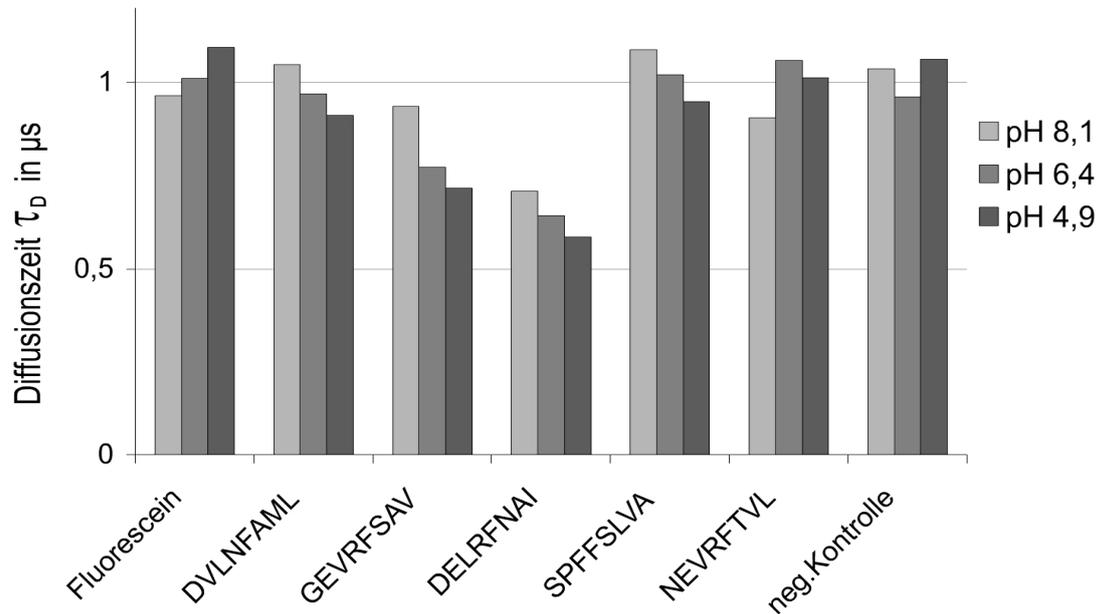
Es wurde jeweils die Diffusionszeit  $\tau_D$  bestimmt. Der freie Fluorophor (blau) zeigt eine deutlich geringere Diffusionszeit gegenüber dem mit Fluorophor gelabelten Peptid (violett). Nach Zugabe eines 10-fachen Überschusses an Ubiquitin (gelb) sollte sich im Fall einer Bindung eine weitere Erhöhung der Diffusionszeit zeigen. Einzig die Positivkontrolle, eine Fluorescein-gelabelte myc-Sequenz\* zeigte nach Zugabe eines Antimyc-Antikörpers eine deutliche Erhöhung der Diffusionszeit.

Für keines der ausgewählten Peptide zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Diffusionszeit  $\tau_D$ . Nur die Positivkontrolle, eine Fluorescein-gelabelte myc-Sequenz\* zeigte nach Zugabe eines Antimyc-Antikörpers eine deutliche Erhöhung der Diffusionszeit.

Auch eine Variation des pH-Wertes ergab keinen signifikanten Hinweis auf die Bindung eines der Peptide. Eine genauere Betrachtung der Fluoreszenz der einzelnen Peptide zeigte jedoch, dass sich bei den Sequenzen Fluo-Ahx-

\* Peptid und Antikörper-Labeling hergestellt von Melanie Nevar

**GEVRFSAV-NH<sub>2</sub>** und Fluo-Ahx-**DELRFNAI-NH<sub>2</sub>** die Anzahl der Fluorophore bei Zugabe von Ubiquitin deutlich verringerte bzw. die Gesamtfluoreszenz (Abb.5.168) der Fluorophore signifikant abnahm.



**Abb.5.168: Relative Fluoreszenz pro Fluorophor**

Die Gesamtfluoreszenz bleibt während der Messung unverändert, sofern keine Bleichung, eine Zersetzung oder Interaktion mit dem Fluorophor auftritt. Daher sind GEVRFSAV und DELRFNAI Kandidaten für eine Interaktion.

Da die Gesamtfluoreszenz abnahm, muss ein Teil der Fluorophore „inaktiv“ werden. Dies kann nur geschehen, wenn der Fluorophor zerstört oder gebleicht wird oder wenn sich durch eine molekulare Interaktion die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors ändern. Da man nicht davon ausgehen kann, dass das Carboxy-Fluorescein sich bei den Sequenzen Fluo-Ahx-**GEVRFSAV-NH<sub>2</sub>** und Fluo-Ahx-**DELRFNAI-NH<sub>2</sub>** schneller zersetzt als bei den anderen Sequenzen kann diese Fluoreszenzlöschung als ein schwacher Hinweis für eine Interaktion mit Ubiquitin gewertet werden.

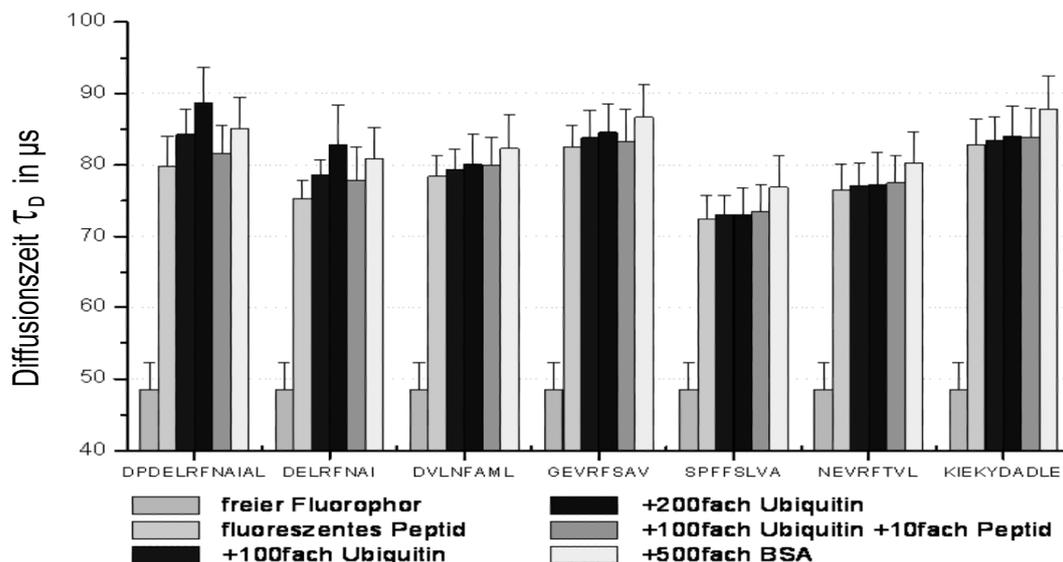
### 5.3.3.2 Optimierung der FCS-Messung

Untersuchungen <sup>[373]</sup> zeigten, dass der Fluorophor S0387 im Gegensatz zu Fluorescein in Gegenwart von Proteinen keine Fluoreszenzlöschung erfährt. Daher wurden Peptide synthetisiert, die anstelle des Fluoresceins nun S0387 enthielten.

Das Messprotokoll wurde nach folgenden Punkten umgestellt um eine spezifische Interaktion mit Ubiquitin deutlicher hervorzuheben:

Neues Messprotokoll

- Messung des freien Fluorophors
- Messung des fluoreszenten Peptids
- Messung des fluoreszenten Peptids mit 100-fachem Überschuss an Ubiquitin (im Falle einer Interaktion ist eine Erhöhung von  $\tau_D$  zu erwarten)
- Messung des fluoreszenten Peptids mit 200-fachem Überschuss an Ubiquitin (im Falle einer Interaktion ist eine weitere Erhöhung von  $\tau_D$  zu erwarten)
- Messung des fluoreszenten Peptids mit 500-fachem Überschuss an BSA (die erhöhte Proteinmenge wird durch die erniedrigte Viskosität des Mediums die Diffusionszeit  $\tau_D$  unspezifisch erhöhen)
- Messung des fluoreszenten Peptids mit 100-fachem Überschuss an Ubiquitin und 10-fachem Überschuss des nicht fluoreszenten, aber „potentiell bindenden“ Peptids DPDELRFNIAIAL-NH<sub>2</sub> (im Falle einer Interaktion von DPDELRFNIAIAL-NH<sub>2</sub> ist eine Erniedrigung durch Konkurrenz um die Bindungsfurche von  $\tau_D$  gegenüber dem 3. Messpunkt zu erwarten)



**Abb.5.169: FCS-Messung der Diffusionszeit des Fluorophors**

Durch Zugabe von Ubiquitin (mittel und dunkelblau) muss sich bei einer molekularen Interaktion die Diffusionszeit gegenüber dem fluoreszente Peptid (hellblau) erhöhen. Bei Zugabe von Ubiquitin (mittel- und dunkelblau) erhöht sich im Fall einer Interaktion die Diffusionszeit. Durch Konkurrenz mit nicht fluoreszente DPDELRFNIAIAL-NH<sub>2</sub> sollte sich im Falle einer spezifischen Bindung die Diffusionszeit erniedrigen (orange). Die Zugabe eines 1000-fachen Überschusses an BSA zeigt wie stark sich die Diffusionszeit durch eine unspezifische Erniedrigung der Viskosität des Mediums ändert (gelb).

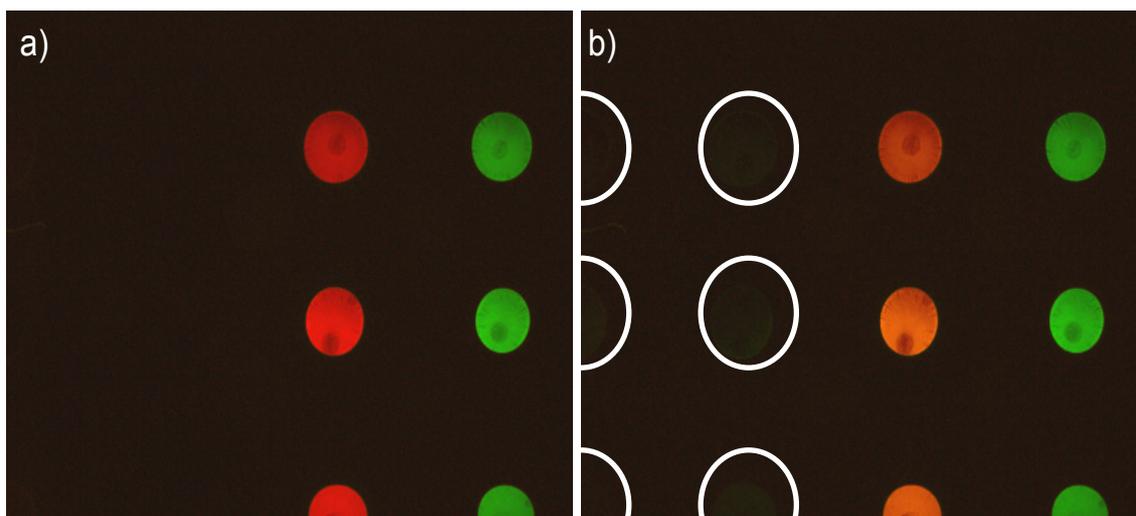
Die Peptide Fluo-Ahx-**DPDELRFNIAIAL**-NH<sub>2</sub>, S0387-Ado-**DELRFNAI**-NH<sub>2</sub> und S0387-Ado-**DPDELRFNIAIAL**-NH<sub>2</sub> zeigten eine signifikante Interaktion mit Ubiquitin (Abb.5.169), die sich zudem durch nicht fluoreszentes **DPDELRFNIAIAL**-NH<sub>2</sub> kompetieren ließ. Das Peptid GEVRFSAV zeigt ein ähnliches, aber deutlich schwächeres, Bindungsverhalten (Zunahme der Diffusionszeit durch Zugabe von Ubiquitin und ließ sich, wenn auch nur leicht kompetieren). Es wurde jedoch aufgrund der extrem schwachen Bindung nicht weiter untersucht.

### 5.3.4 Alanin- und X-Scan-Mikroarrays

Da DPDELRFNIAIAL-NH<sub>2</sub> als „bindende“ Sequenz identifiziert wurde, wurden sowohl ein Alanin-Scan als auch ein X-Scan dieser Sequenz (Kapitel 5.3.2.3 synthetisiert um entsprechende Mikroarray-Experimente durchzuführen.

Mit dem Alanin-Scan sollten für die Bindung essentielle Aminosäuren bestimmt werden. Dies lässt sich durch Vergleichen der Fluoreszenzintensität erreichen. Wird eine für die Bindung essentielle Aminosäure der Peptidsequenz durch Alanin ersetzt, wird die Bindung schwächer ausfallen und damit das Fluoreszenzsignal ebenfalls schwächer sein.

Entsprechend Kapitel 4.2.4 wurden Mikroarray-Experimente sowohl mit Fluorescein-gelabeltem Ubiquitin als auch mit Ubiquitin, gefolgt von einem Fluorescein-gelabelten Antiubiquitin-Antikörper (Abb.5.170) durchgeführt.



**Abb.5.170: Aufbau des Alanin-Scan-Mikroarrays vor (links) und nach (rechts) der Inkubation**

Die Alanin-Scan-Kollektion wurde zusammen mit einer Rhodamin-gelabelten myc-Tag-Sequenz (rot) und einem Fluorescein-gelabelten Peptid (grün) als Mikroarray hergestellt (a). Nach Inkubation mit Ubiquitin wurde das Array mit einer Mischung aus Fluorescein-gelabelten Antikörpern gegen Ubiquitin und myc-Tag gefärbt (B). Nur die Anbindung des Anti-Myc-Antikörpers ist durch einen „Gelbstich“ der roten Spots messbar. Die Spots mit dem Dodecapeptid (weiße Kreise) zeigen keine signifikante Fluoreszenz.

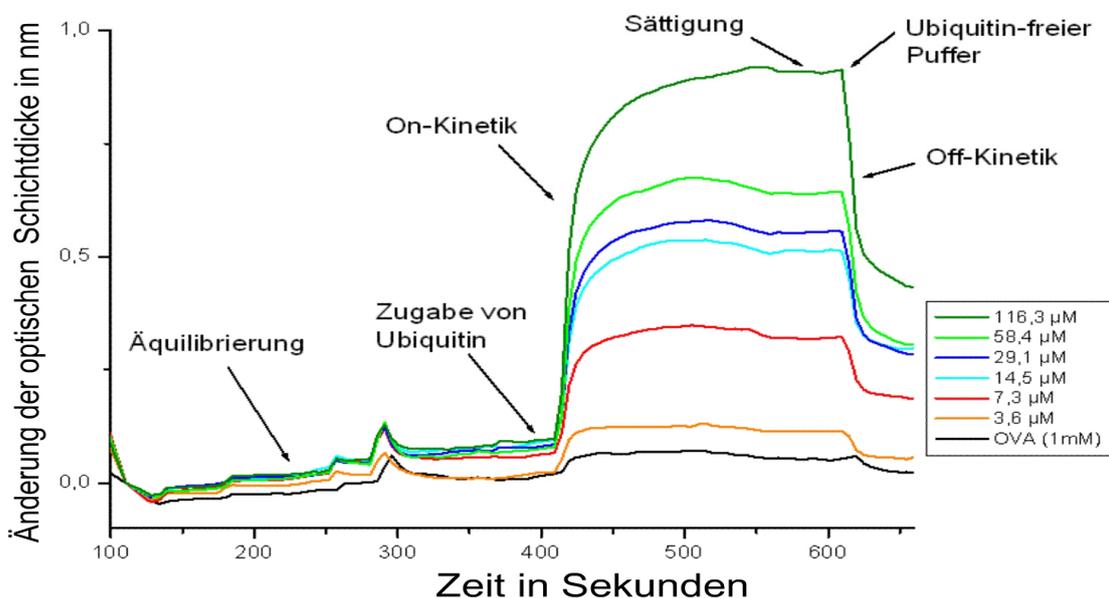
Es zeigte sich auf den Spots mit dem „bindenden“ Peptid nahezu keine Fluoreszenz, was zunächst darauf zurückzuführen ist, dass das Ubiquitin nicht angebunden hat. Untersuchungen mit X-Scan-Mikroarrays, mit denen optimierbare Aminosäurepositionen identifiziert werden sollten, lieferten ebenfalls keine quantifizierbaren Fluoreszenzfärbungen.

Somit war weder eine Identifikation, der für die Bindung essentiellen Aminosäuren noch eine schnelle Optimierung der „bindenden“ Sequenz mittels Mikroarrays möglich.

Spätere Erkenntnisse aus den RfS-Messungen ergaben, dass Ubiquitin mit dem „bindenden“ Okta- und Dodecapeptid eine extrem schnelle Off-Kinetik aufweist. Daher löste sich das Ubiquitin während der Waschschrte, die für ein Mikroarray notwendig sind, von den Spots und war somit nicht mehr detektierbar.

### 5.3.5 Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (RfS)\*

Die Cystein-haltigen Derivate der Peptide wurden entsprechend Kapitel 4.5.2 auf Transducer aufgebracht und vermessen (Abb.5.171).



**Abb.5.171: RfS-Messung von DPDELRFNAL-NH<sub>2</sub>**

Jeweils nach 400 s wurde die Ubiquitin-Lösung eingespeist. Es zeigte sich sehr deutlich ein Schichtdickenzuwachs und damit eine Bindung. Die Höhe des Bindungssignal nahm entsprechend der Ubiquitin-Konzentration zu. Interessanterweise stellte sich das Bindungsgleichgewicht innerhalb von 30 Sekunden ein. Zu dieser schnellen On-Kinetik kam eine noch schnellere Off-Kinetik hinzu. Die Bindungskonstante wurde in dieser Messung auf  $13 \pm 3 \mu\text{M}$  bestimmt.

