

Entwicklung und Anwendung der Thiol-En-Reaktion zur Herstellung von Biomoleküloberflächen

Zusammenfassung der Dissertation von Dirk Weinrich

Biomolekülmikroarrays sowie Biochips mit immobilisierten Biomolekülen in geometrisch definierten Mikrostrukturen sind wertvolle Werkzeuge für Hochdurchsatzanalysen, wie z.B. der Genomik oder Proteomik, sowie für Anwendungen im Bereich der Nanobiotechnologie. Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen für die Herstellung von Biochips werden intensiv erforscht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Biochipherstellungsmethode auf Basis der Thiol-En-Reaktion (Abb. 1) entwickelt, da diese eine schonende und mittels optischer Techniken geometrisch kontrollierbare Immobilisierung von Biomolekülen auf Chipoberflächen ermöglicht (Abb. 2).

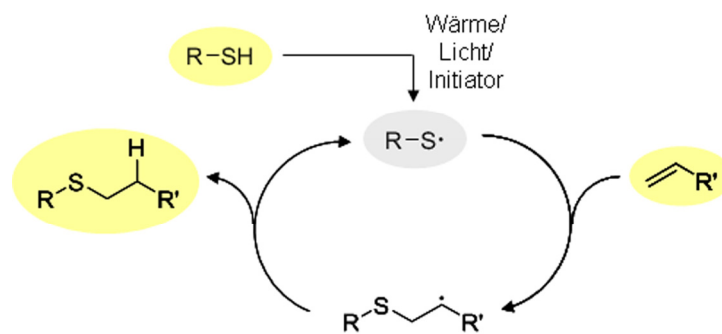


Abb. 1: Die Thiol-En-Reaktion.

Diese Methode wurde nachfolgend auf die Herstellung von Mikroarrays und mikrostrukturierten Biochips niedermolekularer Biomoleküle wie Biotin, Oligonukleotiden, Peptiden und Glykopeptiden angewendet. Unter Einsatz eines UV-Lasers als Strahlungsquelle gelang die Herstellung nanostrukturierter Biochips. Die Verwendung des ungesättigten Farnesylmembranankers als Olefinquelle in Kombination mit dem polybasischen C-Terminus der kleinen GTPase K-Ras ermöglichte ferner die Ausweitung der Methode auf die Photoimmobilisierung von Proteinen auf Thioloberflächen (Abb. 3). Es wird vermutet, dass der polybasische C-Terminus zu einer Präkoordination des Proteins an die Thioloberfläche führt, auf der aufgrund der verwendeten Funktionalisierungsstrategie negative Gruppen vermutet werden. Diese Präkoordination würde die nachfolgende Thiol-En-Reaktion begünstigen. Der Farnesylanker

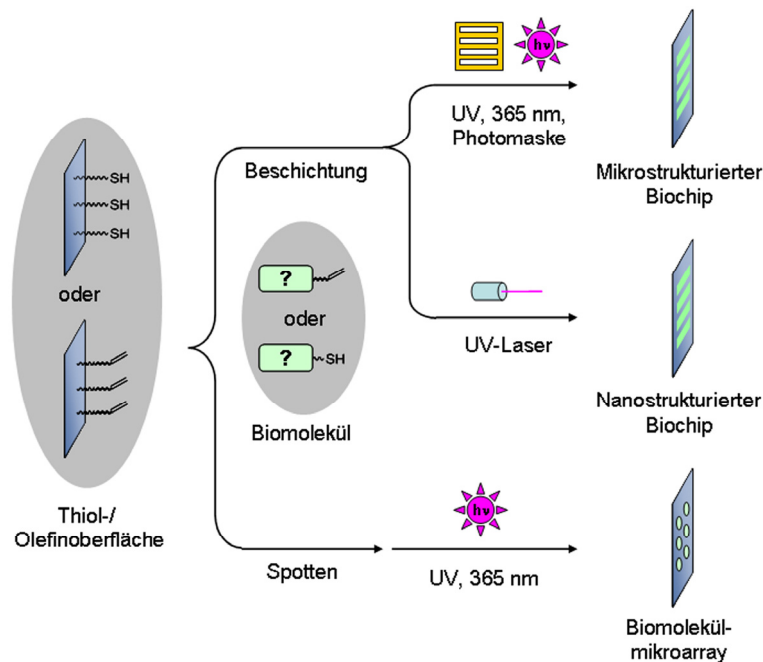


Abb. 2: Herstellung von Biomolekülmikroarrays oder mikro- bzw. nanostrukturierten Biochips mit der Thiol-En-Reaktion.

