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

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie der Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von Diplom-Chemiker

Dirk Weinrich

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Christof M. Niemeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund in der Zeit von August 2005 bis Dezember 2009 angefertigt.

Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt werden, kann man Schönes bauen.

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Mikro- und Nanoarrays von Biomolekülen.....	3
1.2 Biochips mit Biomolekülmikro- und -nanostrukturen.....	5
1.3 Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen.....	7
1.4 Biochipoberflächen.....	10
1.5 Die Thiol-En-Reaktion.....	12
2. Zielsetzung.....	14
3. Allgemeiner Teil.....	15
3.1 Vorversuche zur Thiol-En-Reaktion.....	16
3.1.1 Optimierung der Thiol-En-Reaktion in Lösung und an fester Phase.....	16
3.2 Vorversuche zur Thiol-En-Photomikrostrukturierung.....	21
3.2.1 Der Thiol-En-Photomikrostrukturierungsprozess.....	21
3.2.2 Vergleich verschiedener Oberflächen in der Thiol-En- Photomikrostrukturierung.....	24
3.2.3 Vergleich verschiedener Ankergruppen in der Thiol-En- Photomikrostrukturierung.....	29
3.2.4 Einfluss von Konzentration und Bestrahlungsdauer auf die Thiol-En- Photomikrostrukturierung.....	30
3.2.5 Zusammenfassung.....	32
3.3 Thiol-En-Photomikrostrukturierung niedermolekularer Biomoleküle auf Oberflächen.....	33
3.3.1 Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Phosphopeptiden.....	33
3.3.2 Sonstige Experimente – Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Biotin mittels Mikrofluidik.....	35
3.3.5 Zusammenfassung.....	36
3.4 Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle.....	37
3.4.1 Biotin-basierte Mikroarrays.....	37
3.4.2 Oligonukleotidmikroarrays.....	40
3.4.3 MUC1-Glykopeptidmikroarrays.....	41
3.4.4 Zusammenfassung.....	45
3.5 Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Proteinen auf Oberflächen.....	46
3.5.1 Indirekte und direkte Thiol-En-Mikrostrukturierung von Proteinen.....	46
3.5.2 Indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von CIAP.....	48

3.5.3 Indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras ¹⁻¹⁸¹ -Biotin	50
3.5.4 Direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras ¹⁻¹⁸¹ -Olefin.....	53
3.5.5 Direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung farnesylierter Proteine: H- RasFar, N-RasFar und K-Ras4BFar.....	54
3.5.6 Die K-Ras-Hypothese	56
3.5.7 Reaktivität des Farnesylrestes in der Thiol-En-Reaktion in Lösung.....	58
3.5.8 Weitere Untersuchungen zur direkten Thiol-En-Mikrostrukturierung von K- Ras4BFar.....	62
3.5.9 Zusammenfassung.....	65
3.6 Proteinmikroarrays	66
3.6.1 Herstellung eines N-Ras ¹⁻¹⁸¹ -Biotin-Mikroarrays durch indirekte Thiol-En- Photoimmobilisierung	66
3.6.2 Der optimale KRT: Herstellung ligierter N-Ras ¹⁻¹⁸¹ -XKRTFar-Proteine.....	67
3.6.3 Direkte Thiol-En-Immobilisierung KRT-modifizierter N-Ras ¹⁻¹⁸¹ -Varianten im Mikroarray	68
3.6.4 Das N-Ras ¹⁻¹⁸¹ -6KRTFar-Mikroarray im Protein- Proteininteraktionsexperiment mit RBD-YFP	71
3.6.5 Herstellung KRT-modifizierter Proteine mittels molekularbiologischer Methoden.....	71
3.6.5.1 Klonierung und Expression von H ₆ -mCherry-6KRT.....	73
3.6.5.2 Klonierung und Expression von H ₆ -mCherry-4KRT.....	75
3.6.5.3 Klonierung und Expression von H ₆ -mCherry	76
3.6.5.4 Klonierung und Expression von H ₆ -Rab6A(m)-6KRT	77
3.6.6 Mikroarrays KRT-modifizierter Proteine.....	78
3.6.6.1 H ₆ -mCherry-4KRTFar-Mikroarray durch direkte Thiol-En- Photoimmobilisierung	78
3.6.6.2 Rab6A(m)-6KRTFar-Mikroarray durch direkte Thiol-En- Photoimmobilisierung	79
3.6.7 Kontrollexperiment zur K-Ras-Hypothese: pH-Wert und Salzgehalt.....	80
3.6.8 Zusammenfassung.....	83
3.7 Proteinlysatmikroarrays	83
3.7.1 LySATmikroarrays KRT-modifizierter Proteine – H ₆ -mCherry-4KRTFar.....	83
3.7.2 KolysATmikroarrays KRT-modifizierter Proteine mit FTase	86
3.7.2.1 Vektorsystem zur Koexpression.....	86

3.7.2.2 Kolysatmikroarray von H ₆ -mCherry-4KRTFar und FTase - Vorversuche	88
3.7.2.3 Kolysatmikroarray von H ₆ -mCherry-4KRTFar und FTase – optimierte Bedingungen	90
3.7.3 Zusammenfassung	94
3.8 Thiol-En-Nanostrukturierung	94
3.8.1 Nanostrukturierung unter Verwendung von Spin-Coating	94
3.8.2 Nanostrukturierung unter Verwendung von Drop-Casting	96
3.8.3 Nanostrukturierung unter Verwendung von Mikrofluidik	97
3.8.4 Zusammenfassung	99
4. Zusammenfassung	100
5. Experimenteller Teil	106
5.1 Messgeräte und Materialien	106
5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften	110
5.2.1 AAV zur Peptidsynthese	110
5.2.2 AAV zur Thiol-En-Photoimmobilisierung	112
5.2.3 AAV zu molekularbiologischen Verfahren	119
5.3 Abschnittspezifische Arbeitsvorschriften	129
5.3.1 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.1	129
5.3.2 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.2	134
5.3.3 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.3	135
5.3.4 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.4	139
5.3.5 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.5	141
5.3.6 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.6	143
5.3.7 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.7	159
5.3.8 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.8	169
5.4 Arbeitsvorschriften zu chemischen Synthesen	172
6. Literaturverzeichnis	184
7. Abkürzungsverzeichnis	189
8. Anhang	193