\* Durchführungen der Messungen durch Dr. Bernd Möhrle und Goran Markovic (Arbeitskreis Prof. Dr. Gauglitz, Tübingen)

Von den sieben vermessenen Peptiden (Tab.5.13) zeigten nur C-Ado-DPDELRFNIAIAL-NH<sub>2</sub> und C-Ado-DELRFNAI-NH<sub>2</sub> eine spezifische Bindung.

**Tab.5.13: Bindungskonstanten mit RIFs-Messungen**

Peptid	Sequenz	Bindungskonstante in $\mu\text{M}$
RIF1	C-Ado-DVLNFAML-NH <sub>2</sub>	nicht nachweisbar
RIF2	C-Ado-GEVRFSAV-NH <sub>2</sub>	>2.000
RIF3	C-Ado-DELRFNAI-NH <sub>2</sub>	$32 \pm 5$
RIF4	C-Ado-SPFFSLVA-NH <sub>2</sub>	nicht nachweisbar
RIF5	C-Ado-NEVRFTVL-NH <sub>2</sub>	nicht nachweisbar
RIF6	C-Ado-KIEKYDADLE-NH <sub>2</sub>	nicht nachweisbar
RIF7	C-Ado-DPDELRFNIAIAL-NH <sub>2</sub>	$13 \pm 3$

Die meisten Oktapeptide zeigten nahezu keine Bindung, mit Ausnahme der aus der humanen Ubiquitin Carboxy-Hydrolase Teilsequenz DELRFNAI und DPDELRFNIAIAL. Dies bestätigten somit die ersten Resultate aus den FCS-Messungen.

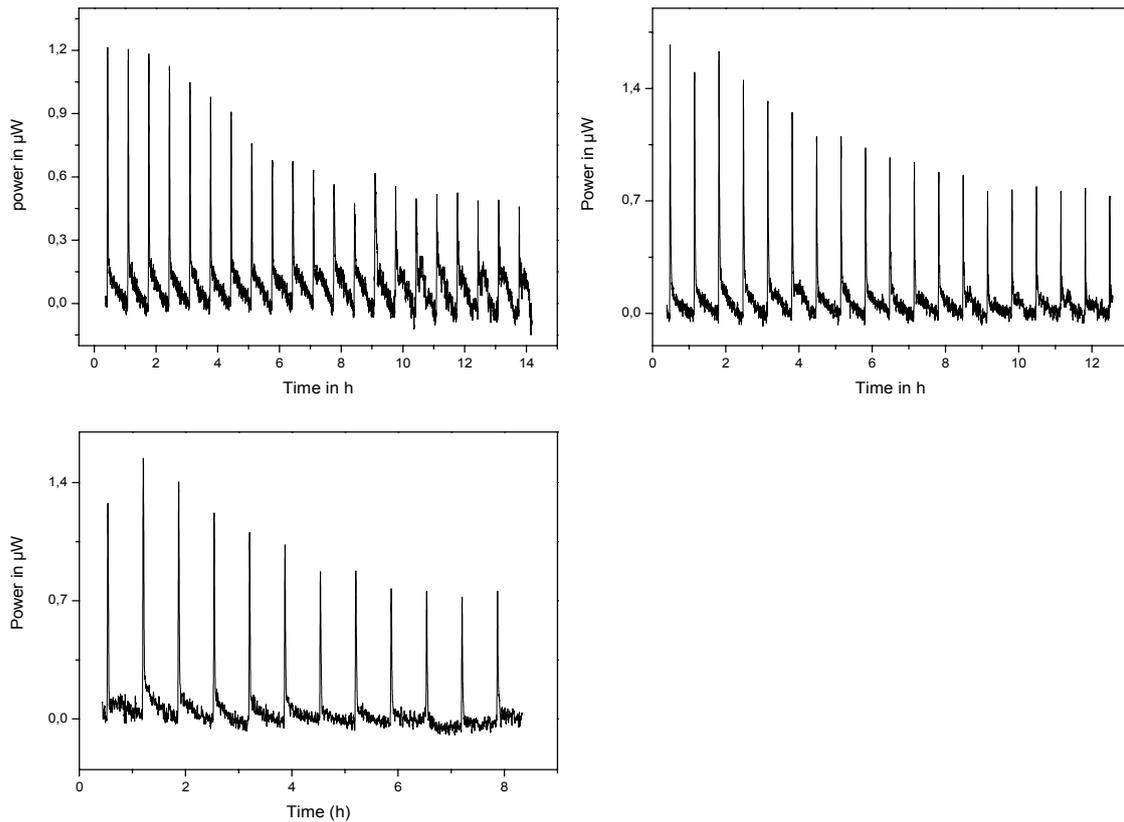
Weiterhin zeigten alle Bindungsmessungen auf den RIFs-Oberflächen, dass selbst die bindenden Peptide eine extrem schnelle On- und Off-Kinetik besitzen und sich nahezu alles Ubiquitin innerhalb einer Minute wieder von der Oberfläche löst.

Dies erklärt zudem die nicht messbare Fluoreszenz der Mikroarraymessungen. Es ist anzunehmen, dass schon beim ersten Waschschrift des Mikroarrays nahezu alles Ubiquitin von der Oberfläche gespült wurde.

### 5.3.6 Isothermale Kalorimetrie (ITC)\*

Mit Hilfe eines Beadscreening-Verfahrens wurde 2004 die Peptidsequenz WGLRALESRWDRYYF-NH<sub>2</sub> als potentieller Binder für Ubiquitin mit einer Bindungskonstante von  $12 \pm 4 \mu\text{M}$  veröffentlicht <sup>[18]</sup>. Es wurde die Bindungskonstante mittels ITC bestimmt. Sie ist damit nicht direkt mit den Resultaten der RIFs-Messungen vergleichbar. Daher wurde diese veröffentlichte Peptidsequenz WGLRALESRWDRYYF-NH<sub>2</sub> und das ebenfalls „bindende“ RWDRYYF-NH<sub>2</sub> synthetisiert, um sie mit dem stärksten „Binder“ DPDELRFNIAIAL-NH<sub>2</sub> entsprechend der Veröffentlichung mittels ITC (Abb.5.172) zu vergleichen. Die daraus berechneten Bindungskonstanten sind Tab.5.14 zu entnehmen.

\* Durchführung der Messung durch Frau Karin Wöllner (Arbeitskreis Prof. Dr. Gauglitz, Tübingen)



**Abb.5.172: ITC-Messung der Peptide**

Wärmeentwicklung von DPDELRFNAIAL-NH<sub>2</sub> (a), WGLRALESRWDRYYF-NH<sub>2</sub> (b) und RWDRYYF-NH<sub>2</sub> (c) mit Ubiquitin.

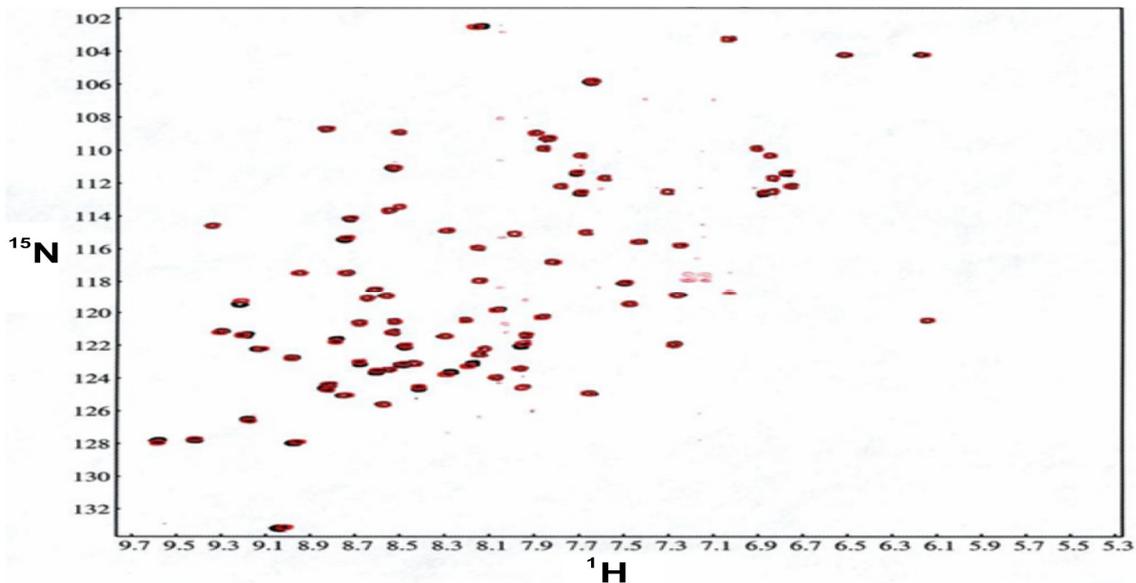
**Tab.5.14: Vergleich der Bindungskonstanten**

Peptid	Sequenz	Veröffentlichte Bindungskonstante in µM	Gemessene Bindungskonstante in µM
ITC1	DPDELRFNAIAL-NH <sub>2</sub>	---	10 ± 2
ITC2	RWDRYYF-NH <sub>2</sub>	33 ± 5	17 ± 4

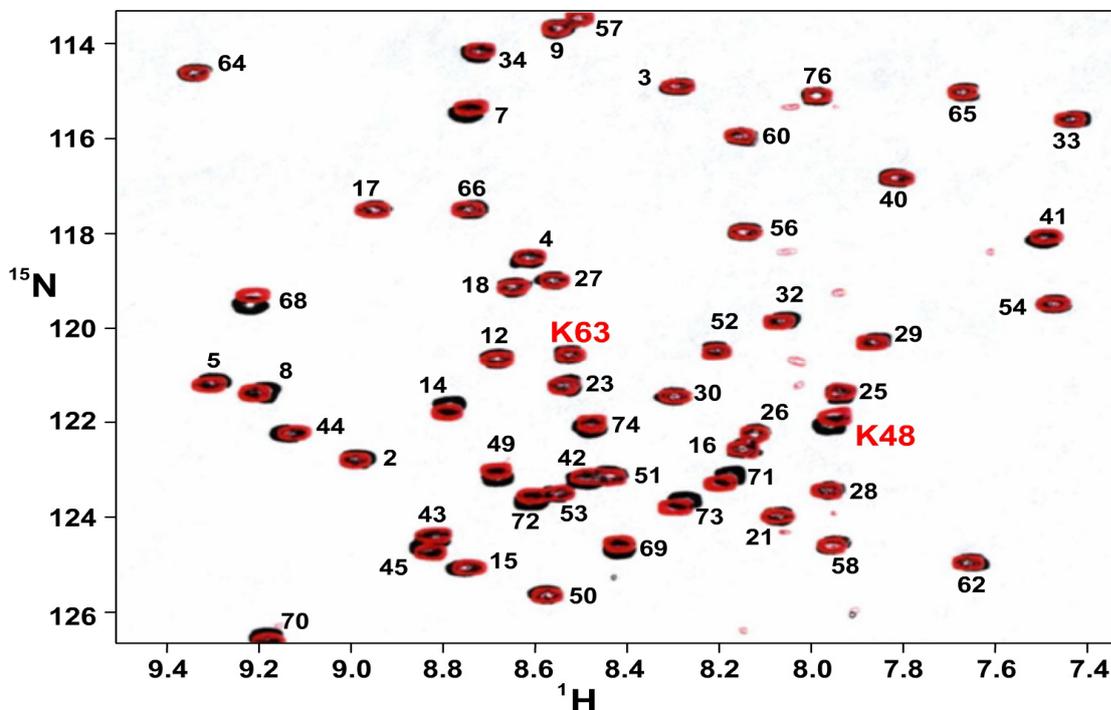
Mittels ITC konnten die veröffentlichten Bindungskonstanten bestätigt und im Falle des kürzeren Peptids RWDRYYF-NH<sub>2</sub> sogar eine etwas bessere Bindungskonstante ermittelt werden. Im Vergleich zum veröffentlichten Pentadekapeptid WGLRALESRWDRYYF-NH<sub>2</sub> zeigte das Dodecapeptid DPDELRFNAIAL-NH<sub>2</sub> aus der humanen Ubiquitin Carboxy-Hydrolase eine etwas bessere Affinität von 10 ± 2 µM.

### 5.3.7 Magnetische Kernresonanzmessungen (NMR)\*

Entsprechend Kapitel 4.5.5 wurde Ubiquitin in Gegenwart des Peptids DPDELRFNAIAL-NH<sub>2</sub> gegen Ubiquitin ohne Peptid vermessen (Abb.5.173 und Abb.5.174), um den Interaktionsbereich zu identifizieren <sup>[200]</sup>.



**Abb.5.173: 2D-[<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC-Spektrum**  
Aufnahmen von Ubiquitin mit Peptid (rot) und ohne (schwarz)



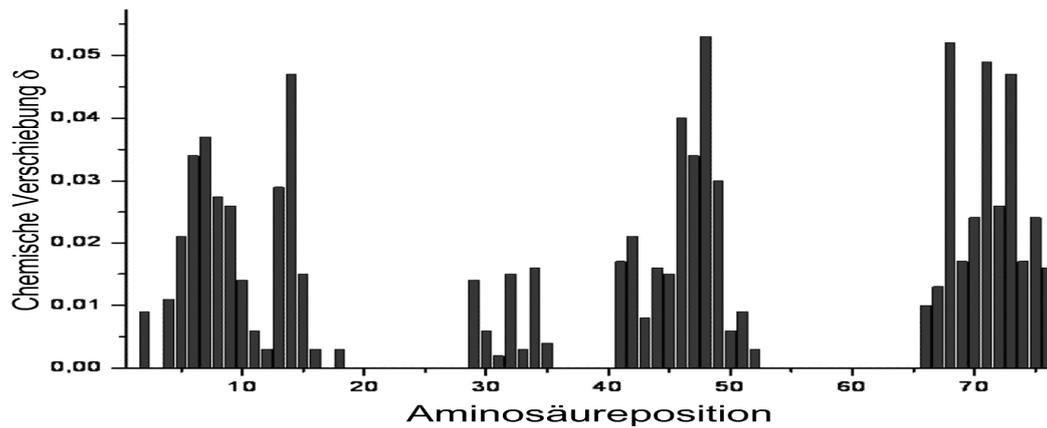
**Abb.5.174: Vergrößerter Ausschnitt von Abb.5.173 mit Sequenzzuordnung <sup>[9]</sup>**  
Durch die Gegenwart von Peptid (rot) verschieben sich nur einige wenige Signale gegenüber Peptid-freiem Ubiquitin.

\* Durchführung der Messungen durch Dr. Stefan Freund (Arbeitskreis Prof. Dr. Fersht, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, England)

Eine besonders starke Verschiebung erfuhr Lys48 (Abb.5.174). Die Gesamtverschiebung  $\delta$  einer Resonanz wurde entsprechend der Literatur <sup>[9;374]</sup> unter Berücksichtigung der Kernmomente von  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  durch

$$\delta = [(\delta^1\text{H})^2 + 0,04(\delta^{15}\text{N})^2]^{1/2}$$

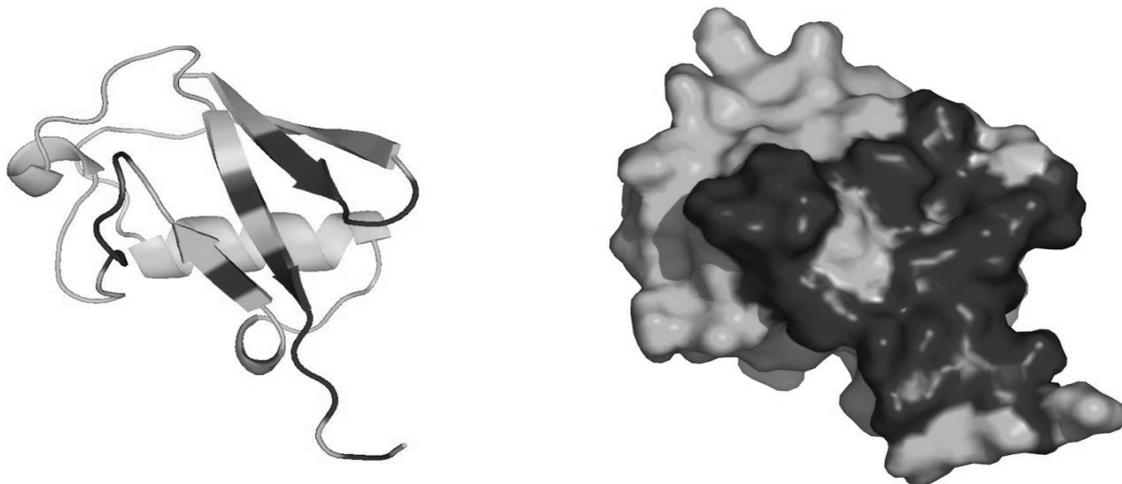
berechnet. Die Zuordnung der einzelnen Resonanzen (Abb.5.174) wurde ebenfalls öffentlichen Datenbanken <sup>[9]</sup> entnommen und dem berechneten  $\delta$  zugeordnet (Abb.5.175)



**Abb.5.175: Auftragung  $\delta$  gegen die Aminosäureposition**

Einzelne Bereiche des Ubiquitins zeigen eine starke chemische Verschiebungsänderung auf.