wurde dabei unter Einsatz rekombinanter Proteinfarnesyltransferase (FTase) enzymatisch auf eine C-terminale Erkennungssequenz aus vier Aminosäuren, eine sogenannte CAAX-Box, übertragen, die sowohl chemisch als auch molekularbiologisch in Proteine eingeführt werden kann. Auf diese Weise gelang die Herstellung von mikrostrukturierten Biochips der kleinen GTPase K-Ras sowie von Mikroarrays einer C-terminal modifizierten Variante des fluoreszierenden Proteins mCherry und der kleinen GTPase Rab6A.

Die Kombination aus ladungsgesteuerter Oberflächenpräkoordination und Farnesylrest ermöglichte darüber hinaus eine Photoimmobilisierung aus Expressionslysat ohne vorherige Aufreinigung des zu immobilisierenden Proteins. Diese erfordert lediglich eine Farnesylierung des im Lysat enthaltenen Proteins mit FTase und konnte im Rahmen der Herstellung von Mikroarrays des fluoreszierenden Proteins mCherry demonstriert werden.

Eine Weiterentwicklung wurde ferner durch Koexpression des zu immobilisierenden Proteins mit FTase in *E.coli* erreicht. Diese Strategie basiert auf der Farnesylierung des modifizierten Proteins durch die koexprimierte Farnesyltransferase unter Verwendung von endogen durch *E.coli* synthetisiertem Farnesylpyrophosphat als Substrat. Nach Generierung des Koexpressionslysats konnte dieses direkt zur Herstellung von Proteinmikroarrays verwendet werden wie am Beispiel des fluoreszierenden Proteins mCherry gezeigt werden konnte. Diese Methode ermöglicht eine kovalente und gerichtete Photoimmobilisierung von Proteinen ohne zeitaufwändige Aufreinigungs- oder chemische Modifizierungsschritte.

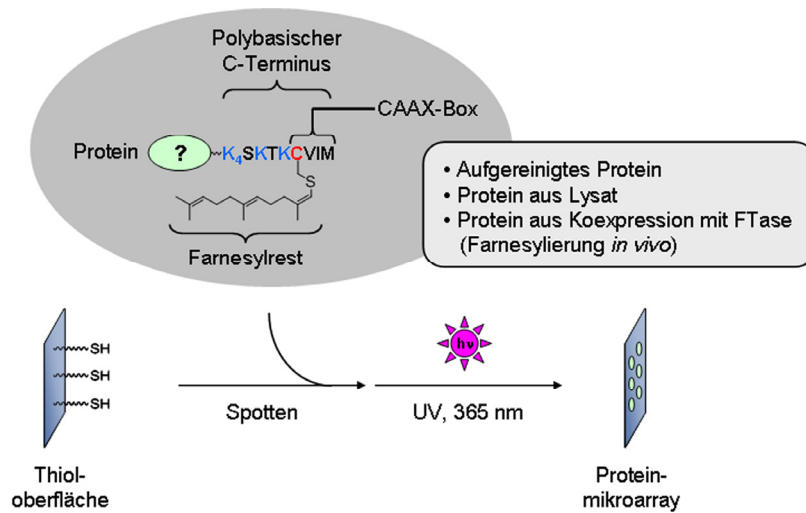


Abb. 3: Herstellung von Proteinmikroarrays mit der Thiol-En-Reaktion unter Ausnutzung des Farnesylankers und einer K-Ras-ähnlichen, polybasischen C-Terminusmodifizierung. Es können aufgereinigte Proteine oder Proteine aus Expressionslysat ohne vorherige Aufreinigung verwendet werden. Koexpression mit FTase in *E.coli* ermöglicht ferner eine Farnesylierung *in vivo*.