1. Einleitung

Eines der bedeutendsten Ziele der zeitgenössischen naturwissenschaftlichen Forschung ist die Entschlüsselung aller Abläufe und Bausteine lebender Zellen, um das Leben auf molekularer Ebene verstehen zu können. Im Jahr 2001 gelang etwa 50 Jahre nach Entdeckung der Doppelstrangstruktur der DNA (desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure) die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms mit etwa 3 Milliarden Basenpaaren.^[1] Dank der fortschreitenden technischen Entwicklung ist im nunmehr post-genomischen Zeitalter die Sequenzierung menschlichen Erbguts, die anfänglich mehrere Jahre benötigte, schon in wenigen Wochen möglich^[2] und wird in naher Zukunft noch schneller erfolgen können. Zu den wichtigsten derzeitigen Herausforderungen der Forschung gehört die Aufklärung des humanen Proteoms, d.h. der Gesamtheit aller menschlichen Proteine, da sich die Zusammensetzung des Proteoms sowie die Funktion seiner Elemente, der Proteine, bislang nicht aus dem Genom bestimmen lässt, jedoch für die Funktion einer Zelle entscheidend ist (siehe Abbildung 1).

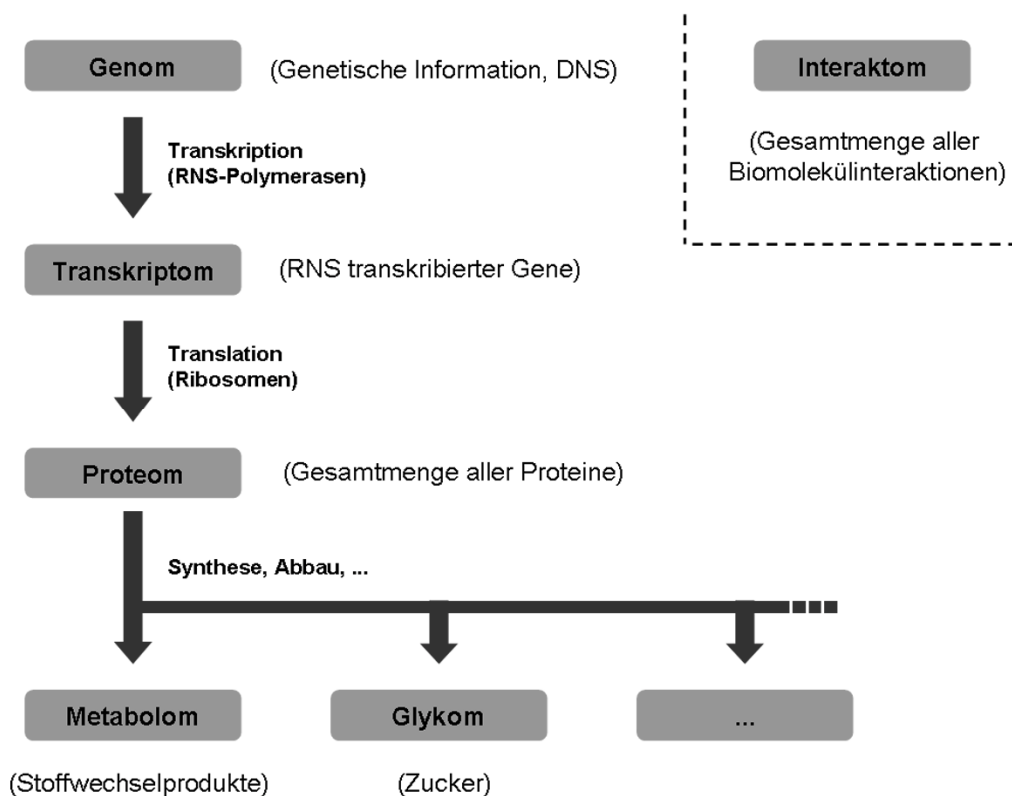


Abbildung 1: Überblick über die Biomolekülklassen in lebenden Zellen und deren biologische Verknüpfung. Die unterschiedlichen Klassen werden jeweils in einer Gesamtheit, wie z.B. dem Genom oder dem Proteom, zusammengefasst. Die sich mit diesen Gesamtheiten befassenden Forschungsgebiete sind entsprechend benannt, so z.B. die Genomik oder die Proteomik.

1. Einleitung

Aufgrund der höheren Komplexität und Empfindlichkeit von Proteinen im Vergleich zu DNA gestaltet sich die Untersuchung des Proteoms komplizierter als die Aufklärung des Genoms. Besondere Wichtigkeit in der Proteomik besitzen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen sowie zwischen Proteinen und anderen Biomolekülen, da diese vielen zellulären Vorgängen, wie z.B. Signalkaskaden und zellulären Kontrollmechanismen, zugrundeliegen. Klassische proteomische Methoden der Biochemie und Molekularbiologie, wie die Koimmunopräzipitierung oder die Affinitätschromatographie, sind begrenzt auf die Aufklärung von Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen oder einem Protein und einem Proteinkomplex. Die Komplexität des Proteoms und der Biomolekülinteraktionsnetzwerke in einer Zelle verlangt jedoch nach neuen Methoden, die eine schnelle Bestimmung von Wechselwirkungen im großen Maßstab und unter verschiedenen Bedingungen ermöglichen.

