

Immobilisierungsstrategien zur Herstellung von Peptid- und Wirkstoff-Arrays und deren Anwendung

Ein wichtiger Beitrag zum Fortschritt der Biowissenschaften ist die Entwicklung von neuen Hochdurchsatz-Techniken, die eine schnellere, automatisierte und parallele Auslesung von Daten ermöglichen. So werden in der Industrie mittlerweile Genchips angewandt, bei denen über 20.000 Oligonucleotide parallel analysiert werden können. Zusätzlich bieten diese Chips im Vergleich zu klassischen Mikrotiterplatten-Assays den Vorteil des geringeren Probenvolumens sowie der besseren Lagerung bezüglich der Stabilität und somit einfacheren und schnelleren Zugriffs auf die für den Assay benötigten Proben. Daher werden neuerdings ebenfalls in dem Bereich der Wirkstoffmoleküle und Peptide Assays im Chipformat entwickelt. Zur Kupplung an die Glas- oder Goldoberflächen werden dabei funktionelle Gruppen des Moleküls (-SH, -OH, -COOH, -NH₂) herangezogen, die aber auch gleichzeitig Träger der biologischen Wirkung sein können. Um die dadurch entstehende Beeinträchtigung der Ergebnisse zu verhindern, war das Ziel eine Kupplungsmethode zu entwickeln, die

- 1) ohne pharmakophore Gruppen als Anknüpfungsmethode auskommt,
- 2) orthogonal zu anderen funktionellen Gruppen selektiv an die Oberfläche bindet,
- 3) Funktionalitäten besitzt, die bei einer Mehrstufensynthese an der festen Phase entweder resistent gegenüber möglichst vielen Reaktionsbedingungen sind oder sich bei Abspaltung vom Harz einführen lassen und
- 4) ohne Zugabe weiterer Reagenzien zur Ankupplung führt.

Als Immobilisierungsreaktion wurde die Staudinger Ligation gewählt, bei der ein am zu immobilisierenden Molekül befindliches Azid mit der Phosphin-funktionalisierten Glasoberfläche zu einer stabilen Amidbindung reagiert. Das Azid wurde am Ende der Festphasensynthese in die Moleküle eingeführt und die Glasträger wurden mit dem Phosphin funktionalisiert. Anhand der erfolgreichen Immobilisierung von Biotin, Mannose sowie durch Festphasensynthese erzeugten biotinylierten Wirkstoffmodellsubstanzen, Negativkontrollen und Nachweisen mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass diese Kupplungsmethode alle oben genannten Anforderungen erfüllt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Testsystem entwickelt, welches darauf abzielt, bevorzugte Peptid-Substrate von Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTPs) zu erkennen. PTPs dephosphorylieren eine große Anzahl an biologischen Substraten und sind dabei wichtige Komponenten von Signaltransduktionsprozessen, welche essenziell für z.B. Zellwachstum, Zell-Kommunikation und -Differenzierung sowie die Immunantwort sind. Ein fehlerhafter Ablauf dieser Prozesse führt zu anormaler Tyrosin-Phosphorylierung, was wiederum in der Entwicklung von Krankheiten wie Diabetes oder Krebs münden kann. Daher ist es interessant, die Substrate der entsprechenden PTPs zu kennen, um die Rolle von PTPs in biologischen Prozessen zu verstehen und die Substrate als mögliche Angriffspunkte von Medikamenten zu nutzen. Das Testsystem wurde folgendermassen aufgebaut: Eine an fester Phase synthetisierte Phosphotyrosin-peptidbibliothek wurde auf der Phosphin-funktionalisierten Oberfläche mittels Staudinger Ligation immobilisiert. Dann wurde der Array mit der interessierenden Phosphatase und zeitgleich ein weiterer Array mit einer entsprechenden Pufferlösung inkubiert. Der Nachweis wurde mit fluoreszenzmarkiertem anti-Phosphotyrosinantikörper geführt. Bei einem Vergleich der Signalintensitäten von Phosphatase- und Puffer-inkubiertem Array ließ der Rückgang eines Signals auf Ersterem auf ein Substrat schließen. Nachdem dieses Testsystem evaluiert worden war (s. beigelegtes Poster), wurden sechs physiologisch interessante PTPs gegen eine Bibliothek von 50 Peptiden getestet. Dabei wurden deutlich verschiedene Aktivitäten und Substratspezifitäten

der verschiedenen Phosphatasen gefunden und vormals unbekannte bevorzugte Substrate identifiziert. Diese Ergebnisse werden bald ebenfalls publiziert werden.

Neben dem Gebrauch von Trägermaterialien für das Hochdurchsatz-Screening finden auch mikrostrukturierte Oberflächen breite Anwendung. Im materialwissenschaftlichen Gebiet kann man sie verwenden, um leitende Mikrostrukturen zu erzeugen. Im biologischen Bereich werden solche Träger beispielsweise genutzt, um die äußere Hülle einer Zelle zu imitieren, um damit biologische Vorgänge an Zellen zu untersuchen. Bestehende Techniken zur photochemischen Oberflächenstrukturierung nutzen aber drastische Reaktionsbedingungen, die Biomoleküle zerstören können und unspezifisch reagieren. Daher wurde eine milde, selektive Methode zur photochemischen Mikrostrukturierung entwickelt, die sich der radikalischen Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen bedient. Zur Funktionalisierung der Oberflächen wurden mikrostrukturierte Masken verwendet. Anhand der Immobilisierung verschiedener chemischer Substanzen konnte die Selektivität und Milde der Reaktion gezeigt werden, was vielfältige Nutzungen der Strukturierungstechnik ermöglicht.