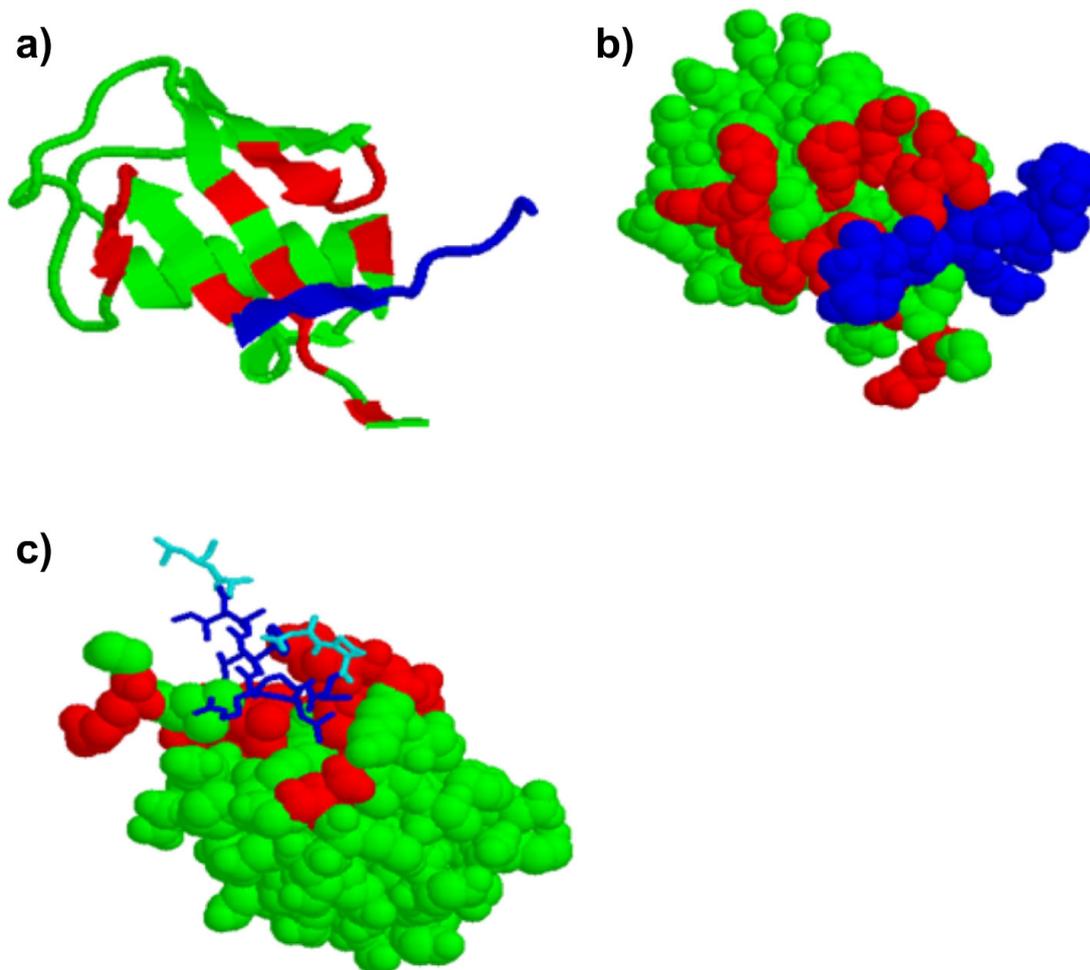
Es zeigte sich bereits hier ein „Muster“ aus beeinflussten Bereichen (Aminosäureposition 3-15, 29-35, 41-52 und 66-76) der Ubiquitinstruktur. Projiziert man die Verschiebungen  $\delta$ , die stärker als 0,02 ppm waren, auf die Oberfläche von Ubiquitin, so zeigt sich, dass nahezu alle starken Verschiebungen in einer einzigen Zone (Abb.5.176) des Ubiquitins lagen.



**Abb.5.176: Projektion der Signal-verschobenen Aminosäuren des Ubiquitins**

Nahezu alle Signal-verschobenen Aminosäuren (dunkelgrau) liegen in einem einzigen Bereich von Ubiquitin.

Betrachtet man die Kristallstruktur der humanen Ubiquitin Carboxy-Hydrolase, entnimmt die bindende Sequenz zusammen mit dem Ubiquitin und projiziert die Verschiebungen auf das Ubiquitin, so zeigte sich sehr deutlich eine räumliche Koinzidenz (Abb.5.177) zwischen natürlicher Lage des Peptids entlang der „Furche“ am Ubiquitin und der Signal-verschobenen Aminosäuren.



**Abb.5.177: Kristallstrukturdarstellungen des „bindenden“ Peptids**

Aus der Kristallstruktur der humanen Ubiquitin Carboxy-Hydrolase wurden nur das Ubiquitin (grün) und das Dodecapeptid (dunkelblau) entnommen (a). Die Signal-verschobenen Aminosäuren des Ubiquitins (rot) liegen entlang der zuvor beschriebenen Furche und in guter räumlicher Nähe zum Peptid (b). Betrachtet man „nur“ das Oktapeptid (dunkelblau in c, die Verlängerung zum Dodecapeptid ist hellblau dargestellt) so liegt es zentral in der Furche und in nächster Nähe zu den chemisch verschobenen Aminosäuren des Ubiquitins. Für die Darstellungen wurde das pdb-File 1XD3 verwendet.

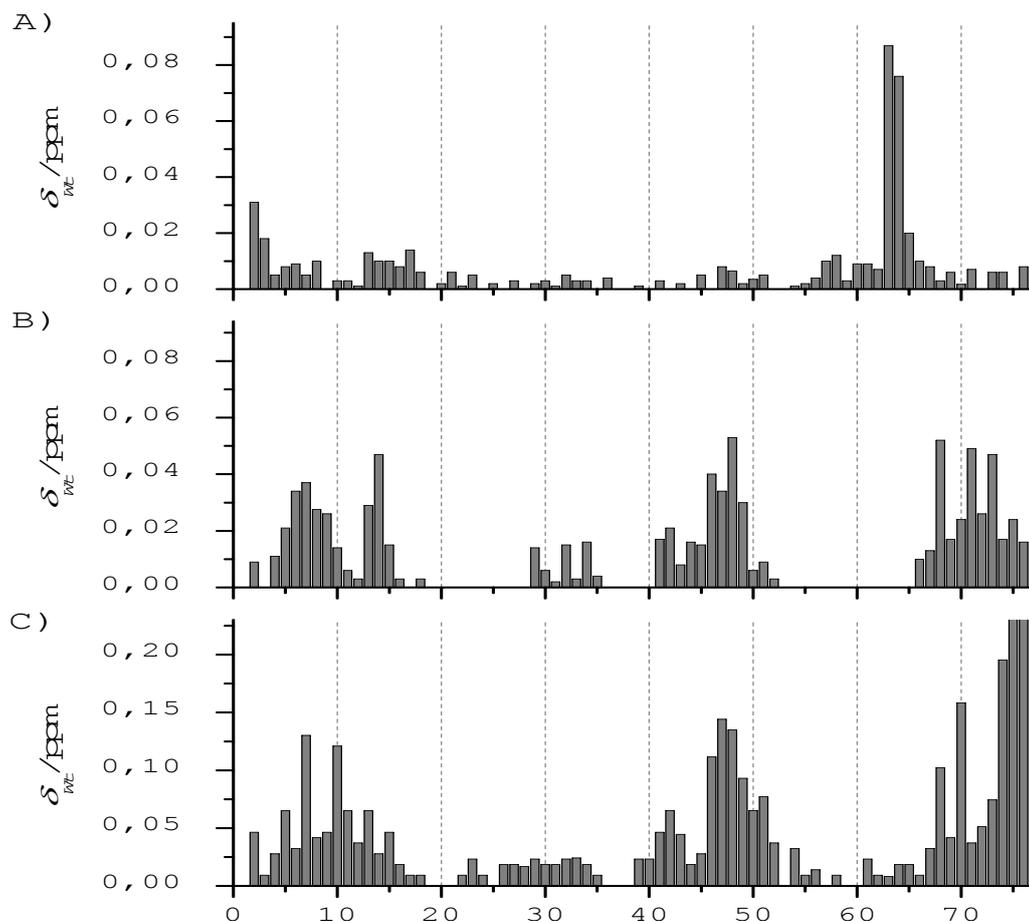
Mit den 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC-NMR bestätigte sich nochmals die spezifische Interaktion des Dodecapeptids mit Ubiquitin. So konnte klar gezeigt werden, mit welchen Aminosäuren des Ubiquitins das Dodecapeptid interagiert. Es zeigte sich eine klare räumliche Koinzidenz der natürlichen Lage des Peptids und der in der HSQC-Messung verschobenen Aminosäuren.

### 5.3.8 Ein Blick in die Literatur

Da sich das Forschungsgebiet Ubiquitin stetig erweitert und in den Fokus verschiedenster Forschungsgruppen rückt, soll hier ein kurzer Blick auf interessante Literatur geworfen werden, die während der Doktorarbeit veröffentlicht wurde, oder mit den hier erarbeiteten Ergebnissen rückblickend in Verbindung stehen.

#### 5.3.8.1 Shiftmuster von Polyubiquitin

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen von verschiedenen Poly-Ubiquitinen ist schon länger Gegenstand vieler Untersuchungen <sup>[293]</sup>. Unter anderem wurde dabei die Verknüpfung über Lys48 und Lys63 genauer untersucht. Interessanterweise zeigt das in dieser Dissertation untersuchte Dodecapeptid ein Verschiebungsmuster (Abb.5.178), das dem von Lys48-verknüpften Poly-Ubiquitin entspricht.



**Abb.5.178: Verschiebungsmuster von K48 und K63 Poly-Ubiquitin**

Ein Vergleich des Verschiebungsmusters zwischen K48 (unten) und K63 Poly-Ubiquitin (oben) mit dem Verschiebungsmuster von DPDELRFNIAIAL zeigt eine hohe Übereinstimmung zu K48 Poly-Ubiquitin.

Dies legt die Vermutung nahe, dass das Peptid an derselben Stelle mit Ubiquitin interagiert wie K48 Poly-Ubiquitin. Somit sollte ein unterschiedliches Bindungsverhalten zwischen K48 und K63-Poly-Ubiquitin an das gefundene Peptid zu beobachten sein, was damit eine Trennmöglichkeit für unterschiedliche Poly-Ubiquitine bieten würde. Jedoch sind solche Poly-Ubiquitine nicht kommerziell erhältlich.

### 5.3.8.2 Untersuchung einer Ubiquitin-bindenden Konsensus-Sequenz

Unterschiedliche Ubiquitin-bindende Peptide <sup>[19;375]</sup> wurden aus der Literatur zusammengetragen (Tab.5.15) und gegeneinander kompetiert. Trotz Expression in Drosophila konnte bisher die Funktion des „Ubiquitin-interacting Motifs“ (UIM) in vivo nicht aufgeklärt werden. Allen gemeinsam war eine relativ geringe Affinität von 240 µM bis hin zu mehr als 10.000 µM. Eine Literatursuche zeigte, dass das gefundene Dodecapeptid nicht als Ubiquitin-interagierendes Motiv eingestuft wird.

**Tab.5.15: Vergleich von Ubiquitin-interagierenden Peptiden**

Das als Ubiquitin-interagierende Dodecapeptid wurde mit Ubiquitin-interagierenden Peptiden (entnommen aus <sup>[19]</sup>) zur Deckung gebracht, wobei nur identisch besetzte Positionen markiert wurden (grau unterlegt).

Protein	Interagierende Sequenz	Bindungskonstante in µM
Eps15-2	QEQ <b>E</b> DLEL <b>AIAL</b> SKSEISEA	>10.000
Hrs-A	QEE <b>E</b> ELQL <b>AIAL</b> SQSEAEK	2110 ± 20
Vps27p-2	EE <b>DPDL</b> KAAIQES <b>L</b> REAEAA	1690 ± 40
Eps15-1	SEEDM <b>E</b> WAKRESEREEQR	907 ± 50
Hrs-B	KRDETALQEE <b>E</b> ELQL <b>AIAL</b> SQSEAEKERLRQKSTY	291 ± 12
Vps27p	<b>DEEEL</b> IR <b>KAI</b> ELSLKESRNS	246 ± 1
Stam1-A	KEE <b>E</b> DLAK <b>AIEL</b> SLKEQRQQ	217 ± 7
Stam1-B	TVANKKEE <b>E</b> DLAK <b>AIEL</b> SLKEQRQQSTTLST	203 ± 2
Stam2-B	MSSNKNKE <b>DE</b> DI <b>AKAI</b> ELSLQEQQQHTETKSLYPS	182 ± 2
UCH3	<b>DELRFNAI</b>	25 ± 6
UCH3	<b>DPDELRFNAIAL</b>	10 ± 2

Überraschenderweise stimmt die Sequenz DPDELRFNAIAL bis auf eine einzige Ausnahme mit jeder der veröffentlichten Sequenzen <sup>[19]</sup> an mindestens 4 Aminosäurepositionen überein. Dies ist eine außerordentlich hohe Übereinstimmung (33% Homologie) und kann als UIM gewertet werden.

Eine Konsensussequenz **XeeeXΦXXAXXXSXXe** wurde veröffentlicht <sup>[19]</sup> (wobei **e** eine negativ geladene, **Φ** eine hydrophobe Aminosäure, **A** und **S** essentiell sind, **X** ist eine beliebige Aminosäure) beschrieben.

Daher ist es schon aufgrund der Homologie nicht verwunderlich, dass sich das als Binder identifizierte Dodecapeptid in diese Konsensussequenz einreicht. Vergleicht man die Sequenz **DPDELRFN**AIAL des Dodecapeptids mit der Konsensus-Sequenz XeeX**Φ**XXAXXSXXe, so bilden Leucin und Phenylalanin den hydrophoben Anteil **Φ** und die beiden N-terminalen Asparaginsäuren passen auf die negativ geladenen Aminosäuren, ebenso wie das Alanin.

Verlängert man das „bindende“ Peptid entsprechend der natürlichen Sequenz, so erhält man **DPDELRFN**AIALSAA-COOH, welches nun nahezu alle Bedingungen dieser Konsensus-Sequenz XeeX**Φ**XXAXXSXXe erfüllt. Dies ist erstaunlich, da das Serin laut der Kristallstruktur (pdb-File 1XD3) sich im Inneren des Proteins befindet und daher nicht mit dem Ubiquitin in Kontakt treten kann.

Eine weitere Übereinstimmung des Dodecapeptids mit dem Sequenzen aus Tab.5.15 ist eine schnelle On- und Off-Kinetik. Jedoch zeichnet sich das heir gefundene Dodecapeptid durch eine mindestens 10-fach höhere Affinität und eine etwa 20-fach langsamere On- und Off-Kinetik. Ein deutliches Zeichen für eine bessere Interaktion.

### 5.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Ubiquitin-Liganden

Es sollten neue peptidische Liganden für Ubiquitin identifiziert und optimiert werden.

- Sequenzen von potentiell mit Ubiquitin-interagierenden Peptiden wurden aus Kristallstrukturen von Ubiquitin Protein-Komplexen abgeleitet.
- Mittels FCS-Messungen konnte die Dodecapeptid-Sequenz DPDELRFN**A**IAL als potentieller Binder identifiziert werden.
- Sowohl mit RfS- als auch mit ITC-Messungen war es möglich eine Affinität dieses Peptids im Bereich von 10-20  $\mu$ M nachzuweisen, so dass es als Ubiquitin-Ligand gewertet werden kann.
- Die schnelle On- und Off-Kinetik (bestätigt durch die RfS-Messung) verhinderte die Identifizierung von für die Bindung essentiellen Aminosäurenpositionen in der Sequenz DPDELRFN**A**IAL.
- Der Interaktionsbereich auf der Oberfläche von Ubiquitin konnte mit hochauflösender 2D- $[^{15}\text{N},^1\text{H}]$ -HSQC-NMR identifiziert werden und

bestätigte, dass das Peptid eine ähnliche Lage wie in der Kristallstruktur der humanen Ubiquitin Carboxy-Hydrolase einnimmt.

- Unabhängig von dieser Arbeit publizierte Ergebnisse lassen erwarten, dass das Dodecapeptid sich als Ubiquitin-interagierendes Motiv <sup>[19]</sup> einordnen lässt und wahrscheinlich eine höhere Affinität zu Lys63-Poly-Ubiquitin <sup>[293]</sup> (im Vergleich zu Lys48-Poly-Ubiquitin) besitzt.
- Insgesamt kann das Dodecapeptid als Leitstruktur für ein Ubiquitin-Affinitäts-Tag bezeichnet werden und besitzt das Potential für die Trennung verschiedener Ubiquitin-Polymere.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 LIPODOT

Es wurde die gesamte Technik und Methodik zur Herstellung eines sogenannten LIPODOT-Arrays entwickelt. Bei einem **LIPODOT-Array** handelt es sich um die statistische Anordnung von kreisförmigen, 10 bis 14  $\mu\text{m}$  durchmessenden, LIPODOTs auf einer hydrophoben Oberfläche. Ein LIPODOT enthält dabei ca. 250 attomol einer chemischen Verbindung mit einer  $\text{Pam}_3\text{Cys}$ -Gruppe, die sich über hydrophobe Wechselwirkungen an der Oberfläche zu einer selbstaggregierenden monomolekularen Schicht stabilisiert. Die Verbindungen für LIPODOT-Arrays werden mittels Festphasensynthese aufgebaut und von diesen direkt auf das Array übertragen. Somit erhält man eine Erweiterung des bisher bekannten „one bead - one compound“-Konzepts der Split-and-Mix-Festphasensynthese zum „one bead – one compound – one LIPODOT“ für LIPODOT-Arrays.

Der enorme Vorteil der entwickelten LIPODOT-Array-Technik ist, dass eine extrem große Anzahl an Verbindungen in nur einem einzigen Prozessschritt auf die Oberfläche als Array übertragen wird. Hierzu werden die Festphasen-Synthese-Beads auf einer „**Carrier Plate**“, zunächst in einer Monobeadschicht, angeordnet und dann die darauf enthaltenen Verbindungen in einem einzigen Phasen-Transferschritt auf eine „**Assay Plate**“ übertragen. Dieser Schritt beinhaltet sowohl die Freisetzung der Verbindungen, die Übertragung vom Bead auf die Assay Plate und die molekulare Selbstaggregation der Verbindungen zu LIPODOTs innerhalb von Sekunden. Die Übertragung einer beliebigen Anzahl von Verbindungen ist mit bisherigen Techniken nicht möglich. Darüber hinaus wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, jeden LIPODOT dem Bead zuzuordnen, aus dem er erzeugt wurde. Zur halbautomatischen Herstellung der LIPODOT-Arrays wurden entsprechende Apparaturen entwickelt.