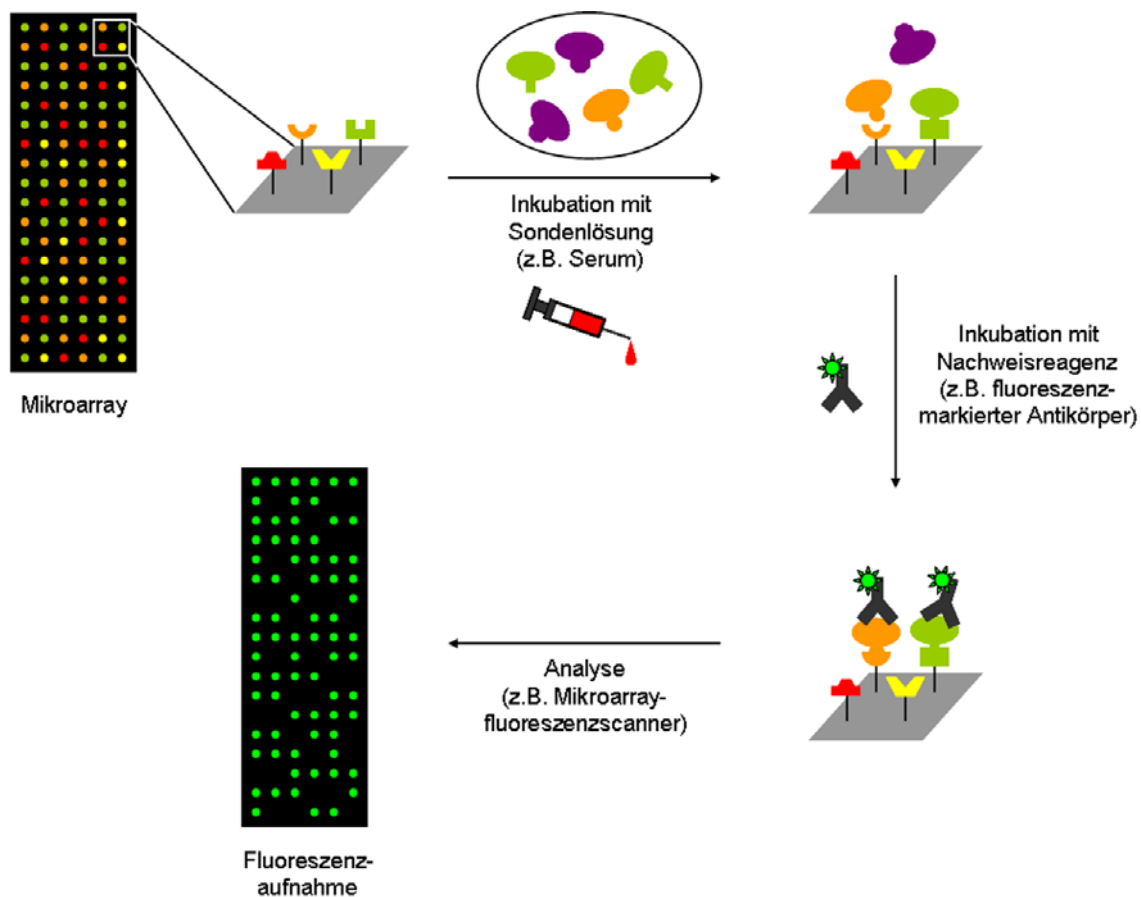


Abbildung 2: Analyse biologischer Sonden mit Hilfe eines Biomolekülmikroarrays. Ein Biomolekülmikroarray wird mit einer zu analysierenden Sondenlösung inkubiert, aus der Biomoleküle an verschiedene Bindungspartner an der Chipoberfläche binden. Nach Inkubation mit einem markierten Nachweisreagenz kann Detektion gebundener Biomoleküle mit Hilfe eines Mikroarrayscanners überprüft und ihre Präsenz in der Sondenlösung auf diese Weise nachgewiesen werden.

Einen vielversprechenden Ansatz bieten sogenannte Mikroarrays, Oberflächen im Objektträgerformat, auf denen, örtlich getrennt, Tausende von verschiedenen Biomolekülen immobilisiert werden können, so dass durch einfache Inkubation mit einer potentielle Interaktionspartner enthaltenden Lösung die parallele Durchführung tausender Interaktionsexperimente möglich wird (Abbildung 2). Ein weiterer Vorteil dieser Plattformen sind die geringen Biomolekülmengen, die im Vergleich zu klassischen Methoden für ihre Herstellung benötigt werden, da die einzelnen Mikroarraypunkte nur Mikrometer groß sind. Oberflächen dieser Art werden häufig auch als Biochips bezeichnet, beschränken sich jedoch nicht nur auf Mikroarrays (siehe unten).

1.1 Mikro- und Nanoarrays von Biomolekülen

Eine Vielzahl von Biomolekültypen wurde für den Einsatz in Mikroarrays untersucht (siehe Tabelle 1). Unterschieden werden niedermolekulare Biomoleküle, wie DNA-Fragmente, Peptide, Zucker und organische Wirkstoffmoleküle, mit Molekülmassen bis zu einigen kDa sowie die hochkomplexen und empfindlichen Proteine mit weit höheren Molekülmassen von einigen kDa bis zu einigen 100 kDa.

Die zuerst entwickelten DNA-Mikroarrays sowie Ausrüstung zu ihrer Herstellung und Analyse stehen heute in großer Breite kommerziell zur Verfügung und ermöglichen u.A. die Bestimmung des Expressionsniveaus tausender Gene in einem einzigen Arbeitsablauf (gene expression profiling).^[3] Peptidmikroarrays sind - wenn auch in geringerem Umfang als DNA-Mikroarrays – ebenfalls kommerziell erhältlich und werden zunehmend, z.B. zur Untersuchung der Spezifität von Enzymen oder zur Analyse von Epitopen, in der Forschung eingesetzt.^[4] Zuckermikroarrays stehen erst am Anfang ihrer Entwicklung, versprechen jedoch wichtige Erkenntnisse im Bereich zellulärer Erkennungsprozesse, deren Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind.^[5] Der Zugang zu Zuckermikroarrays wurde bisher durch die schlechte synthetische Erreichbarkeit komplexer Zucker erschwert.^[6] Mikroarrays organischer Wirkstoffmoleküle gelten in der Wirkstoffforschung als mögliche Alternative zu Hochdurchsatzscreenings im Rahmen der Identifizierung von Proteinliganden.^[7] Proteinmikroarrays sind zunehmend kommerziell erhältlich, kommen aber bislang nur in geringem Umfang zur Anwendung, da Proteine, wie oben beschrieben, zu den komplexesten und empfindlichsten Biomolekülen gehören und die Herstellung von Proteinmikroarrays komplizierter ist als die von Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle. Dennoch wiegen die Vorteile eines Einsatzes von Proteinmikroarrays in der Proteom- oder pharmazeutischen Wirkstoffforschung potentiell die Schwierigkeiten bei ihrer Herstellung auf, wie in einigen beeindruckenden Beispielen gezeigt werden konnte.^[8] Vorstellbar ist die routinemäßige

Mikroarraytyp	Anwendungsbereich
DNA-Mikroarray	<ul style="list-style-type: none">• Genexpressionsanalyse• Transkriptomik (mRNA)• Untersuchung von Mikro-RNA• Genomanalyse• Pharmacogenomik
Peptidmikroarray	<ul style="list-style-type: none">• Enzymspezifitätsanalyse (Kinasen, Proteasen, Phosphatasen)• Epitopbestimmung• Untersuchung von Peptid-Ligandwechselwirkungen• Peptidwirkstoffe• Serenanalytik
Zuckermikroarray	<ul style="list-style-type: none">• Untersuchung von Zell-Zell- bzw. Zell-Virus-Erkennung• Antigenbestimmung• Identifizierung von Rezeptorliganden
Wirkstoffmikroarray	<ul style="list-style-type: none">• Identifizierung von Proteinliganden (Wirkstoffforschung)
Proteinmikroarray	<ul style="list-style-type: none">• Proteomik• Wirkstoffforschung• Biomarkeridentifizierung

Tabelle 1: Typen von Biomolekülmikroarrays und deren Anwendungsbereiche (für Referenzen siehe Text).

Untersuchung des gesamten Proteoms eines Organismus mit einem einzigen Mikroarray ähnlich wie im Fall der Expressionsanalyse mit Hilfe von DNA-Mikroarrays. Es ist davon auszugehen, dass diese umfassenden Proteomanalysen wertvolle Erkenntnisse liefern, die dem genetischen Code nicht zu entnehmen, daher mit DNA-Mikroarrays, aber auch mit den klassischen Methoden der Proteomforschung nicht zugänglich sind, und so das Verständnis zellulärer Prozesse ermöglichen.

Mikroarrays werden derzeit üblicherweise mit Spottingrobotern hergestellt, die Tropfen einer Biomoleküllösung auf eine Chipoberfläche aufsetzen oder aufschleudern und so typischerweise punktförmige Flächen (Spots) mit einem Durchmesser im Bereich von 100-200 μm erzeugen. Die eigentliche Immobilisierung kann dabei chemisch oder physikalisch erfolgen (siehe unten). Nanotechnologische Ansätze bieten die Möglichkeit, den Durchmesser der Biomolekulpunkte auf der Mikroarrayoberfläche bis in den Nanometerbereich zu verringern und damit eine weit höhere Dichte an Biomolekulpunkte auf der Oberfläche und dadurch Analysen in größerem Maßstab zu ermöglichen (Nanoarray). Mit Hilfe der Polymerstiftlithographie (polymer pen lithography, PPL) gelang mit nanometerdünnen Polymerstiften kürzlich die Herstellung eines Protein nanoarrays dreier Proteine mit einem Punktdurchmesser von 65 nm.^[9] Aufgrund der offensichtlichen Vorteile der Mikroarrayminiaturisierung sind weitere Fortschritte in diesem Bereich zu erwarten.