Somit wurden Arrays mit bis zu 1.300.000 LIPODOTs und nahezu 100.000 unterschiedlicher Verbindungen hergestellt. Die Herstellungszeit war unabhängig von der Zahl der übertragenen Verbindungen. Diese Arrays wurden in Prototypbindungsassays untersucht und lieferten Ergebnisse, die vergleichbar mit „Standardassays“ waren.

## 6.2 Diffusionsvorrichtung

Die **Diffusionsvorrichtung** ist eine Apparatur, die als zweiter Themenkomplex entwickelt wurde. Sie ermöglicht es mittels Diffusion und nur 2 Pipettierschritten einen zweidimensionalen Konzentrationsgradienten herzustellen und ist zum gängigen 12-Well-Format kompatibel. Der erzeugte Konzentrationsgradient besteht aus zwei unterschiedlichen Wirkstoffen, die in zellulären Assays eingesetzt werden. So können Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wie mit herkömmlichen Assays direkt an Zellen untersucht werden, jedoch mit einer deutlich reduzierten Anzahl an Prozessierungsschritten. Zusätzlich wurde ein entsprechend miniaturisierter und auf 50 µm orts aufgelöster ELISA auf einem Siebdrucknetz entwickelt und seine Quantifizierbarkeit und Sensitivität nachgewiesen. Mit der Diffusionsvorrichtung erzeugte 2D-Gradienten aus Zellen stimulierenden Lipopeptiden wurden mit einem zellulären Interleukin-8-Ausschüttungs-Assay vermessen. Die Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit einem „pipettierten 2D-Gradienten“ in Form der flüssigkeitsgefüllten klassischen 96-Well-Platten. Weiterhin war es möglich mittels „Softlithographischen Printings“ einen dieser 2D-Gradienten aus Antikörpern auf eine Glasoberfläche zu übertragen und Zelladhäsionstests durchzuführen.

Die Erzeugung eines 2D-Konzentrationsgradienten über eine Konzentrationsänderung von drei Größenordnungen hinweg wurde somit durch zwei Pipettierschritte ermöglicht und stellt ein technisches Novum mit viel Potential dar, deren Kompatibilität mit gängigen Techniken nachgewiesen wurde.

## 6.3 Ubiquitinligand

Als dritter Themenkomplex wurde die Identifizierung eines **Ubiquitin-Liganden** mit vier verschiedenen physikalischen Messtechniken beschrieben. „Potentielle“ Liganden wurden aus bereits bekannten Kristallstrukturen von Ubiquitin-interagierenden Proteinen abgeleitet und anfänglich als Oktapeptide synthetisiert. Die erste Bindungsstudie wurde mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) durchgeführt und zeigte bei der Sequenz DELRFNAI eine schwache aber signifikante Bindung. Daraufhin wurde die Peptidsequenz entsprechend mit den

natürlichen Aminosäuren zum Dodecapeptid DPDELRFNAIAL erweitert. Diese Sequenz wurde mit Reflektometrischer-Interferenz-Spektroskopie (RIfS) eindeutig als Binder identifiziert. Weiterhin wurde mit diesem Peptid eine schnelle On- und Off-Kinetik nachgewiesen und es wurde eine Bindungskonstante von  $13,4 \pm 2,6 \mu\text{M}$  ermittelt. Während der Bearbeitung dieser Fragestellung wurde eine nicht-natürliche Sequenz eines Ubiquitin-interagierenden Peptids veröffentlicht. Dieses wurde ebenfalls synthetisiert und im Vergleich zu dem in dieser Arbeit identifizierten Dodecapeptid mit Isothermaler Kalorimetrie (ITC) vermessen. Die Bindungskonstante des nicht-natürlichen Peptids konnte bestätigt werden. Für das im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte Dodecapeptid DPDELRFNAIAL wurde die höchste Affinität mit einer Bindungskonstante von  $10 \pm 2 \mu\text{M}$  ermittelt. In einer Kooperation mit Dr. Stefan Freund (Prof. Dr. Alan Fersht, MRC Cambridge) konnte mittels hochauflösender  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSCQ-NMR-Messungen die entsprechende Interaktionsfläche von Ubiquitin mit dem Dodecapeptid identifiziert werden.

Aus der ursprünglichen Auswahl von potentiellen Ubiquitin-Liganden wurde somit das Dodecapeptid DPDELRFNAIAL eindeutig als Ligand für Ubiquitin mit einer Affinität von  $12 \pm 3 \mu\text{M}$  identifiziert. Weiterhin zeigten die NMR-Studien, dass es das Potential zur Diskriminierung verschiedener Ubiquitinpolymere (Lys48 und Lys63-Polyubiquitin) besitzt, da die Interaktion eine ähnliche chemische Verschiebung zu Lys48-Poly-Ubiquitin zeigte.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kamilli R., Persönliche Korrespondenz: *Bericht der Probenmessung mit Nanofilm* (2004)
2. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (1999) Kluwer Academic/Plenum Publishers,
3. www.zeptosens.com, *Aufbau des Wellenleiters*, (2006)
4. Price C.P., Newman D.J. *Principles and Practice of Immunoassay* (1991) Stockton Press,
5. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. *Prinzipien der Biochemie* (1998) Spektrum Akademischer Verlag, ISBN:3-8274-0325-1
6. (1969), NASA clean room techniques reduce OR contamination, *Hospitals*, **43**, 112-116.
7. Wilson,T. (1985), Scanning optical microscopy, *Prog.Clin.Biol.Res.*, **196**, 103-113.
8. Kretschmann E., Kroeger E. (1975), Reflection and transmission of light by a rough surface, including results for surface-plasmon effects, *J.Opt.Soc.Am.*, **65**, 150.
9. Di Stefano D.L., Wand A.J. (1987), Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR study of human ubiquitin: a main chain directed assignment and structure analysis, *Biochemistry*, **26**, 7272-7281.
10. Vijay-Kumar,S., Bugg,C.E., Wilkinson,K.D., Cook,W.J. (1985), Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **82**, 3582-3585.
11. Weiss,S. (1999), Fluorescence spectroscopy of single biomolecules, *Science*, **283**, 1676-1683.
12. Braun,V., Rehn,K. (1969), Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the E. coli cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure, *Eur.J.Biochem.*, **10**, 426-438.
13. Schwille,P., Bieschke,J., Oehlenschläger,F. (1997), Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies, *Biophys.Chem.*, **66**, 211-228.
14. Crowther,J.R. (1995), ELISA. Theory and practice, *Methods Mol.Biol.*, **42**, 1-218.
15. Ekins,R.P. (1974), Radioimmunoassay and saturation analysis. Basic principles and theory, *Br.Med.Bull.*, **30**, 3-11.
16. Mayer R.J., Ciechanover A., Rechsteiner M. *Protein Degradation Vol.1: Ubiquitin and the Chemistry of Life* (2005) WILEY-VCH Verlag, ISBN:3-527-30837-7
17. Mayer R.J., Ciechanover A., Rechsteiner M. *Protein Degradation Vol.2: The Ubiquitin-Proteasome System* (2005) WILEY-VCH Verlag, ISBN:3-527-31130-0
18. Reddy,M.M., Bachhawat-Sikder,K., Kodadek,T. (2004), Transformation of low-affinity lead compounds into high-affinity protein capture agents, *Chem.Biol.*, **11**, 1127-1137.
19. Miller,S.L., Malotky,E., O'Bryan,J.P. (2004), Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation, *J.Biol.Chem.*, **279**, 33528-33537.
20. Ekins,R.P., Chu,F.W. (1991), Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future, *Clin.Chem.*, **37**, 1955-1967.

21. Seeger,M., Ferrell,K., Dubiel,W. (1997), The 26S proteasome: a dynamic structure, *Mol.Biol.Rep.*, **24**, 83-88.
22. Voges,D., Zwickl,P., Baumeister,W. (1999), The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu.Rev.Biochem.*, **68**, 1015-1068.
23. Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W. et al (2001), The sequence of the human genome, *Science*, **291**, 1304-1351.
24. Lander,E.S., Linton,L.M., Birren,B., Nusbaum,C. et al (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, **409**, 860-921.
25. Pennisi,E. (2003), Human genome. Reaching their goal early, sequencing labs celebrate, *Science*, **300**, 409.
26. Martin,W.J. (1989), New technologies for large-genome sequencing, *Genome*, **31**, 1073-1080.
27. Sanger,F., Coulson,A.R. (1978), The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing, *FEBS Lett.*, **87**, 107-110.
28. Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **74**, 5463-5467.
29. Anderson,N.L., Anderson,N.G. (1998), Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, *Electrophoresis*, **19**, 1853-1861.
30. Lottspeich F. (1999), Proteomanalyse – ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen, *Angew.Chem.*, **111**, 2630-2647.
31. (2004), Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature*, **431**, 931-945.
32. Walsh C.T. *Posttranslational Modification of Proteins* (2006) Roberts and Company Publishers, ISBN:0-9747077-3-2
33. Kodadek,T. (2002), Inhibition of proteolysis and other posttranslational modifications with substrate-targeted inhibitors, *Biopolymers*, **66**, 134-140.
34. Hazelbauer,G.L. (2005), Myriad molecules in motion: simulated diffusion as a new tool to study molecular movement and interaction in a living cell, *J Bacteriol.*, **187**, 23-25.
35. Weinberg,R., Berkus,M. (1971), Computer simulation of a living cell. II, *Int.J.Biomed.Comput.*, **2**, 167-188.
36. (2006), The chipping Forecast, *Nat.Genet.*, **21 Suppl**, Special Supplement.
37. Christian J.S. (2002), Chipping Forecast II, *Nat.Genet.*, **32 Supp**, 526-532.
38. Brazma,A., Sarkans,U., Robinson,A., Vilo,J., Vingron,M., Hoheisel,J., Fellenberg,K. (2002), Microarray data representation, annotation and storage, *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.*, **77**, 113-139.
39. Pirrung M. (2002), Die Herstellung von DNA-Chips, *Angew.Chem.*, **114**, 1326-1341.
40. Rose S. (1998), Application of a Novel Microarraying System in Genomics Research and Drug Discovery, *Journal of the Association for Laboratory Automation*, **3**.
41. McGall,G.H., Christians,F.C. (2002), High-density genechip oligonucleotide probe arrays, *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.*, **77**, 21-42.

42. Cutler,D.J., Zwick,M.E., Carrasquillo,M.M., Yohn,C.T. et al (2001), High-throughput variation detection and genotyping using microarrays, *Genome Res.*, **11**, 1913-1925.
43. Warrington,J.A., Shah,N.A., Chen,X., Janis,M. et al (2002), New developments in high-throughput resequencing and variation detection using high density microarrays, *Hum.Mutat.*, **19**, 402-409.
44. Schena,M., Heller,R.A., Theriault,T.P., Konrad,K., Lachenmeier,E., Davis,R.W. (1998), Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics, *Trends Biotechnol.*, **16**, 301-306.
45. Schena M. *Mikroarray Analysis* (2003) John Wiley & Sons, Hoboken
46. Chakravarti,A. (1999), Population genetics--making sense out of sequence, *Nat.Genet.*, **21**, 56-60.
47. Sachidanandam,R., Weissman,D., Schmidt,S.C., Kakol,J.M. et al (2001), A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, **409**, 928-933.
48. Wang,D.G., Fan,J.B., Siao,C.J., Berno,A. et al (1998), Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science*, **280**, 1077-1082.
49. Foldes-Papp,Z. (2005), How the molecule number is correctly quantified in two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: corrections for cross-talk and quenching in experiments, *Curr.Pharm.Biotechnol.*, **6**, 437-444.
50. Gygi,S.P., Rochon,Y., Franza,B.R., Aebersold,R. (1999), Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, *Mol.Cell Biol.*, **19**, 1720-1730.
51. Eickhoff,H., Konthur,Z., Lueking,A., Lehrach,H. et al (2002), Protein array technology: the tool to bridge genomics and proteomics, *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.*, **77**, 103-112.
52. Schwenk J.M., *Miniaturisierte und parallelisierte Assaysysteme zur Charakterisierung von Bindemolekülen: Entwicklung für den Nachweis tumorrelevanter Markerproteine*, (2005) Dissertation,NMI Reutlingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
53. Kahn,P. (1995), From genome to proteome: looking at a cell's proteins, *Science*, **270**, 369-370.
54. Cretich,M., Damin,F., Pirri,G., Chiari,M. (2006), Protein and peptide arrays: recent trends and new directions, *Biomol.Eng*, **23**, 77-88.
55. Zhu,H., Snyder,M. (2001), Protein arrays and microarrays, *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **5**, 40-45.
56. Zhu,H., Bilgin,M., Snyder,M. (2003), Proteomics, *Annu.Rev.Biochem.*, **72**, 783-812.
57. Zhu,H., Bilgin,M., Bangham,R., Hall,D. et al (2001), Global analysis of protein activities using proteome chips, *Science*, **293**, 2101-2105.
58. Macbeath,G. (2002), Protein microarrays and proteomics, *Nat.Genet.*, **32 Suppl**, 526-532.
59. Macbeath,G., Schreiber,S.L. (2000), Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination, *Science*, **289**, 1760-1763.
60. Jones,S., Thornton,J.M. (1996), Principles of protein-protein interactions, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 13-20.
61. Kung,L.A., Snyder,M. (2006), Proteome chips for whole-organism assays, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*

62. BARAKAT,R.M., Ekins,R.P. (1961), Assay of vitamin B12 in blood. A simple method, *Lancet*, **2**, 25-26.
63. Brown,B.L., Ekins,R.P., Ellis,S.M., Reith,W.S. (1970), A radioimmunoassay for serum triiodothyronine, *J.Endocrinol.*, **46**, 142-148.
64. Ekins,R.P. (1993), New perspectives in radioimmunoassay, *Nucl.Med.Commun.*, **14**, 721-735.
65. Ekins,R.P. (1971), Basic concepts of saturation analysis techniques, *Curr.Top.Exp.Endocrinol.*, **1**, 1-39.
66. Ekins,R.P., Brown,B.L., Ellis,S.M., Reith,W.S. (1970), The radioimmunoassay of serum triiodothyronine, *Clin.Sci.*, **38**, 27P.
67. Ekins,R.P. (1989), Multi-analyte immunoassay, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **7**, 155-168.
68. Ekins,R.P. (1998), Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays, *Clin.Chem.*, **44**, 2015-2030.
69. Roth G, *Protein-Protein-Interaktionen an Mikrostrukturen*, (2002) Diplomarbeit,Fachbereich Biochemie, Universität Tübingen
70. Finckh P., Berger H., Karl J., Eichenlaub U. et al (2006), Microspot® – an ultrasensitive microarray based ligand assay system A practical application of ambient analyte assay theory, *Proc UK NEQAS Meeting*, **3**, 155-165.
71. Frank,R. (2002), The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications, *J.Immunol.Methods*, **267**, 13-26.
72. Frank,R., Overwin,H. (1996), SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes, *Methods Mol.Biol.*, **66**, 149-169.
73. Fodor,S.P., Read,J.L., Pirrung,M.C., Stryer,L., Lu,A.T., Solas,D. (1991), Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science*, **251**, 767-773.
74. Holmes,C.P., Adams,C.L., Kochersperger,L.M., Mortensen,R.B., Aldwin,L.A. (1995), The use of light-directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping, *Biopolymers*, **37**, 199-211.
75. Jacobs,J.W., Fodor,S.P. (1994), Combinatorial chemistry--applications of light-directed chemical synthesis, *Trends Biotechnol.*, **12**, 19-26.
76. Pease,A.C., Solas,D., Sullivan,E.J., Cronin,M.T., Holmes,C.P., Fodor,S.P. (1994), Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 5022-5026.
77. Kellar,K.L., Iannone,M.A. (2002), Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays, *Exp.Hematol.*, **30**, 1227-1237.
78. Nolan,J.P., Mandy,F. (2006), Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems, *Cytometry A*, **69**, 318-325.
79. Sha,M.Y., Walton,I.D., Norton,S.M., Taylor,M. et al (2006), Multiplexed SNP genotyping using nanobarcode particle technology, *Anal.Bioanal.Chem.*, **384**, 658-666.
80. Templin,M.F., Stoll,D., Bachmann,J., Joos,T.O. (2004), Protein microarrays and multiplexed sandwich immunoassays: what beats the beads?, *Comb.Chem.High Throughput.Screen.*, **7**, 223-229.