1.2 Biochips mit Biomolekülmikro- und -nanostrukturen

Eine von Mikroarrays zu unterscheidende Klasse von Biochips sind Oberflächen mit geometrisch definierten Biomolekülmikrostrukturen. Diese Plattformen, die für die Hochdurchsatzanalysen der Genomik oder Proteomik weniger geeignet sind, versprechen Anwendungen in vielen Bereichen der Nanobiotechnologie, z.B. als Biosensoren oder für die Erzeugung künstlicher Gewebe (tissue engineering).^[8] Kürzlich nutzten Lieber et al. nanoröhrenbasierte Feldeffekttransistoren zur elektrischen Detektion von Antigenen in Serenproben von Krebspatienten.^[10] Während die Herstellung von Mikroarrays mit kommerziell erhältlichen Spotting-Robotern unkompliziert ist, gestaltet sich die Herstellung mikrostrukturierter Biochips schwieriger, da die Biomolekülimmobilisierung geometrisch kontrolliert erfolgen muss. Als Mikrostrukturierungsverfahren haben sich der Mikrokontaktdruck (microcontact printing, μ CP)^[11] und die Dip-Pen-Nanolithographie (DPN)^[12] bewährt (Abbildungen 3a und 3b). Durch den Einsatz von flexiblen Stempeln ermöglicht der Mikrokontaktdruck in einem Schritt die Herstellung von Mikrostrukturen auf zentimetergroßen Flächen mit minimalen Strukturgrößen von 1 μ m. Für jede Strukturgeometrie wird jedoch ein eigener Stempel benötigt. Dip-Pen-Nanolithographie arbeitet mit AFM-Spitzen (atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie) und erreicht minimale Strukturgrößen von weniger als 100 nm, ermöglicht also eine Miniaturisierung mikrostrukturierter Biochips in den Nanometerbereich hinein, ist aber langsamer als der Mikrokontaktdruck.^[11] Beide Methoden verwenden chemische Reaktionen oder physikalische Wechselwirkungen für die eigentliche Immobilisierung der Biomoleküle auf der Chipoberfläche. Die Vorteile nanostrukturierter Biochips entsprechen den für die Nanoarrays diskutierten, da eine Verkleinerung der Biomolekülstrukturen auch in diesem Fall eine höhere Strukturichte auf der Oberfläche und damit entweder eine größere Anzahl an Strukturelementen oder miniaturisierte Plattformen, z.B. für kleinste Biosensoren, ermöglicht. Eine interessante Alternative zur Herstellung mikrostrukturierter Biochips und Oberflächen bieten photochemische Methoden (Abbildung 3c). Verschiedene photochemische Immobilisierungsverfahren wurden in der Vergangenheit entwickelt (siehe unten).

Licht als Reaktionsinitiator ermöglicht die flexible Steuerung von Strukturform und -größe auf der zu strukturierenden Oberfläche mit Hilfe etablierter optischer Methoden z.B. durch Verwendung von Spiegelsystemen.^[13] Da die Biomolekülimmobilisierung in diesem Fall kontaktlos durchgeführt wird, ist sie zudem verschleißfrei. Ein Nachteil optischer Methoden ist das durch das Beugungslimit gesetzte, untere Limit der Biomolekülstrukturengröße, das im dreistelligen Nanometerbereich liegt. Dies kann jedoch mit Hilfe von optischen Nahfeldmethoden umgangen werden, so dass Nanostrukturen mit einer Linienbreite von unter 10 nm zugänglich werden.^[14, 15] Weitere Nachteile sind hochreaktive Zwischenstufen, die

1. Einleitung

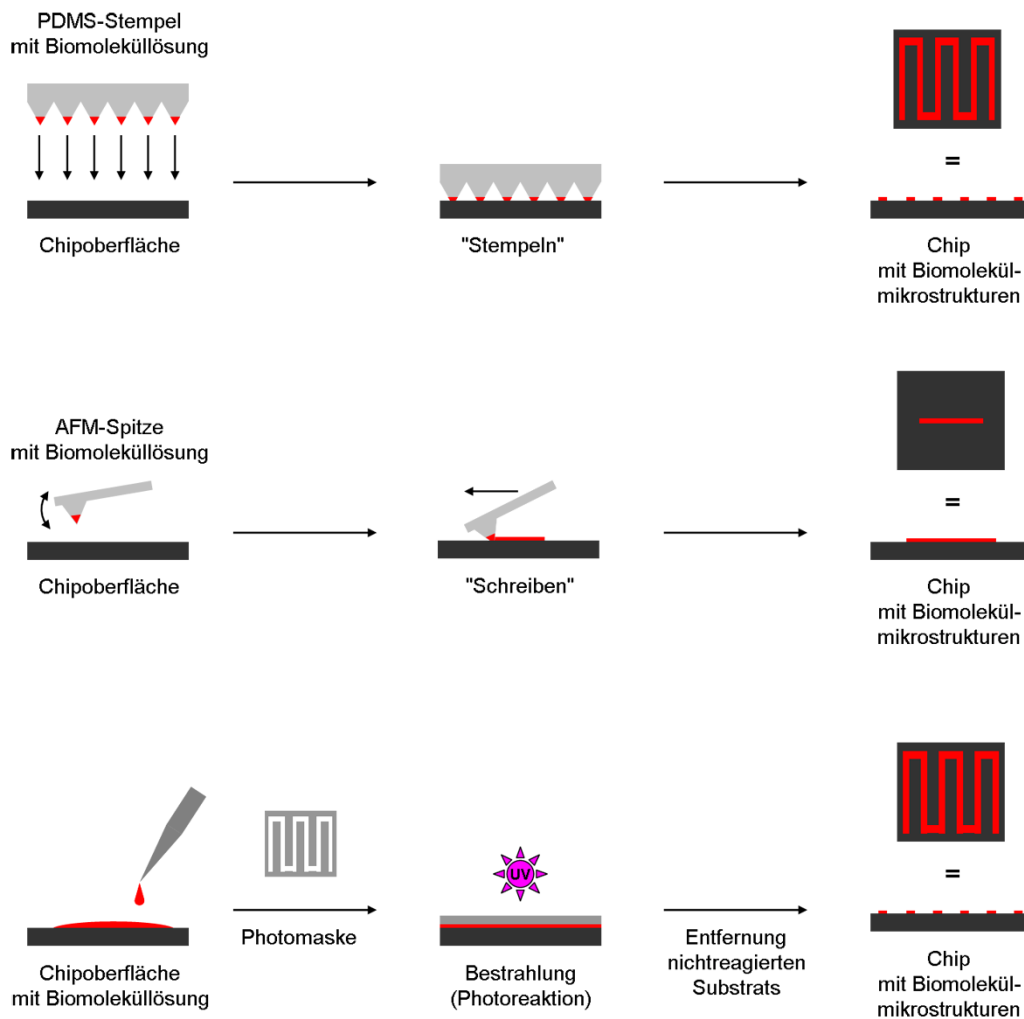


Abbildung 3: Herstellung von Biochips mit Biomolekülmikrostrukturen. a) Mikrokontaktdruck. Verwendet wird ein mit Biomoleküllösung benetzter, elastischer PDMS-Stempel (Polydimethylsiloxan) zur Erzeugung von Mikrostrukturen. Die eigentliche Biomolekülimmobilisierung kann physikalisch oder chemisch erfolgen. b) Dip-Pen-Nanolithographie. Mit Hilfe einer AFM-Spitze (atomic-force microscopy, Rasterkraftmikroskopie) werden Biomolekülstrukturen auf eine Oberfläche geschrieben. Paralleler Einsatz vieler Spitzen ermöglicht das Anfertigen einer großen Zahl von Strukturen. Wie im Fall des Mikrokontaktdrucks erfolgt die Biomolekülimmobilisierung chemisch oder physikalisch. c) Photolithographische Mikrostrukturierung. Unter Ausnutzung einer photochemischen Reaktion erfolgt die Herstellung von Mikrostrukturen durch Bestrahlung einer Biomolekülschicht durch eine Photomaske.

während der Photoimmobilisierung auftreten und zu Nebenreaktionen führen können. Ferner werden oft Aktivierungswellenlängen im Bereich unterhalb von 300 nm verwendet, der für empfindliche Biomoleküle, wie z.B. Proteine, schädlich ist.^[16] Von Interesse sind daher photochemische Methoden, die eine milde Photomikrostrukturierung von empfindlichen Biomolekülen ermöglichen, um den gegenüber kontaktbasierten Methoden, wie z.B. DPN oder μ CP, großen Vorteil der Flexibilität im Hinblick auf Strukturgröße und -geometrie nutzen zu können.

1.3 Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen

Nach Auftragung einer Biomoleküllösung auf die Chipoberfläche mittels Spotting oder mittels eines Strukturierungsverfahrens wie μ CP oder DPN wird außer im Fall einer rein physikalischen Adsorption eine chemische Reaktion für die eigentliche Biomolekülimmobilisierung benötigt. Chemische Immobilisierungsverfahren für niedermolekulare Biomoleküle werden hier nicht detailliert vorgestellt, da bei geeignetem Funktionalisierungsmuster bzw. gezielter chemische Synthese stets eine zu den übrigen funktionellen Gruppen des Moleküls orthogonale Kupplungsmethode, wie z.B. die Reaktion zwischen Thiolen und Michaelakzeptoren oder Aminen und N-Hydroxysuccinimidfunktionen, gefunden werden kann, von denen eine Vielzahl zur Verfügung steht.^[7] Für niedermolekulare, oligomere Biomoleküle, wie DNA oder Peptide, sind zudem Biochipherstellungsprozesse auf der Basis photoabspaltbarer Schutzgruppen entwickelt worden, die eine Synthese direkt auf der Biochipoberfläche ermöglichen.^[17, 18] Während die Technologie sich im Fall der Peptidmikroarrays nicht durchgesetzt hat,^[19] werden kommerzielle DNA-Mikroarrays nach diesem Ansatz hergestellt (z.B. DNA-Mikroarrays der Firma Affymetrix).^[17]

Aufgrund der Komplexität und Empfindlichkeit von Proteinen stellt die Anfertigung von Proteinbiochips besondere Anforderungen an das verwendete Immobilisierungsverfahren und wird im Folgenden näher betrachtet. Die Immobilisierung von Proteinen kann chemisch oder physikalisch erfolgen, muss jedoch unter milden Reaktionsbedingungen stattfinden, da andernfalls die Gefahr einer Denaturierung und somit von totalem Aktivitätsverlust des Proteins besteht. In der jüngeren Vergangenheit sind daher viele Immobilisierungsmethoden speziell für Proteine entwickelt worden.^[20, 21] Diese können nach zwei Kriterien klassifiziert werden (Abbildung 4): Die Immobilisierung kann entweder unter Ausbildung einer kovalenten Bindung oder nicht-kovalent erfolgen. Nicht-kovalente Immobilisierung ist einfacher zu erzielen, ist jedoch reversibel, so dass die Gefahr einer Wiederablösung des Proteins von der Oberfläche besteht. Kovalente Proteinimmobilisierung ist irreversibel, setzt jedoch eine chemische Reaktion voraus. Ferner kann die Immobilisierung in zufälliger Orientierung, d.h. ungerichtet über beliebige chemische Funktionalitäten des Proteins (Tabelle 1), oder in definierter Orientierung, d.h. gerichtet über eine bestimmte chemische Gruppe erfolgen (Tabelle 2). Ungerichtete Immobilisierung ist leichter zu erreichen, da keine Modifikation des zu immobilisierenden Proteins notwendig ist, birgt jedoch das Risiko einer ungünstigen Orientierung des Proteins auf der Oberfläche, die ggf. das Binden eines Analyten behindern und so das Ergebnis einer Untersuchung verfälschen kann.^[22] Gerichtete Immobilisierung erzeugt eine homogen ausgerichtete Proteinpopulation auf der Oberfläche, erfordert aber die Einführung einer zum Rest der funktionellen Gruppen des Proteins orthogonalen Funktionalität. Beispiele für die vier verschiedenen Kombinationen sind in Abbildung 4 abgebildet. Eine vollständige