81. Vignali,D.A. (2000), Multiplexed particle-based flow cytometric assays, *J.Immunol.Methods*, **243**, 243-255.
82. Ramsay,G. (1998), DNA chips: state-of-the art, *Nat.Biotechnol.*, **16**, 40-44.
83. Lovrinovic,M., Niemeyer,C.M. (2005), DNA microarrays as decoding tools in combinatorial chemistry and chemical biology, *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, **44**, 3179-3183.
84. Bischoff F., Stadler V., Breitling F. (2002), Hochkomplexe Peptidarrays - Techniken, Anwendungen und Perspektiven, *BIOspektrum*, **5**, 654-657.
85. Hultschig,C., Kreuzberger,J., Seitz,H., Konthur,Z., Bussow,K., Lehrach,H. (2006), Recent advances of protein microarrays, *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **10**, 4-10.
86. Wilson,D.S., Nock,S. (2003), Recent developments in protein microarray technology, *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, **42**, 494-500.
87. Kodadek,T. (2001), Protein microarrays: prospects and problems, *Chem.Biol.*, **8**, 105-115.
88. Tomizaki,K.Y., Usui,K., Mihara,H. (2005), Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements, *Chembiochem.*, **6**, 782-799.
89. Schutkowski,M., Reineke,U., Reimer,U. (2005), Peptide arrays for kinase profiling, *Chembiochem.*, **6**, 513-521.
90. Alluri,P.G., Reddy,M.M., Bachhawat-Sikder,K., Olivos,H.J., Kodadek,T. (2003), Isolation of protein ligands from large peptoid libraries, *J.Am.Chem.Soc.*, **125**, 13995-14004.
91. Boutell,J.M., Hart,D.J., Godber,B.L., Kozlowski,R.Z., Blackburn,J.M. (2004), Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants, *Proteomics.*, **4**, 1950-1958.
92. Fukui,S., Feizi,T., Galustian,C., Lawson,A.M., Chai,W. (2002), Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions, *Nat.Biotechnol.*, **20**, 1011-1017.
93. Chiosis,G., Brodsky,J.L. (2005), Small molecule microarrays: from proteins to mammalian cells - are we there yet?, *Trends Biotechnol.*, **23**, 271-274.
94. Uttamchandani,M., Walsh,D.P., Yao,S.Q., Chang,Y.T. (2005), Small molecule microarrays: recent advances and applications, *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **9**, 4-13.
95. Barry,R., Soloviev,M. (2004), Quantitative protein profiling using antibody arrays, *Proteomics.*, **4**, 3717-3726.
96. Valle,R.P., Jendoubi,M. (2003), Antibody-based technologies for target discovery, *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.*, **6**, 197-203.
97. Knezevic,V., Leethanakul,C., Bichsel,V.E., Worth,J.M. et al (2001), Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays, *Proteomics.*, **1**, 1271-1278.
98. Fernandez,L.A. (2004), Prokaryotic expression of antibodies and affibodies, *Curr Opin Biotechnol.*, **15**, 364-373.
99. Wahlberg,E., Lendel,C., Helgstrand,M., Allard,P. et al (2003), An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding, *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 3185-3190.
100. Skerra,A. (2001), 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties, *J.Biotechnol.*, **74**, 257-275.
101. McCafferty,J., Griffiths,A.D., Winter,G., Chiswell,D.J. (1990), Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature*, **348**, 552-554.

102. Hanes, J., Pluckthun, A. (1997), In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 4937-4942.
103. Amstutz, P., Pelletier, J.N., Guggisberg, A., Jermutus, L., Cesaro-Tadic, S., Zahnd, C., Pluckthun, A. (2002), In vitro selection for catalytic activity with ribosome display, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9396-9403.
104. Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K.W. et al (1996), Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site, *J. Mol. Biol.*, **263**, 551-567.
105. Sender A. (2002), Gets Chemical – Bridging the genome-to-drug gap: Infinity, Graffinity, Ambit, Amphora, and more, *Genome Technology*, **3**, 41-48.
106. Uttamchandani, M., Walsh, D.P., Khersonsky, S.M., Huang, X., Yao, S.Q., Chang, Y.T. (2004), Microarrays of tagged combinatorial triazine libraries in the discovery of small-molecule ligands of human IgG, *J. Comb. Chem.*, **6**, 862-868.
107. Walsh, D.P., Chang, Y.T. (2004), Recent advances in small molecule microarrays: applications and technology, *Comb. Chem. High Throughput. Screen.*, **7**, 557-564.
108. Kanoh, N., Kyo, M., Inamori, K., Ando, A., Asami, A., Nakao, A., Osada, H. (2006), SPR Imaging of Photo-Cross-Linked Small-Molecule Arrays on Gold, *Anal. Chem.*, **78**, 2226-2230.
109. Kanoh, N., Honda, K., Simizu, S., Muroi, M., Osada, H. (2005), Photo-Cross-Linked Small-Molecule Affinity Matrix for Facilitating Forward and Reverse Chemical Genetics, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **44**, 4282.
110. Tan, D.S. (2005), Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 74-84.
111. Panse, S., Dong, L., Burian, A., Carus, R., Schutkowski, M., Reimer, U., Schneider-Mergener, J. (2004), Profiling of generic anti-phosphopeptide antibodies and kinases with peptide microarrays using radioactive and fluorescence-based assays, *Mol. Divers.*, **8**, 291-299.
112. Merrifield, R.B. (1965), Solid-Phase Peptide Syntheses, *Endeavour*, **24**, 3-7.
113. Merrifield, R.B., Stewart, J.M., Jernberg, N. (1966), Instrument for automated synthesis of peptides, *Anal. Chem.*, **38**, 1905-1914.
114. Shin, D.S., Kim, D.H., Chung, W.J., Lee, Y.S. (2005), Combinatorial solid phase peptide synthesis and bioassays, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 517-525.
115. Andre T., *Nickel-NTA-Multichelatoren auf Oberflächen im Mikroarrayformat sowie Peptidmikroarrays durch Native Chemische Ligation*, (2006) Dissertation, Institut für Organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
116. Barone, A.D., Beecher, J.E., Bury, P.A., Chen, C., Doede, T., Fidanza, J.A., McGall, G.H. (2001), Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 525-531.
117. Li, S., Bowerman, D., Marthandan, N., Klyza, S., Luebke, K.J., Garner, H.R., Kodadek, T. (2004), Photolithographic synthesis of peptoids, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4088-4089.
118. Li, S., Marthandan, N., Bowerman, D., Garner, H.R., Kodadek, T. (2005), Photolithographic synthesis of cyclic peptide arrays using a differential deprotection strategy, *Chem. Commun. (Camb.)*, **5**, 581-583.
119. Williams, R.T., Bridges, J.W. (1964), Fluorescence of Solutions: A Review, *J. Clin. Pathol.*, **17**, 371-394.

120. dos Remedios,C.G., Moens,P.D. (1995), Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor, *J.Struct.Biol.*, **115**, 175-185.
121. Silvius,J.R., Nabi,I.R. (2006), Fluorescence-quenching and resonance energy transfer studies of lipid microdomains in model and biological membranes, *Mol.Membr.Biol.*, **23**, 5-16.
122. Clegg,R.M. (1992), Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids, *Methods Enzymol.*, **211**, 353-388.
123. Clegg,R.M. (2002), FRET tells us about proximities, distances, orientations and dynamic properties, *J.Biotechnol.*, **82**, 177-179.
124. Clegg,R.M. (1995), Fluorescence resonance energy transfer, *Curr.Opin.Biotechnol.*, **6**, 103-110.
125. Ha,T., Enderle,T., Ogletree,D.F., Chemla,D.S., Selvin,P.R., Weiss,S. (1996), Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 6264-6268.
126. Hachmeister,U., Kracht,J. (1975), Basic features in immunohistological technique (author's transl), *Microsc.Acta*, **77**, 213-220.
127. Burghardt,T.P., Thompson,N.L. (1984), Effect of planar dielectric interfaces on fluorescence emission and detection. Evanescent excitation with high-aperture collection, *Biophys.J.*, **46**, 729-737.
128. Hutchinson,A.M. (1995), Evanescent wave biosensors. Real-time analysis of biomolecular interactions, *Mol.Biotechnol.*, **3**, 47-54.
129. Brecht,A., Gauglitz,G. (1995), Optical probes and transducers, *Biosens.Bioelectron.*, **10**, 923-936.
130. Place,J.F., Sutherland,R.M., Dahne,C. (1985), Opto-electronic immunosensors: a review of optical immunoassay at continuous surfaces, *Biosensors.*, **1**, 321-353.
131. Bluestein,B.I., Chen,S.Y. (1990), Rapid response fiber optic evanescent wave immunosensors, *Immunol.Ser.*, **53**, 145-170.
132. Carlyon,E.E., Lowe,C.R., Reid,D., Bennion,I. (1992), A single mode fibre-optic evanescent wave biosensor, *Biosens.Bioelectron.*, **7**, 141-146.
133. DeLisa,M.P., Zhang,Z., Shiloach,M., Pilevar,S., Davis,C.C., Sirkis,J.S., Bentley,W.E. (2000), Evanescent wave long-period fiber bragg grating as an immobilized antibody biosensor, *Anal.Chem.*, **72**, 2895-2900.
134. Squillante,E., III (1998), Applications of fiber-optic evanescent wave spectroscopy, *Drug Dev.Ind.Pharm.*, **24**, 1163-1175.
135. Sosnowski,R., Heller,M.J., Tu,E., Forster,A.H., Radtkey,R. (2002), Active microelectronic array system for DNA hybridization, genotyping and pharmacogenomic applications, *Psychiatr.Genet.*, **12**, 181-192.
136. Ababou,A., Ladbury,J.E. (2006), Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry, *J.Mol.Recognit.*, **19**, 79-89.
137. Rosseneu,M. (1986), Isothermal calorimetry of apolipoproteins, *Methods Enzymol.*, **128**, 365-375.
138. Meldal,M. (2002), The one-bead two-compound assay for solid phase screening of combinatorial libraries, *Biopolymers*, **66**, 93-100.

139. Kramer,S., Xie,H., Gaff,J., Williamson,J.R. et al (2004), Preparation of protein gradients through the controlled deposition of protein-nanoparticle conjugates onto functionalized surfaces, *J.Am.Chem.Soc.*, **126**, 5388-5395.
140. Finley,D., Ciechanover,A., Varshavsky,A. (2004), Ubiquitin as a central cellular regulator, *Cell*, **116**, S29-32, 2.
141. Arnold,J., Dawson,S., Fergusson,J., Lowe,J., Landon,M., Mayer,R.J. (1998), Ubiquitin and its role in neurodegeneration, *Prog.Brain Res.*, **117**, 23-34.
142. Coleman,M.P., Ribchester,R.R. (2004), Programmed axon death, synaptic dysfunction and the ubiquitin proteasome system, *Curr.Drug Targets.CNS.Neurol.Disord.*, **3**, 227-238.
143. Dawson,T.M., Dawson,V.L. (2003), Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease, *Science*, **302**, 819-822.
144. Horton,K., Forsyth,C.S., Sibtain,N., Ball,S., Bruton,C.J., Royston,M.C., Roberts,G.W. (1993), Ubiquitination as a probe for neurodegeneration in the brain in schizophrenia: the prefrontal cortex, *Psychiatry Res.*, **48**, 145-152.
145. Layfield,R., Lowe,J., Bedford,L. (2005), The ubiquitin-proteasome system and neurodegenerative disorders, *Essays Biochem.*, **41**, 157-171.
146. Mayer,R.J., Laszlo,L., Landon,M., Hope,J., Lowe,J. (1992), Ubiquitin, lysosomes, and neurodegenerative diseases, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **674**, 149-160.
147. Ross,C.A., Pickart,C.M. (2004), The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases, *Trends Cell Biol.*, **14**, 703-711.
148. Wada,K., Osaka,H., Aoki,S., Wang,Y.L. (2001), The ubiquitin-proteasome system and neurodegeneration, *Rinsho Shinkeigaku*, **41**, 1072-1074.
149. Arnold,D., Driscoll,J., Androlewicz,M., Hughes,E., Cresswell,P., Spies,T. (1992), Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules, *Nature*, **360**, 171-174.
150. Fleckenstein,B., Jung,G., Wiesmuller,K.H. (1999), Quantitative analysis of peptide-MHC class II interaction, *Semin.Immunol.*, **11**, 405-416.
151. Früh K., Yang Y. (1999), Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma, *Curr.Opin.Immunol.*, **11**, 76-81.
152. Kloetzel,P.M., Ossendorp,F. (2004), Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation, *Curr.Opin.Immunol.*, **16**, 76-81.
153. Kloetzel,P.M. (2004), The proteasome and MHC class I antigen processing, *Biochim.Biophys.Acta*, **1695**, 225-233.
154. Pamer,E., Cresswell,P. (1998), Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing, *Annu.Rev.Immunol.*, **16**, 323-358.
155. Shastri,N., Schwab,S., Serwold,T. (2002), Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules, *Annu.Rev.Immunol.*, **20**, 463-493.
156. Wilson,D.S., Nock,S. (2002), Functional protein microarrays, *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **6**, 81-85.
157. Kane,R.S., Takayama,S., Ostuni,E., Ingber,D.E., Whitesides,G.M. (1999), Patterning proteins and cells using soft lithography, *Biomaterials*, **20**, 2363-2376.

158. Angenendt,P., Glokler,J., Sobek,J., Lehrach,H., Cahill,D.J. (2003), Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications, *J.Chromatogr.A*, **1009**, 97-104.
159. Koga,T., Morita,M., Ishida,H., Yakabe,H. et al (2005), Dependence of the molecular aggregation state of octadecylsiloxane monolayers on preparation methods, *Langmuir*, **21**, 905-910.
160. Brogan,K.L., Schoenfish,M.H. (2005), Influence of antibody immobilization strategy on molecular recognition force microscopy measurements, *Langmuir*, **21**, 3054-3060.
161. Brogan,K.L., Shin,J.H., Schoenfish,M.H. (2004), Influence of surfactants and antibody immobilization strategy on reducing nonspecific protein interactions for molecular recognition force microscopy, *Langmuir*, **20**, 9729-9735.
162. Stuber,W., Knolle,J., Breipohl,G. (1989), Synthesis of peptide amides by Fmoc-solid-phase peptide synthesis and acid labile anchor groups, *Int.J.Pept.Protein Res.*, **34**, 215-221.
163. Zeng,W., Regamey,P.O., Rose,K., Wang,Y., Bayer,E. (1997), Use of Fmoc-N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)amino acids in peptide synthesis, *J.Pept.Res.*, **49**, 273-279.
164. Watzke,A., Gutierrez-Rodriguez,M., Kohn,M., Wacker,R. et al (2006), A generic building block for C- and N-terminal protein-labeling and protein-immobilization, *Bioorg.Med.Chem.*
165. Kohn,M., Wacker,R., Peters,C., Schroder,H. et al (2003), Staudinger ligation: a new immobilization strategy for the preparation of small-molecule arrays, *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, **42**, 5830-5834.
166. Mateo,C., Fernandez-Lorente,G., Abian,O., Fernandez-Lafuente,R., Guisan,J.M. (2000), Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage, *Biomacromolecules.*, **1**, 739-745.
167. Mateo,C., Torres,R., Fernandez-Lorente,G., Ortiz,C. et al (2003), Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method, *Biomacromolecules.*, **4**, 772-777.
168. Heiduschka P., Göpel W., Beck W., Kraas W., Kienle S., Jung G. (1996), Microstructured Peptide-Functionalised Surfaces by Electrochemical Polymerisation, *Chem.Eur.J.*, **2**, 667-672.
169. Heiduschka P., Beck W., Kraas W., Kienle S., Jung G., Göpel W. (1996), Surface Attachment Of Functional Peptides BY Electrochemical Polymerisation, *Surface Modification of Polymeric Biomaterials*135-146.
170. Mack J., Leipert D., .,B.A., Knoll W., Jung G. (1999), Anodic Polymerization of Phenol-Modified Biotin: Patterned Deposition and Layer Characterization, *Adv.Mater.*, **11**, 809-814.
171. Lesaichere,M.L., Lue,R.Y., Chen,G.Y., Zhu,Q., Yao,S.Q. (2002), Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray, *J.Am.Chem.Soc.*, **124**, 8768-8769.
172. Rowe,C.A., Tender,L.M., Feldstein,M.J., Golden,J.P. et al (1999), Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes, *Anal.Chem.*, **71**, 3846-3852.
173. Junttila,M.R., Saarinen,S., Schmidt,T., Kast,J., Westermarck,J. (2005), Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells, *Proteomics.*, **5**, 1199-1203.

174. Keefe,A.D., Wilson,D.S., Seelig,B., Szostak,J.W. (2001), One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag, *Protein Expr.Purif.*, **23**, 440-446.
175. Maier,T., Drapal,N., Thanbichler,M., Bock,A. (1998), Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis, *Anal.Biochem.*, **259**, 68-73.
176. Schmidt,T.G., Koepke,J., Frank,R., Skerra,A. (1996), Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin, *J.Mol.Biol.*, **255**, 753-766.
177. Schmidt,T.G., Skerra,A. (1994), One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin, *J.Chromatogr.A*, **676**, 337-345.
178. Skerra,A., Schmidt,T.G. (1999), Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag, *Biomol.Eng*, **16**, 79-86.
179. Evan,G.I., Lewis,G.K., Ramsay,G., Bishop,J.M. (1985), Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product, *Mol.Cell Biol.*, **5**, 3610-3616.
180. Hilpert,K., Hansen,G., Wessner,H., Kuttner,G., Welfle,K., Seifert,M., Hohne,W. (2001), Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose, *Protein Eng*, **14**, 803-806.
181. Kawahashi,Y., Doi,N., Takashima,H., Tsuda,C. et al (2003), In vitro protein microarrays for detecting protein-protein interactions: application of a new method for fluorescence labeling of proteins, *Proteomics.*, **3**, 1236-1243.
182. Quinn,J., Patel,P., Fitzpatrick,B., Manning,B. et al (1999), The use of regenerable, affinity ligand-based surfaces for immunosensor applications, *Biosens.Bioelectron.*, **14**, 587-595.
183. Oh B.K., Kim Y.K., Lee W., Bae Y.M., Lee W.H., Choi J.W. (2003), Patterning of photosensitive polyimide LB film and its application in the fabrication of biomolecular microphotodiode array, *Biosens.Bioelectron.*, **18**, 605-611.
184. Zhang,Z., Zhu,W., Kodadek,T. (2000), Selection and application of peptide-binding peptides, *Nat.Biotechnol.*, **18**, 71-74.
185. Shah,N.K., Rejto,P.A., Verkhivker,G.M. (1997), Structural consensus in ligand-protein docking identifies recognition peptide motifs that bind streptavidin, *Proteins*, **28**, 421-433.
186. Nieba,L., Nieba-Axmann,S.E., Persson,A., Hamalainen,M. et al (1997), BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip, *Anal.Biochem.*, **252**, 217-228.
187. Stiborova,H., Kostal,J., Mulchandani,A., Chen,W. (2003), One-step metal-affinity purification of histidine-tagged proteins by temperature-triggered precipitation, *Biotechnol.Bioeng.*, **82**, 605-611.
188. Wegner,G.J., Lee,H.J., Marriott,G., Corn,R.M. (2003), Fabrication of histidine-tagged fusion protein arrays for surface plasmon resonance imaging studies of protein-protein and protein-DNA interactions, *Anal.Chem.*, **75**, 4740-4746.
189. Schaeferling,M., Schiller,S., Paul,H., Kruschina,M. et al (2002), Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces, *Electrophoresis*, **23**, 3097-3105.
190. Ekins,R.P. (1971), Radioimmunoassay, protein-binding assay and other saturation assay techniques, *Practitioner*, **207**, 312-321.