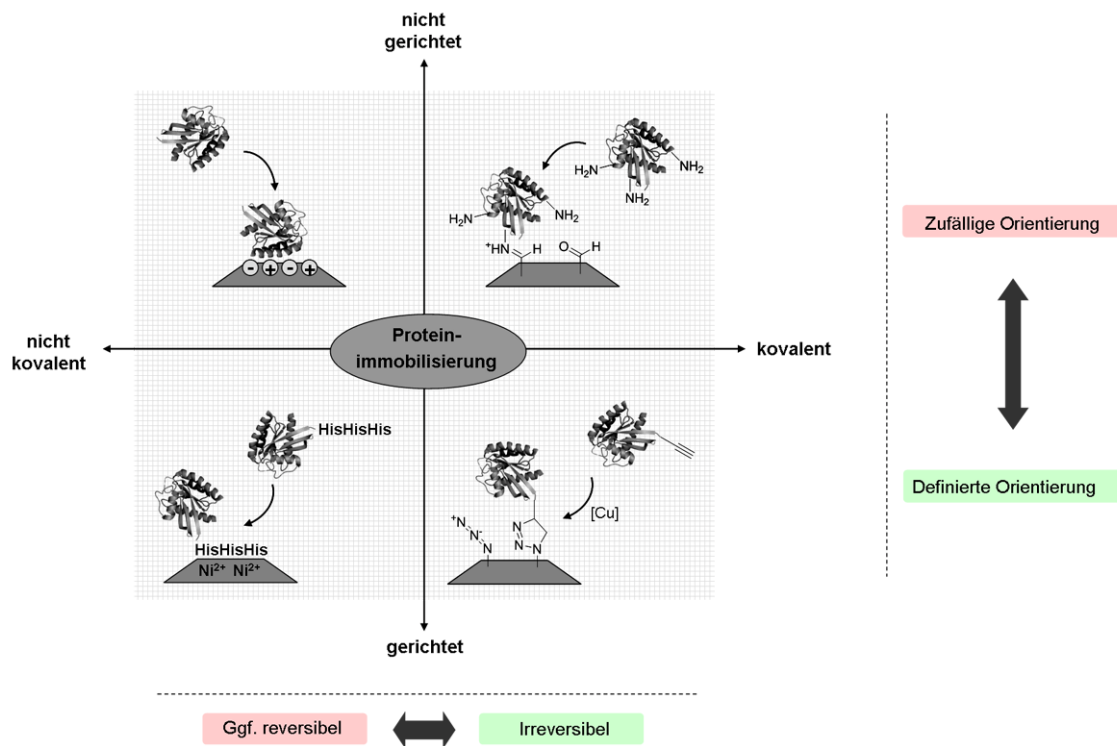


Abbildung 4: Klassifizierung von Proteinimmobilisierungsmethoden nach kovalenter und nicht-kovalenter bzw. gerichteter und nicht-gerichteter Immobilisierung mit Beispielen (Adsorption über Ladungsinteraktionen, Immobilisierung auf Aldehydoberflächen über Lysinseitenketten, Immobilisierung polyhistidin-funktionalisierter Proteine auf Nickeloberflächen, Immobilisierung alkin-funktionalisierter Proteine auf Azidoberflächen). Außenseitig sind die Vor- oder Nachteile der jeweiligen Variante dargestellt (grün bzw. rot hinterlegt).

Zusammenstellung dieser Methoden erfolgte in kürzlich erschienenen Übersichtsartikeln.^[20, 21] Ungerichtete, nicht-kovalente Immobilisierung wird derzeit überwiegend durch Aufbringen von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen^[23] durchgeführt, während für ungerichtet-kovalente Immobilisierung vorwiegend aldehyd-^[24] oder epoxid-,^[25] aber auch N-hydroxysuccinimidester-^[26] oder isothiocyanatfunktionalisierte^[27] Chipoberflächen genutzt werden, die unter nukleophilem Angriff reaktiver Seitenketten auf der Außenseite des Proteins reagieren. Alternativ wurden Säurefunktionen von Proteinen gegen nukleophilen Angriff aktiviert, und diese so auf Aminoberflächen immobilisiert.^[28] Ferner zählen die photochemischen, auf Diazirin-^[29] oder Benzophenonoberflächen^[30, 31] basierenden Immobilisierungsmethoden zu dieser Klasse, da diese unter Bestrahlung hochreaktive Carbene bzw. Radikale generieren, die nachfolgend ungerichtet in C-H-Bindungen von Proteinen insertieren können. Photoabspaltbare Schutzgruppen,^[18, 32] und photochemisch reaktive Zusätze, wie z.B. Photosäuregeneratoren,^[33, 34] werden zur lokalen Entschützung reaktiver Funktionen, wie z.B. von Aminen, und damit zur geometrisch kontrollierbaren, aber kovalent-ungerichteten Proteinimmobilisierung genutzt.

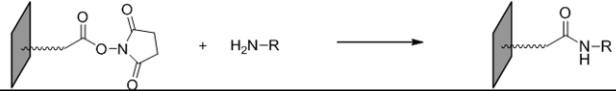
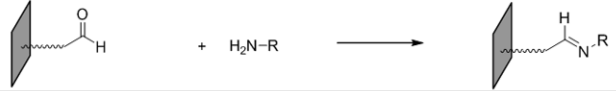
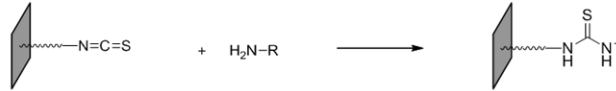
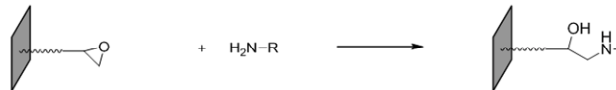
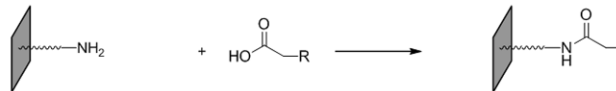
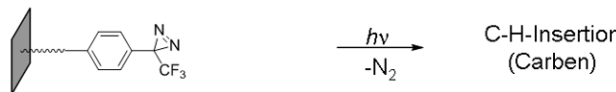
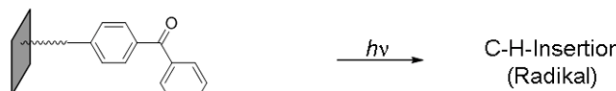
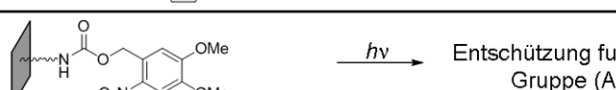
Oberfläche	Immobilisierungsreaktion	Referenz
Nitrozellulose	Nicht-kovalente Immobilisierung über elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen	[23]
NHS-Ester		[26]
Aldehyd		[24]
Isothiocyanat		[27]
Epoxid		[25]
Amin (mit Kupplungsreagenz)		[28]
Diazirin		[29]
Benzophenon		[30,31]
Nitrobenzyl (photoabsplaltbare Schutzgruppe)		[18,32]