191. Ha, T., Ting, A.Y., Liang, J., Caldwell, W.B. et al (1999), Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 893-898.
192. Haustein, E., Schwille, P. (2004), Single-molecule spectroscopic methods, *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **14**, 531-540.
193. Schwille, P., Kettling, U. (2001), Analyzing single protein molecules using optical methods, *Curr.Opin.Biotechnol.*, **12**, 382-386.
194. Herman, B. (1999), Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, Vol. 2, Edited by Jan Slavik 1998. Plenum Press, New York and London. 292 pages. (hardback, \$95.00), *Microsc.Microanal.*, **5**, 147.
195. Becker S., Gregor I., Thiel E. (1998), Photoreactions of Rhodamine Dyes in Basic Solvents, *Chem.Phys.Lett.*, **283**, 350-356.
196. Förster T. (1948), Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann.Phys.*, **2**, 55-75.
197. Sarkar, R., Shaw, A.K., Narayanan, S.S., Dias, F., Monkman, A., Pal, S.K. (2006), Direct observation of protein folding in nanoenvironments using a molecular ruler, *Biophys.Chem.*
198. Schuler, B., Lipman, E.A., Eaton, W.A. (2002), Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy, *Nature*, **419**, 743-747.
199. Usui, K., Takahashi, M., Nokihara, K., Mihara, H. (2004), Peptide arrays with designed alpha-helical structures for characterization of proteins from FRET fingerprint patterns, *Mol.Divers.*, **8**, 209-218.
200. Mayor, U., Gydosh, N.R., Johnson, C.M., Grossmann, J.G. et al (2003), The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds, *Nature*, **421**, 863-867.
201. Foldes-Papp, Z., Demel, U., Domej, W., Tilz, G.P. (2002), A new dimension for the development of fluorescence-based assays in solution: from physical principles of FCS detection to biological applications, *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, **227**, 291-300.
202. Wilson, T. (1989), Trends in confocal microscopy, *Trends Neurosci.*, **12**, 486-493.
203. Gell C., Brockwell D.J., Beddard G.S., Radford S.E., Kalverda A.P., Smith D.A. (2001), Accurate Use of Single Molecule Fluorescence Correlation Spectroscopy to Determine Molecular Diffusion Times, *Single Molecules*, **2**, 177-181.
204. Widengren J., Mets Ü., Rigler R. (1995), Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution :a theoretical and experimental study, *J.Chem.Phys.*, **99**, 13368-13379.
205. Einstein A. (1905), Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *AdP*, **17**, 549-560.
206. Einstein A. (1906), Zur Theorie der Brownschen Bewegung, *AdP*, **19**, 371-381.
207. Smoluchowski M. (1916), Zusammenfassende Bearbeitungen, *Physik Z.*, **17**, 557-585.
208. Schwille, P., Kummer, S., Heikal, A.A., Moerner, W.E., Webb, W.W. (2000), Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 151-156.
209. Schwille P., *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*, (1996) Dissertation ISBN:3-930333-14-7

210. Brock,R., Vamosi,G., Vereb,G., Jovin,T.M. (1999), Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 10123-10128.
211. Koppel D.E. (1994), Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy, *Phys.Rev.A*, **10**, 1938-1945.
212. Qian,H., Raymond,G.M., Bassingthwaite,J.B. (1999), Stochastic fractal behavior in concentration fluctuation and fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys.Chem.*, **80**, 1-5.
213. Qian,H. (1990), On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys.Chem.*, **38**, 49-57.
214. Wohland,T., Rigler,R., Vogel,H. (2001), The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys.J.*, **80**, 2987-2999.
215. Mader O., *Untersuchung von Peptid-Protein-Wechselwirkungen mit fluoreszenzbasierten und markierungsfreien Detektionsmethoden sowie Struktur-Eigenschafts-Analyse von Pentamethin-Indocyaninfarbstoffen*, (2004) Dissertation, Institut für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
216. Heinze,K.G., Rarbach,M., Jahnz,M., Schwille,P. (2002), Two-photon fluorescence coincidence analysis: rapid measurements of enzyme kinetics, *Biophys.J.*, **83**, 1671-1681.
217. Kim,S.A., Heinze,K.G., Bacia,K., Waxham,M.N., Schwille,P. (2005), Two-photon cross-correlation analysis of intracellular reactions with variable stoichiometry, *Biophys.J.*, **88**, 4319-4336.
218. Schwille,P., Meyer-Almes,F.J., Rigler,R. (1997), Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophys.J.*, **72**, 1878-1886.
219. Kettling,U., Koltermann,A., Schwille,P., Eigen,M. (1998), Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 1416-1420.
220. Stoevesandt O., Köhler K., Fischer R., Johnston I.C.D., Brock R (2005), One-step analysis of molecular complexes in microliters of cell lysate, *Nature Methods*, **2**, 833-835.
221. Heinze,K.G., Jahnz,M., Schwille,P. (2004), Triple-color coincidence analysis: one step further in following higher order molecular complex formation, *Biophys.J.*, **86**, 506-516.
222. Burkhardt,M., Heinze,K.G., Schwille,P. (2005), Four-color fluorescence correlation spectroscopy realized in a grating-based detection platform, *Opt.Lett.*, **30**, 2266-2268.
223. Betzig E., Trautman J.K. (1992), Near-field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit, *Science* **257:189-195**, **257**, 189-195.
224. Piehler,J., Brecht,A., Gauglitz,G., Maul,C., Grabley,S., Zerlin,M. (1997), Specific binding of low molecular weight ligands with direct optical detection, *Biosens.Bioelectron.*, **12**, 531-538.
225. Piehler,J., Brecht,A., Gauglitz,G., Zerlin,M., Maul,C., Thiericke,R., Grabley,S. (1997), Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal.Biochem.*, **249**, 94-102.
226. Kroger,K., Bauer,J., Fleckenstein,B., Rademann,J., Jung,G., Gauglitz,G. (2002), Epitope-mapping of transglutaminase with parallel label-free optical detection, *Biosens.Bioelectron.*, **17**, 937-944.
227. Quinn,J.G., O'Neill,S., Doyle,A., McAtamney,C., Diamond,D., MacCraith,B.D., O'Kennedy,R. (2000), Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions, *Anal.Biochem.*, **281**, 135-143.

228. Wegner,G.J., Wark,A.W., Lee,H.J., Codner,E., Saeki,T., Fang,S., Corn,R.M. (2004), Real-time surface plasmon resonance imaging measurements for the multiplexed determination of protein adsorption/desorption kinetics and surface enzymatic reactions on peptide microarrays, *Anal.Chem.*, **76**, 5677-5684.
229. Edwards,D.A. (2004), Refining the measurement of rate constants in the BIAcore, *J.Math.Biol.*, **49**, 272-292.
230. Ekgasit,S., Thammacharoen,C., Yu,F., Knoll,W. (2004), Evanescent field in surface plasmon resonance and surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopies, *Anal.Chem.*, **76**, 2210-2219.
231. Steiner,G. (2004), Surface plasmon resonance imaging, *Anal.Bioanal.Chem.*, **379**, 328-331.
232. Pawlak,M., Schick,E., Bopp,M.A., Schneider,M.J., Oroszlan,P., Ehrat,M. (2002), Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis, *Proteomics.*, **2**, 383-393.
233. , *Aufbau des Wellenleiters*, (2006)
234. Hell,S.W., Dyba,M., Jakobs,S. (2004), Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy, *Curr.Opin.Neurobiol.*, **14**, 599-609.
235. Hell,S.W. (2003), Toward fluorescence nanoscopy, *Nat.Biotechnol.*, **21**, 1347-1355.
236. Egner,A., Hell,S.W. (2005), Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections, *Trends Cell Biol.*, **15**, 207-215.
237. Zhang,F., Pedrini,G., Osten,W. (2006), Reconstruction algorithm for high-numerical-aperture holograms with diffraction-limited resolution, *Opt.Lett.*, **31**, 1633-1635.
238. Shuman,H., Murray,J.M., DiLullo,C. (1989), Confocal microscopy: an overview, *Biotechniques*, **7**, 154-163.
239. Atkins P.W. *Physikalische Chemie* (1994) WILEY-VCH Verlag,
240. Ackermann T. *Physikalische Biochemie* (1992) Springer-Verlag, ISBN:3-540-5405-5
241. Fick A. (1855), Law of diffusion, *Poggendorff's Annel.Physik*, **94**, 59-86.
242. Fourier J. (1822), The Analytic Theory of Heat, *Cambridge Press* 1978.
243. Crank J. *The mathematics of diffusion* (1975) Clarndon Press,
244. Nernst W. (1888), Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper, *Z.physik.Chem.*, **2**, 613-637.
245. Merrifield,R.B., Stewart,J.M. (1965), Automated peptide synthesis, *Nature*, **207**, 522-523.
246. Lübke K., Schröder E., Kloss G. *Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine I* (1975) Georg Thieme Verlag,
247. Lübke K., Schröder E., Kloss G. *Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine II* (1975) Georg Thieme Verlag,
248. Jung G. *Combinatorial Chemistry* (1999) WILEY-VCH Verlag,
249. Jung G. *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (1996) Wiley-VCH, ISBN:3-527-29380-9

250. Dooley,C.T., Houghten,R.A. (1993), The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands, *Life Sci.*, **52**, 1509-1517.
251. Dooley,C.T., Houghten,R.A. (1998), Synthesis and screening of positional scanning combinatorial libraries, *Methods Mol.Biol.*, **87**, 13-24.
252. Bessler,W.G., Jung,G. (1992), Synthetic lipopeptides as novel adjuvants, *Res.Immunol.*, **143**, 548-553.
253. Schaude R., *B-Zell-Epitop Feinbestimmung der HIV-1 Proteine Nef und gp41 mittels Lipopeptiden*, (1990) Thesis, Institut für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
254. Wiesmuller,K.H., Fleckenstein,B., Jung,G. (2001), Peptide vaccines and peptide libraries, *Biol.Chem.*, **382**, 571-579.
255. Lam,K.S., Sroka,T., Chen,M.L., Zhao,Y., Lou,Q., Wu,J., Zhao,Z.G. (1998), Application of "one-bead one-compound" combinatorial library methods in signal transduction research, *Life Sci.*, **62**, 1577-1583.
256. Lam,K.S. (1998), Enzyme-linked colorimetric screening of a one-bead one-compound combinatorial library, *Methods Mol.Biol.*, **87**, 7-12.
257. Liu,R., Marik,J., Lam,K.S. (2003), Design, synthesis, screening, and decoding of encoded one-bead one-compound peptidomimetic and small molecule combinatorial libraries, *Methods Enzymol.*, **369**, 271-287.
258. Liu,R., Marik,J., Lam,K.S. (2002), A novel peptide-based encoding system for "one-bead one-compound" peptidomimetic and small molecule combinatorial libraries, *J.Am.Chem.Soc.*, **124**, 7678-7680.
259. Bernardi G., Vance D.E., Vance J.E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (2002) Elsevier,
260. Braun,V., Gnrirke,H., Henning,U., Rehn,K. (1973), Model for the structure of the shape-maintaining layer of the Escherichia coli cell envelope, *J.Bacteriol.*, **114**, 1264-1270.
261. Braun,V., Rehn,K., Wolff,H. (1970), Supramolecular structure of the rigid layer of the cell wall of Salmonella, Serratia, Proteus, and Pseudomonas fluorescens. Number of lipoprotein molecules in a membrane layer, *Biochemistry*, **9**, 5041-5049.
262. Braun,V., Rotering,H., Ohms,J.P., Hagenmaier,H. (1976), Conformational studies on murein-lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli, *Eur.J.Biochem.*, **70**, 601-610.
263. Hantke,K., Braun,V. (1973), Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane, *Eur.J.Biochem.*, **34**, 284-296.
264. Bessler,W.G., Cox,M., Wiesmuller,K.H., Jung,G. (1984), The mitogenic principle of Escherichia coli lipoprotein: B-lymphocyte mitogenicity of the synthetic analogue palmitoyl-tetrapeptide (Pam-Ser-Ser-Asn-Ala), *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **121**, 55-61.
265. Muhlradt,P.F., Kiess,M., Meyer,H., Sussmuth,R., Jung,G. (1997), Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from Mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration, *J.Exp.Med.*, **185**, 1951-1958.
266. Metzger,J.W., Beck-Sickinger,A.G., Loleit,M., Eckert,M., Bessler,W.G., Jung,G. (1995), Synthetic S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteinyll peptides derived from the N-terminus of the cytochrome subunit of the photoreaction centre of Rhodospseudomonas viridis enhance murine splenocyte proliferation, *J.Pept.Sci.*, **1**, 184-190.

267. Bessler W., Resch K., Hancock E., Hantke W. (1977), Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives of lipoprotein from outer membranes of *E. coli*, *Z Immunitätsforschung*, **153**, 11.
268. Wiesmüller K.H., *Synthetische Lipopeptid-Impfstoffe*, (1991) Dissertation, Institut für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
269. Wiesmüller K.H., Bessler W., Jung G. (1983), Synthesis of the Mitogenic S-2,3-Bis(palmitoyloxy)-propyl-N-palmitoylpentapeptide from *Escherichia coli* Lipoprotein, *Biol Chem Hoppe Seyler*, **364**, 593-606.
270. Bessler, W.G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K.H., Jung, G. (1985), Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes, *J. Immunol.*, **135**, 1900-1905.
271. Johnson, R.B., Kohl, S., Wiesmüller, K., Jung, G., Bessler, W.G. (1983), Synthetic analogues of the N-terminal lipid part of bacterial lipoprotein are B-lymphocyte mitogens in vitro and in vivo, *Immunobiology*, **165**, 27-35.
272. Deres, K., Schild, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Rammensee, H.G. (1989), In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine, *Nature*, **342**, 561-564.
273. Jung G., Wiesmüller K.H., Becker G., Bühring H.J., Bessler W.G. (1985), Increased Production of Specific Antibodies by Presentation of the Antigen determinants with Covalently Coupled Lipopeptide Mitogens, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **24**, 872-873.
274. Bessler, W.G., Suhr, B., Bühring, H.J., Müller, C.P., Wiesmüller, K.H., Becker, G., Jung, G. (1985), Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant, *Immunobiology*, **170**, 239-244.
275. Scott, D., Nitecki, D.E., Kindler, H., Goodman, J.W. (1984), Immunogenicity of biotinylated hapten-avidin complexes, *Mol. Immunol.*, **21**, 1055-1060.
276. Prass, W., Ringsdorf, H., Bessler, W., Wiesmüller, K.H., Jung, G. (1987), Lipopeptides of the N-terminus of *Escherichia coli* lipoprotein: synthesis, mitogenicity and properties in monolayer experiments, *Biochim. Biophys. Acta*, **900**, 116-128.
277. Metzger J., *Immunstimulierende Lipopeptide als Membrananker für haptene und biologisch aktive Wirkstoffe*, (1988) Dissertation, Institut für Organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität
278. Loleit M., Troger W., Wiesmüller K.H., Jung G., Strecker M., Bessler W.G. (1985), Conjugates of synthetic lymphocyte activating lipopeptides with segments of HIV proteins induce protein-specific antibody formation, *Biol Chem Hoppe Seyler*, **371**, 967-975.
279. Volz, T., Schwarz, G., Fleckenstein, B., Schepp, C.P. et al (2004), Determination of the peptide binding motif and high-affinity ligands for HLA-DQ4 using synthetic peptide libraries, *Hum. Immunol.*, **65**, 594-601.
280. Mayer, R.J., Doherty, F.J. (1992), Ubiquitin, *Essays Biochem.*, **27**, 37-48.
281. Hershko, A., Ciechanover, A. (1992), The ubiquitin system for protein degradation, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761-807.
282. Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002), The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev.*, **82**, 373-428.
283. Ciechanover, A. (2005), N-terminal ubiquitination, *Methods Mol. Biol.*, **301**, 255-270.

284. Ciechanover,A., Ben Saadon,R. (2004), N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in, *Trends Cell Biol.*, **14**, 103-106.
285. Ciechanover,A., Finley,D., Varshavsky,A. (1984), The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation, *J.Cell Biochem.*, **24**, 27-53.
286. Hershko,A., Ciechanover,A. (1998), The ubiquitin system, *Annu.Rev.Biochem.*, **67**, 425-479.
287. Zhou,H., Wertz,I., O'Rourke,K., Ultsch,M. et al (2004), Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO, *Nature*, **427**, 167-171.
288. Gaczynska,M., Rock,K.L., Goldberg,A.L. (1993), Role of proteasomes in antigen presentation, *Enzyme Protein*, **47**, 354-369.
289. Wray,C.J., Mammen,J.M., Hershko,D.D., Hasselgren,P.O. (2003), Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle, *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **35**, 698-705.
290. Ciechanover,A. (2006), The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting, *Neurology*, **66**, S7-19.
291. Ciechanover,A., Schwartz,A.L. (2002), Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and disease, *Hepatology*, **35**, 3-6.
292. Lam,Y.A., Lawson,T.G., Velayutham,M., Zweier,J.L., Pickart,C.M. (2002), A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal, *Nature*, **416**, 763-767.
293. Phillips,C.L., Thrower,J., Pickart,C.M., Hill,C.P. (2001), Structure of a new crystal form of tetraubiquitin, *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **57**, 341-344.
294. Pickart,C.M. (1997), Targeting of substrates to the 26S proteasome, *FASEB J.*, **11**, 1055-1066.
295. Pickart,C.M. (2000), Ubiquitin in chains, *Trends Biochem.Sci.*, **25**, 544-548.
296. Pickart,C.M., Fushman,D. (2004), Polyubiquitin chains: polymeric protein signals, *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **8**, 610-616.
297. Hershko,A., Ciechanover,A., Heller,H., Haas,A.L., Rose,I.A. (1980), Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **77**, 1783-1786.
298. Hershko,A., Leshinsky,E., Ganoth,D., Heller,H. (1984), ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **81**, 1619-1623.
299. Ciechanover,A., Heller,H., Katz-Etzion,R., Hershko,A. (1981), Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **78**, 761-765.
300. Ciechanover,A., Heller,H., Elias,S., Haas,A.L., Hershko,A. (1980), ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **77**, 1365-1368.
301. Haas A.L., Warms J.V.B., Hershko A., Rose I.A. (1982), Ubiquitin-activating enzyme Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation, *J.Biol.Chem.*, **257**, 2543-2548.
302. Cane D.E., Walsh C.T. (1999), The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, *Chem.Biol.*, **6**, R319-R325.

303. Fuchs,O., Neuwirtova,R. (2006), Ubiquitins, proteasomes, sumoylation and application today and in future for cancer and other diseases therapy I. Ubiquitin-proteasome system and the transcription factor NF-kappaB, *Vnitr.Lek.*, **52**, 371-378.
304. Driscoll,J., Goldberg,A.L. (1990), The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins, *J.Biol.Chem.*, **265**, 4789-4792.
305. Goldberg,A.L., Elledge,S.J., Harper,J.W. (2001), The cellular chamber of doom, *Sci.Am.*, **284**, 68-73.
306. Kisselev,A.F., Akopian,T.N., Woo,K.M., Goldberg,A.L. (1999), The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation, *J.Biol.Chem.*, **274**, 3363-3371.
307. Wettern M., von Kampen J. *Das Ubiquitin-System der Zellen* (1996) Spektrum der Wissenschaft,
308. Lupas,A., Flanagan,J.M., Tamura,T., Baumeister,W. (1997), Self-compartmentalizing proteases, *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 399-404.
309. Groll,M., Ditzel,L., Lowe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., Huber,R. (1997), Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution, *Nature*, **386**, 463-471.
310. Groll,M., Huber,R. (2003), Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle, *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **35**, 606-616.
311. Groll,M., Nazif,T., Huber,R., Bogyo,M. (2002), Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome, *Chem.Biol.*, **9**, 655-662.
312. Groll,M., Bochtler,M., Brandstetter,H., Clausen,T., Huber,R. (2005), Molecular machines for protein degradation, *ChemBiochem.*, **6**, 222-256.
313. De Mot,R., Nagy,I., Walz,J., Baumeister,W. (1999), Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes, *Trends Microbiol.*, **7**, 88-92.
314. Lowe,J., Stock,D., Jap,B., Zwickl,P., Baumeister,W., Huber,R. (1995), Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 A resolution, *Science*, **268**, 533-539.
315. Koster,A.J., Walz,J., Lupas,A., Baumeister,W. (1995), Structural features of archaebacterial and eukaryotic proteasomes, *Mol.Biol.Rep.*, **21**, 11-20.
316. Heinemeyer,W., Ramos,P.C., Dohmen,R.J. (2004), The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core, *Cell Mol.Life Sci.*, **61**, 1562-1578.
317. Natarajan,K., Burstyn,D., Zauderer,M. (1992), Major histocompatibility complex determinants select T-cell receptor alpha chain variable region dominance in a peptide-specific response, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 8874-8878.
318. Natarajan,K., Li,H., Mariuzza,R.A., Margulies,D.H. (1999), MHC class I molecules, structure and function, *Rev.Immunogenet.*, **1**, 32-46.
319. Natarajan,K., Dimasi,N., Wang,J., Mariuzza,R.A., Margulies,D.H. (2002), Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination, *Annu.Rev.Immunol.*, **20**, 853-885.

320. Ganoth, D., Leshinsky, E., Eytan, E., Hershko, A. (1988), A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation, *J. Biol. Chem.*, **263**, 12412-12419.
321. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemuller, E. (1998), The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell*, **92**, 367-380.
322. Kopp, F., Hendil, K.B., Dahlmann, B., Kristensen, P., Sobek, A., Uerkvitz, W. (1997), Subunit arrangement in the human 20S proteasome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 2939-2944.
323. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. (2000), Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *EMBO J.*, **19**, 94-102.
324. Dangles O., Guibé F., Balavoine G., Lavielle S., Marquet A. (1987), Selective Cleavage of the Allyl and Allyloxycarbonyl Groups through Palladium-Catalyzed Hydrostannolysis with Tributyltin Hydride. Application to the Selective Protection-Deprotection of Amino Acid Derivatives and in Peptide Synthesis, *J. Org. Chem.*, **52**, 4984-4993.
325. Ekins, R.P., Edwards, P. (1998), On the meaning of "sensitivity": a rejoinder, *Clin. Chem.*, **44**, 1773-1778.
326. Bergmann L., Schäfer C. *Lehrbuch der Experimentalphysik: Optik* (2004) de Gruyter, ISBN:3-11-017081-7
327. Scheffe H. (1953), A Method for Judging all contrasts in the Analysis of Variance, *Biometrika*, **40**, 87-110.
328. Nunc, BD Biosciences, and Genetix, Persönliche Korrespondenz: *Verarbeitung, Handhabung und Charakteristika von Aminoslides* (2002)
329. Fadeey A., M.T. (2000), Self-Assembly Is Not the Only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces: Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon, *Langmuir*, **16**, 7268-7274.
330. Harada, Y., Girolami, G.S., Nuzzo, R.G. (2004), Growth kinetics and morphology of self-assembled monolayers formed by contact printing 7-octenyltrichlorosilane and octadecyltrichlorosilane on Si(100) wafers, *Langmuir*, **20**, 10878-10888.
331. Krasnoslobodtsev A., Smirnov S. (2002), Effect of Water on Silanization of Silica by Trimethoxysilanes, *Langmuir*, **18**, 3181-3184.
332. Lambert A., Neivandt D., McAloney R., Davies P. (2000), A Protocol for the Reproducible Silanization of Mica Validated by Sum Frequency Spectroscopy and Atomic Force Microscopy, *Langmuir*, **16**, 8377-8382.
333. Foisner J., Glaser A., Kattner J., Hoffmann H., Friedbacher G. (2003), Atomic Force Microscopy Investigation of the Growth of Different Alkylsiloxane Monolayers from Highly Concentrated Solutions, *Langmuir*, **19**, 3741-3746.
334. Woodward J., Doudevski I., Sikes H., Schwartz D. (1997), Kinetics of Self-Assembled Monolayer Growth Explored via Submonolayer Coverage of Incomplete Films, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7535-7541.
335. Carraro C., Yauw O., Sung M., Maboudian R. (1998), Observation of Three Growth Mechanisms in Self-Assembled Monolayers, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4441-4445.
336. Atul N.P., Allara D.L. (2006), An Intrinsic Relationship between Molecular Structure in Self-Assembled nAlkylsiloxane Monolayers and Deposition Temperature, *J. Phys. Chem.*, **98**, 7577-7590.

337. Olivos,H.J., Bachhawat-Sikder,K., Kodadek,T. (2003), Quantum dots as a visual aid for screening bead-bound combinatorial libraries, *Chembiochem.*, **4**, 1242-1245.
338. Rademann,J., Barth,M., Brock,R., Egelhaaf,H.J., Jung,G. (2001), Spatially resolved single bead analysis: homogeneity, diffusion, and adsorption in cross-linked polystyrene, *Chemistry.*, **7**, 3884-3889.
339. Hoff,A., Andre,T., Schaffer,T.E., Jung,G., Wiesmuller,K.H., Brock,R. (2002), Lipoconjugates for the noncovalent generation of microarrays in biochemical and cellular assays, *Chembiochem.*, **3**, 1183-1191.
340. Metzger,J.W., Sawyer,W.H., Wille,B., Biesert,L., Bessler,W.G., Jung,G. (1993), Interaction of immunologically-active lipopeptides with membranes, *Biochim.Biophys.Acta*, **1149**, 29-39.
341. Boncheva M., Duschl C., Beck W., Jung G., Vogel H. (1996), Formation and Characterization of Lipopeptide Layers at Interfaces for the Molecular Recognition of Antibodies, *Langmuir*, **12**, 5636-5642.
342. Nielsen P.E. *Pseudo-Peptides in Drug Discovery* (2004) WILEY-VCH Verlag,
343. de Abreu,C.S., Pinto,T.J., de Oliveira,D.C. (2004), Environmental monitoring: a correlation study between viable and nonviable particles in clean rooms, *PDA.J.Pharm.Sci.Technol.*, **58**, 45-53.
344. Steiner P., *Aushärten von Klebstoffen (Panacol)*, (2006)
345. Kunze,J., Leitch,J., Schwan,A.L., Faragher,R.J. et al (2006), New method to measure packing densities of self-assembled thiolipid monolayers, *Langmuir*, **22**, 5509-5519.
346. Park,M.H., Jang,Y.J., Sung-Suh,H.M., Sung,M.M. (2004), Selective atomic layer deposition of titanium oxide on patterned self-assembled monolayers formed by microcontact printing, *Langmuir*, **20**, 2257-2260.
347. Finkelstein,A. (1972), Thin lipid membranes. A model for cell membranes, *Arch.Intern.Med.*, **129**, 229-240.
348. Engelman,D.M. (2005), Membranes are more mosaic than fluid, *Nature*, **438**, 578-580.
349. Estep,T.N., Thompson,T.E. (1979), Energy transfer in lipid bilayers, *Biophys.J.*, **26**, 195-207.
350. Feller,S.E., Pastor,R.W. (1996), On simulating lipid bilayers with an applied surface tension: periodic boundary conditions and undulations, *Biophys.J.*, **71**, 1350-1355.
351. Niemela,P.S., Hyvonen,M.T., Vattulainen,I. (2006), Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers, *Biophys.J.*, **90**, 851-863.
352. Pencer,J., Nieh,M.P., Harroun,T.A., Krueger,S., Adams,C., Katsaras,J. (2005), Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: a small-angle neutron scattering study, *Biochim.Biophys.Acta*, **1720**, 84-91.
353. Rehak,M., Hall,E.A. (2004), Examination of bilayer lipid membranes for 'pin-hole' character, *Analyst*, **129**, 1014-1025.
354. Reichel F., Roelofsen A., Geurts H., Hämäläinen T., Feiters M., Boons G.-J. (1999), Stereochemical Dependence of the Self-Assembly of the Immunoadjuvants Pam<sub>3</sub>Cys-Ser, *J.Am.Chem.Soc.*, **121**, 7989-7997.
355. Riemann (1854), Über die Theorie denen die Geometrie unterliegt, *Inauguralspeech*.

356. Knoll,W., Liley,M., Piscevic,D., Spinke,J., Tarlov,M.J. (1997), Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces, *Adv.Biophys*, **34**, 231-251.
357. Spinke J., Liley M., Schmitt F.-J., Guder H.-J., Angermaier L., Knoll W. (1993), Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization, *J.Chem.Phys.*, **99**, 7012-7019.
358. Deniz,A.A., Laurence,T.A., Dahan,M., Chemla,D.S., Schultz,P.G., Weiss,S. (2001), Ratiometric single-molecule studies of freely diffusing biomolecules, *Annu.Rev.Phys.Chem.*, **52**, 233-253.
359. Liu,J., Volk,K.J., Lee,M.S., Pucci,M., Handwerker,S. (1994), Binding studies of vancomycin to the cytoplasmic peptidoglycan precursors by affinity capillary electrophoresis, *Anal.Chem.*, **66**, 2412-2416.
360. Williams,D.H. (1999), Synthetic chemistry. Sugaring vancomycin, *Nature*, **397**, 567-568.
361. Williams D.H., Bardslea B. (1999), Die Vancomycin-Antibiotica und der Kampf gegen resistente Bakterien, *Angew.Chem.*, **111**, 1264-1286.
362. Zhang,Y., Gomez,F.A. (2000), Multiple-step ligand injection affinity capillary electrophoresis for determining binding constants of ligands to receptors, *J.Chromatogr.A*, **897**, 339-347.
363. Elbs,M., Brock,R. (2003), Determination of binding constants on microarrays with confocal fluorescence detection, *Anal.Chem.*, **75**, 4793-4800.
364. Elbs M., *Mikroarrays zur Messung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit konfokaler Fluoreszenzdetektion*, (2004) Dissertation, Institut für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
365. Scheu P., Persönliche Korrespondenz: *Bilder der Aufnahmen eines gestempelten LIPODOT-Biotins* (2004)
366. Brock R *Vorrichtung und Methode zur Vorbereitung von Substanzenmischungenarrays mittels Diffusion* 01123435, Europäisches PatentEP000001298433A1
367. Brock R. *Device and Method for the generation of arrays of substance mixtures by diffusion* 0210075 , Europäisches PatentWO002003029815A1
368. Pluen,A., Netti,P.A., Jain,R.K., Berk,D.A. (1999), Diffusion of macromolecules in agarose gels: comparison of linear and globular configurations, *Biophys.J.*, **77**, 542-552.
369. Okusawa,T., Fujita,M., Nakamura,J., Into,T. et al (2004), Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6, *Infect.Immun.*, **72**, 1657-1665.
370. Mayer,M., Yang,J., Gitlin,I., Gracias,D.H., Whitesides,G.M. (2004), Micropatterned agarose gels for stamping arrays of proteins and gradients of proteins, *Proteomics.*, **4**, 2366-2376.
371. Johnston,S.C., Riddle,S.M., Cohen,R.E., Hill,C.P. (1999), Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases, *EMBO J.*, **18**, 3877-3887.
372. Wilkinson,K.D., Laleli-Sahin,E., Urbauer,J., Larsen,C.N. et al (1999), The binding site for UCH-L3 on ubiquitin: mutagenesis and NMR studies on the complex between ubiquitin and UCH-L3, *J.Mol.Biol.*, **291**, 1067-1077.
373. Mader O., Reiner K., Egelhaaf H.J., Fischer R., Brock R. (2004), Structure property analysis of pentamethine indocyanine dyes: Identification of a new dye for life science applications, *Bioconjug.Chem.*, **15**, 70-78.

374. Weber P.L., Brown S.C., Mueller L. (1987), Sequential <sup>1</sup>H NMR assignments and secondary structure identification of human ubiquitin, *Biochemistry*, **26**, 7282-7290.
375. Fisher,R.D., Wang,B., Alam,S.L., Higginson,D.S., Robinson,H., Sundquist,W.I., Hill,C.P. (2003), Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif, *J.Biol.Chem.*, **278**, 28976-28984.

## 8 Veröffentlichungen

Roth G., Stefan S., Möhrle B., Wöllner K., Brünjes J., Gauglitz G. Wiesmüller K.-H., Jung G.;

**Ubiquitin binds to a short peptide segment of hydrolase UCH-L3, a study with FCS, RfS, ITC and NMR**

*Chembiochem* accepted 09.10.2006

Heeren A., Luo C.-P., Roth G., Ganser A., Brock R., Wiesmüller K.-H., Henschel W., Kern D.P.;

**Diffusion along microfluidic channels**

*Microelectron. Eng.* **83** 1669-1672 (2006)

Lange SA, Roth G (equal authors) Wittemann S, Lacoste T, Vetter A, Grässle J, Kopta S, Kolleck M, Breitingen B, Wick M, Hörber HJK, Dübel S., Bernard A.;

**Measuring Biomolecular Binding Events with a Compact Disc Player Device**

*Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 270-273 (2006)

Velkova A., Spohn R., Voss S., Ulmer A.J., Buwitt-Beckmann U., Roth G., Jung G., Brock R., Wiesmüller K.-H.;

**Peptide Motif of Lipopeptides Recognized by Toll-like Receptors**

in: M. Flegel, M. Fridkin, C. Gilon, J. Slaninova (eds.), Peptides 2004 - Proc. 3<sup>rd</sup> Int. And 28<sup>th</sup> Europ. Pept. Symp., Prague, pp. 1143-1144, Kenes, Geneva. (2005)

Roth G.;

**Protein-Protein-Interaktion an Mikrostrukturen**

*Diplomarbeit Biochemie*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2002)

Roth G.;

**Mikrostrukturen zur Trennung von Proteinen**

*Diplomarbeit Physik*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2001)

Medienverzeichnis:

Hofmann N, Kern DP, Freek P, Roth G.

**Lehrfilm: Dotierung**

Medienabteilung Tübingen

© FSG Heilbronn 1999

Hofmann N, Kern DP, Roth G.

**Lehrfilm: Metallisierung**

Medienabteilung Tübingen

© Bosch 1999

Norbert N, Roth G

**Interaktive Lern-CD: Halbleitertechnologie I, Die Wafer-Fab**

Medienabteilung Tübingen

© Steinbeis-Transferzentrum

## 9 Danksagung

### Allgemeine Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller und Prof. Dr. Günther Jung für die Aufnahme als Doktorand, die Bereitstellung der Themen, der Freiheiten und Möglichkeiten, die mir bei der Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit gewährt wurden. Aber vor allem für die umfangreiche Betreuung und die geteilten Einsichten und umfangreichen Diskussionen während der gesamten Durchführung der Doktorarbeit und das Korrekturlesen der etwas umfangreich ausgefallenen Doktorarbeit.

Herr Priv. Doz. Dr. Roland Brock danke ich für die Themenstellung, die Betreuung und Möglichkeiten im Bereich der Entwicklung der Diffusionsvorrichtung, sowie das Korrekturlesen der entsprechenden Teile dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović danke ich für die Arbeit als 2. Berichterstatter und Mitglied der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die Leitung der Prüfungskommission und für die Möglichkeit zahlreiche Messungen in seinem Arbeitskreis durchführen zu können.

Weiterer Dank gebührt Prof. Dr. Klaus Albert und Prof. Dr. Eberhard Lindner für die Aufnahme im Graduiertenkolleg 441.

Für finanzielle Unterstützung danke ich dem Graduiertenkolleg 441 „Chemie in Interphasen“, dem Bundesministerium für Forschung für das Projekt „Proteochrom“ PTJ-BIO/0313035B und das Projekt „Diffusionsplattform“ FKZ 13N8647, sowie der EMC microcollctions GmbH.

Ich danke den Kollegen im Verfügungsgebäude Dr. Martin Elbs, Dr. Rainer Fischer, Alexander Ganser, Oda Stoevesandt, Karsten Köhler, Aleksandra Velkova, Dr. Thomas André, Falk Duchardt, Dr. Mariola Fotin-Mleczeck, Antje Hoff, Hans-Jörg Hufnagel, Michael Hulko, Ivo Ruttekkolk, Dr. Söhnke Voss, Dr. Oliver Mader, Susann Wolf, Yi-Da Chung und Priv. Doz. Dr. Roland Brock für das sehr angenehme Arbeitsklima und den zahlreichen Gespräche, Unterhaltungen und Diskussionen und das regelmäßige erheiternde Mittagessen in der Mensa.

Weiterer Dank gilt dem Team der EMC microcollections GmbH, das mich während der gesamten Arbeit in mannigfaltiger Weise unterstützten, wie Michael Wacker, Aleksandra Velkova, Luise Schindler, Denise Kratschmar, Daria Woiczekiewicz, Christina Barać, Tao Nuygyen, Dr. Holger Eickhoff, Dr. Renate Spohn, Dr. Theophiel Rieger, Armin Pohl, Beate Ulmer, Günter Trefftz, Birte Schmidt, Gabi Kroboth, Miriam Duller, Timo Riecker und Bernhard Pätzhold. Von ihnen habe ich viel Hilfe in Form von Synthesen, Diskussionen, Lösungsansätzen sowie labortechnische Hilfe aller Art erhalten, ohne die diese Doktorarbeit unmöglich gewesen wäre. Zudem waren es stets angenehme und unterhaltsame Kollegen.

Ein Dank gilt den vielen Kooperationen, die dieser Arbeit zusätzliche Tiefe und Umfang verleiht. Allen voran sei hier Dr. Manfred Auer und Dr. Christof Bühler im Bereich LIPODOT, Priv. Doz. Dr. Roland Brock und Alexander Ganser bei der Diffusionsvorrichtung, sowie Prof. Dr. Günther Jung, Prof. Dr. Klaus Unger, Reinhardt Ditz und Dr. Stefan Freund im Bereich Ubiquitin-Ligand und Prof. Dr.

D.P. Kern, Andreas Heeren und Dr. Cheng-Ping Luo im Projekt Nanobio genannt. Aber auch alle, die direkt oder indirekt, in einem der zahlreichen Projekte beteiligt waren.

Weiterer Dank den Kollegen im Institut für Angewandte Physik, allen voran Prof. Dr. E. Plies und Prof. Dr. D.P. Kern, Dr. Andreas Heeren, Dr. Chen-Ping Luo und Dr. Wolfgang Hentschel.

Weiteren Dank gebührt der Werkstatt der Physik, insbesondere Frau Trefftz und Herr Schaal, da ohne ihre Hilfe weder die Diffusionsvorrichtung noch die Transferapparaturen verwirklicht worden wären.

Für die Untersuchung der Oberflächen danke ich den Firmen Nanofilm (bildgebende Ellipsometrie, Herr Kamilli), Bio-Rad (Aufnahme mit einem Minirad Arrayscanner, Frau Scheu) und Biozym (Aufnahme mit einem Axon Arrayscanner, Herr Schulz) ebenso wie den Firmen Panacol und Arccure für die „Klebeversuche“ der Beads.

### **Persönliche Danksagung**

Einige Kollegen und Freunde haben mir besonders geholfen oder stehen mir persönlich sehr nahe, diesen Personen möchte ich nochmals namentlich danken.

Karl-Heinz Wiesmüller für die Einsichten in die Durchführung komplexer Projekte, sowie den Umgang mit anderen Unternehmen und Instituten, als auch die Bearbeitung und Beantragung von Projekten mit öffentlichen Mitteln und die fachliche Schützenhilfe, das Synthetisieren vieler Verbindungen und die Möglichkeiten, nahezu alle Ressourcen der EMC zu nutzen.

Günther Jung, der mich schon durch meine Diplomarbeit begleitete und sogar noch aus seinem Ruhestand heraus immer ein offenes Ohr für die Anliegen und Probleme hatte und durch seine Kontakte viele Messungen ermöglichte.

Roland Brock für unsere gemeinsamen Arbeiten an der Diffusionsvorrichtung und die Einsichten, wie wichtig es schon in den ersten Planungsphasen ist, die Automatisierungsmöglichkeiten nicht außer Acht zu lassen.

Michael Wacker, ebenfalls für die Synthese von vielen Peptiden, Aufreinigung und Weiterverarbeitung von Verbindungen und Harzen, aber darüber hinaus für die freundschaftliche Verbindung, die vielen Unterhaltungen und die Hilfe in einigen kritischen Phasen während meiner Doktorarbeit. Des Weiteren für einige Ansichten und viele Überstunden, die er stets hilfsbereit anbot und für deren Annahme ich ihm zu großem Dank verpflichtet bin.

Melanie Nevar, kurz Melli, die mich in vielen Dingen beraten und mit manchen Chemikalien ausgeholfen hat, mich mit ihrer unkonventionellen Art aufgeheitert und einige Ideen beigesteuert hat und mir ungeahnte Einblicke in die Welt des Essbaren ermöglichte. Sie pufferte auch einige unschöne Ereignisse und war stets eine hilfreiche Seele. Ich wünsche ihr alles Gute bei ihrer neuen Stelle in Korea.

Frank Wilks, für das ein oder andere Programm im Bereich der Bildauswertung und für einige sehr interessante Partien Masters of Orion, ebenso wie für Tipps und Tricks bei Auswertungen mit Origin.

Ursula Becker-Sanzenbacher, die organisatorische Seele des Arbeitskreises von Günther Jung, ohne deren Hilfsbereitschaft einige bürokratische Hürden recht hoch gewesen wären, die immer ein offenes Ohr hatte und stets wusste, an wen man sich in welchem Falle wenden musste oder wer für was zuständig ist.

Hermann Maier, da er kurzfristigst als Prüfer eingesprungen ist und sich auf die Schnelle durch die komplette Doktorarbeit durchgelesen hat.

Rainer Fischer, für die stete Unterstützung bei allen chemischen, biochemischen und sonstigen Fragen, die er nahezu wie ein Lexikon beantworten konnte, und für die zahllosen umfangreichen und detaillierten Diskussionen und Paper, die einige Projekte maßgeblich beeinflusst haben.

Luise Schindler, für die Synthese dutzender, wenn nicht gar hunderter Peptide und die fachkundige Beratung über Peptid-Synthesen und kritischer Prozessschritte.

Oda Stoevesandt, die mich umfangreich und sehr geduldig in die Technik der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie eingewiesen hat und nie sauer war, wenn wieder mal ein Termin kurzfristig verschoben wurde.

Karsten Köhler, der die Zellfärbungen übernahm und für die Vorführung der „Zwei-Hand-Pipettieretechnik“.

Martin Elbs, für die vielen Diskussionen, die gemeinsame Entwicklung und Aufbau von Mikroarrays sowie das Überlassen seines TAMRA-gelabelten Vancomycins.

ISMED™, der uns bei der Herstellung der finalen Mikroarrays in kalter Nacht Wärme spendete und mit seinem unablässigen Surren alle fleißigen Helfer wach hielt.

Thomas André, auch als Pommes bekannt, für die Herstellung von Mikroarrays, vielen interessanten Papern, die er fand und die Einweisung am GESIM Nanoplotter.

Christof Bühler, weil er sich ausgiebigst mit den LIPODOT-Arrays befasste, viele Fragen zum ELISA auf diesen Oberflächen stellte und vor Ort, in Wien, alle notwendigen Materialien und Geräte organisierte und einige Messungen durchführte.

Aleksandra Velkova, die mit mir zusammen den IL8-ELISA komplett und ausgiebigst ausgemessen hat und dafür sogar auf die wichtigste Mahlzeit des Tages, das Mittagessen mehrmals verzichtete. Weiterhin für die Nuß-Krokant-Eisbecher, die sie stets für das Lösen von Gleichungen spendierte.

Katharina Lehmann und Winfried Zweig für Kurzweil während der Doktorarbeit durch etliche amüsante Spiele- und Diskussionsabende, die stets neue Strategien und Ansätze hervorbrachten und die Bestätigung, das man stets etwas Interessantes forschen sollte.

Alexander Ganser, für seine Neugier im Bereich Diffusionsvorrichtung und die starke Zusammenarbeit, die sich daraus entwickelte, die vielen Ideen und Diskussionen, die er im Projekt hatte und auch durchführte, ebenso wie für das gemeinsame „Eichen“ der Diffusionsvorrichtung über hunderte gemittelter Mikroskopaufnahmen hinweg. Weiterhin für die Erkenntnis, dass es ab und zu auch einfacher ohne Mathematik geht (Idee der Einsetzhalterung für die Diffusionsvorrichtungen).

Zu guter Letzt gilt meinen Eltern, Günter und Regine Roth, und meinem Bruder Alexander besonderer Dank für die fortwährende Unterstützung und die Möglichkeit, Hilfe in jeder Not und Lebenslage zu erhalten, sowohl vor als auch während meines Studiums und der Doktorarbeit.

Und ein großes „Danke Schön“ an Cindy Fleschner, dafür dass sie extra wegen mir aus dem Märkischen Flachland ins bergige Schwabenland gezogen ist und mir auch in anstrengenderen Phasen der Doktorarbeit stets zur Seite stand (insbesondere bei der Übernacht-Herstellung der LIPODOT-Microarrays, dem mehrfachen Korrekturlesen jeder Version dieser Doktorarbeit und der Überprüfung der Literaturangaben).

.

## 10 Akademische Lehrer

### Im Bereich Biochemie

Prof. Dr. Albert, Prof. Dr. Bisswanger, Priv. Doz. Brock, Prof. Dr. Bohley, Prof. Dr. Christen, Prof. Dr. Eckstein, Prof. Dr. Eisele, Dr. Fischer, Prof. Dr. Fröhlich, Prof. Dr. Gauglitz, Prof. Dr. Göpel, Prof. Dr. Götz, Prof. Dr. Günzel, Prof. Dr. Häfelinger, Prof. Dr. Hagenmaier, Prof. Dr. Hamprecht, Prof. Dr. Hanack, Dr. Hartmann, Prof. Dr. Hoffmann, Prof. Dr. Jung, Prof. Dr. Lindner, Prof. Dr. Kaiser, Dr. Kammer, Prof. Dr. Maier, Priv. Doz. Maier Prof. Dr. Mayer, Prof. Dr. Mecke, Frau Melanie Nevar, Prof. Dr. Nakel, Prof. Dr. Ninnemann, Prof. Dr. Nordheim, Prof. Dr. Oberhammer, Prof. Dr. Oelkrug, Prof. Dr. Pfaff, Prof. Dr. Pfeiffer, PD Dr. Pommer, Prof. Dr. Probst, Prof. Dr. Rammensee, Dr. Reinecke, Prof. Dr. Reutter, Prof. Dr. Schurig, Prof. Dr. Schott, Prof. Dr. Speiser, Prof. Dr. Staudt, Prof. Dr. Stevanovic, PD Dr. Stoeva, Prof. Dr. Strähle, Prof. Dr. Voelter, Priv. Doz. Voigt, Prof. Dr. Weber, Prof. Dr. Wegmann, Prof. Dr. Weser, Prof. Dr. Wiesinger, Prof. Dr. Wiesmüller, Prof. Dr. Winkelmann, Prof. Dr. Wohlleben

### Im Bereich Physik

Prof. Dr. Baumann, Priv. Doz. Behringer, Dr. Ebert, Priv. Doz. Fischer, Prof. Dr. Gönnerwein, Prof. Dr. Grabmayer, Priv. Doz. Haack, Prof. Dr. Häfelinger, Prof. Dr. Hanack, Dr. Henz, Prof. Dr. Hartmann, Prof. Dr. Hübner, Prof. Dr. Kaul, Prof. Dr. Kern, Prof. Dr. Loos, Prof. Dr. Lutz, Prof. Dr. Meier, Prof. Dr. Mertens, Prof. Dr. Müther, Prof. Dr. Nakel, Prof. Dr. Pfister, Prof. Dr. Plies, Priv. Doz. Prins, Prof. Dr. Ruder, Prof. Dr. Staudt, Prof. Dr. Strähle, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Wahram, Prof. Dr. Wolf

## 11 Lebenslauf

**Name:** **Günter Roth**  
**Geburtsdatum:** 02.05.1976  
**Geburtsort:** Stuttgart, Deutschland  
**Kontakt:** [rothquenter@gmx.de](mailto:rothquenter@gmx.de)

### Doktorarbeit

10/2002-05/2006      Anfertigung der Doktorarbeit  
*Entwicklung neuer Hochdurchsatz-Assay-Technologien und Identifikation eines Ubiquitin-Liganden*  
Gesamtnote: „summa cum laude“  

- betreut von Prof. Dr. Wiesmüller und Prof. Dr. Jung, Institut für Organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- durchgeführt am Institut für Organische Chemie, dem Interfakultären Institut für Zellbiologie und der EMC microcollections GmbH, Tübingen, bei Prof. Dr. Wiesmüller und Priv. Doz. Dr. Brock

### Diplomarbeit Biochemie

01/2002-09/2002      Anfertigung der Diplomarbeit  
*Protein-Protein-Interaktionen in Mikrostrukturen*  
Gesamtnote: „sehr gut“  

- betreut von Prof. Dr. Jung, Institut für Organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- durchgeführt bei der LifeBits AG, Tübingen, bei Prof. Dr. Dübel und Dr. Bernard

### Diplomarbeit Physik

03/2000-05/2001      Anfertigung der Diplomarbeit  
*Mikrostrukturen zur Trennung von Proteinen*  
Gesamtnote: „sehr gut“  

- betreut und durchgeführt im Arbeitskreis Prof. Dr. Kern, Institut für Angewandte Physik, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

### Bildungsweg

04/1996-09/2002      Außerordentliche parallele Zulassung zum Diplomstudium Biochemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
10/1995-05/2001      Diplomstudium Physik, Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
07/2005                Abitur, Gymnasium Bildungszentrum Nord, Reutlingen

### Preise/Stipendien

01/2004-10/2006      Promotionsstipendium im Graduiertenkolleg 441 „Chemie in Interphasen“, Tübingen  
seit 05/2003            Stipendiat der „e-fellows“, [www.e-fellows.net](http://www.e-fellows.net)  
16.06.2004             Außerordentliche Verleihung des **Dr. Friedrich Förster Preises 2004** für eine Diplomarbeit



EBERHARD KARLS  
UNIVERSITÄT  
TÜBINGEN



## URKUNDE

Herr Günter Roth  
hat in der Zeit vom 01.04.2004 bis 30.11.2006  
am Graduiertenkolleg der DFG

—Chemie in Interphasen—  
Synthese, Dynamik und Anwendung  
polymerfixierter aktiver Zentren

als Stipendiat und vom 01.10.2006 bis 30.11.2006 als  
Postdoktorand erfolgreich teilgenommen und in dieser Zeit die  
bei den Leistungsnachweisen aufgeführten Vorlesungen und  
Seminare besucht, Praktika mit Leistungskontrolle (Bericht)  
absolviert sowie begutachtete halbjährliche Forschungsberichte  
vorgelegt. Herr Roth war vom 01.10.2004 bis 30.09.2005  
Sprecher der Stipendiat(Inn)en und Kollegiat(Inn)en.

30.11.2006

  
(Prof. Dr. Klaus Albert)  
Sprecher des Kollegs



EBERHARD KARLS  
UNIVERSITÄT  
TÜBINGEN



## LEISTUNGSNACHWEISE

Herr Roth hat in der Zeit vom 01.04.2004 bis 30.11.2006 am Graduiertenkolleg der DFG »*Chemie in Interphasen—Synthese, Dynamik und Anwendung polymerfixierter aktiver Zentren*« als Stipendiat erfolgreich teilgenommen und die folgenden Seminare und Vorlesungen besucht:

- ◆ Interdisziplinäres Seminar des Graduiertenkollegs
- ◆ Struktur und Dynamik von Interphasen II (SS 2004)  
Dozenten: Albert, Bertagnolli, Bogdan, Egelhaaf, Mayer, Müller, Ochsenfeld, Plies, Speiser
- ◆ Synthese und Anwendung von Interphasen I (WS 2004/05)  
Dozenten: Albert, Brandstetter, Lindner, Mayer, Nagel, Schurig, Speiser, Wesemann, Wiesmüller
- ◆ Struktur und Dynamik von Interphasen I (SS 2005)  
Dozenten: Albert, Bertagnolli, Egelhaaf, Mayer, Müller, Ochsenfeld, Speiser, Rosenstiel, Wiesmüller
- ◆ Synthese und Anwendung von Interphasen II (WS 2005/06)  
Dozenten: Albert, Brandstetter, Lindner, Mayer, Nagel, Schurig, Speiser, Wesemann, Wiesmüller

die folgenden Vorträge gehalten:

- ◆ Ubiquitin, the Most Important Protein?, Blaubeuren 2004
- ◆ Gradients by Diffusion-Large Scale Interphases in Cellular Assays, Lauterbad 2005
- ◆ Small Peptides as Ligands for Ubiquitin, Lauterbad 2006

folgende Praktika mit Leistungskontrolle (Bericht) absolviert:

- ◆ Interaktion verschiedener (Lysin)<sub>4</sub>-Fettsäure-Derivate mit C<sub>18</sub>-Kieselgel in unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen, August 2005
- ◆ Identifizierung von chiralen peptidischen Selektoren zur optimierten Auftrennung von enantiomeren DNP-Aminosäurengemischen in der Kapillarelektrophorese, November 2006

sowie begutachtete halbjährliche Forschungsberichte vorgelegt.

30.11.2006

(Prof. Dr. Klaus Albert)  
Sprecher des Kollegs