Tabelle 2: Übersicht über ungerichtete Proteinimmobilisierungsmethoden (oben: nicht-kovalent, unten: kovalent, NHS: N-Hydroxysuccinimid).

Als prominenteste Vertreter nicht-kovalent-gerichteter Immobilisierung sind das Biotin-Streptavidinsystem mit einer Affinität im Bereich von $K_D \sim 10^{-14} \text{ l mol}^{-1}$,^[35, 36] die Wechselwirkung zwischen der Polyhistidinsequenz und Nickel-funktionalisierten Oberflächen^[37] sowie die Immobilisierung über Antikörper^[38] oder DNA^[39] zu sehen. Kovalente und gerichtete Immobilisierungen nutzen enzymatische Reaktionen, wie im Fall der O-6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT, SNAP-Tag)^[40, 41] oder der Phosphopantheteinyltransferase,^[21] native chemische Ligation (NCL) bzw. Proteintranssplicing^[42-44] oder bioorthogonale, d.h. proteinkompatible, chemische Reaktionen, wie die Staudinger-Ligation,^[45] die Diels-Alder-Zykloaddition^[46] und die kupferkatalysierte Huisgen-Zykloaddition (Klickchemie).^[47]

Als vorteilhafteste Kombination dieser Kriterien in Bezug auf die Qualität und Leistungsfähigkeit der erhaltenen Biochipoberfläche ist die kovalente und gerichtete Immobilisierung zu sehen, da diese zu irreversibel und in definierter Orientierung immobilisierten Proteinen führt. Dennoch werden Proteinmikroarrays derzeit meist unter

1. Einleitung

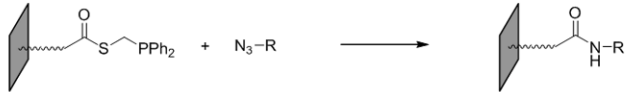
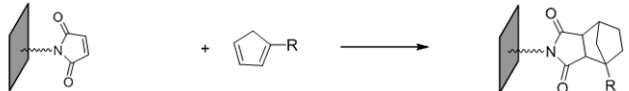
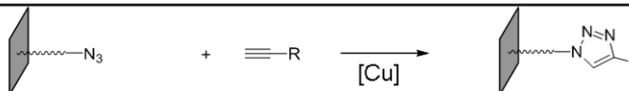
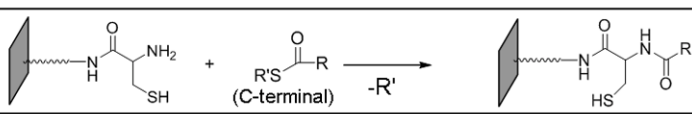
Oberfläche	Immobilisierungsreaktion	Referenz
Biotin	Nicht-kovalent über Biotin-Streptavidin/Avidin-Wechselwirkung	[35,36]
Nickel-NTA	Nicht-kovalent über Komplexierung von Polyhistidin	[37]
DNA	Nicht-kovalent über Hybridisierung	[39]
Phosphin (Staudingerligation)		[45]
Maleimid (Diels-Alder-Zykloaddition)		[46]
Azid (Huisgen-Zykloaddition)		[47]
Cystein (NCL)		[42-44]
O-6-Benzylguanin (SNAP-Tag)	Enzymatisch über O-6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase	[40,41]
Coenzym A	Enzymatisch über Phosphopanthetheinyltransferase	[21]

Tabelle 3: Übersicht über gerichtete Proteinimmobilisierungsmethoden (oben: nicht-kovalent, unten: kovalent; NTA: Nickeltriessigsäure, NCL: Native chemische Ligation).

Verwendung ungerichteter Immobilisierungsmethoden, wie z.B. der kovalenten Immobilisierung über Lysinseitenketten auf Aldehydoberflächen oder der nicht-kovalenten Immobilisierung durch Adsorption auf Nitrocellulosemembranen hergestellt, da diese nicht die Modifikation der zu immobilisierenden Proteine erfordern und somit schnell durchzuführen sind.^[20] Trotz vieler Fortschritte hat sich bislang keine einfach und schnell, d.h. im Idealfall unter Verwendung von aus der Proteinexpression stammendem, nichtaufgereinigtem Expressionszellysat durchzuführende, milde, kovalente und gerichtete Proteinimmobilisierungsmethode für die Herstellung von Proteinbiochips durchgesetzt.^[20] Aus diesem Grund bleibt die Entwicklung neuer und vereinfachter Methoden in diesem Bereich von besonderem Interesse.

1.4 Biochipoberflächen

Verschiedene Materialien sind für die Herstellung von Biochips eingesetzt worden. Für die Herstellung von DNA-Mikroarrays, dem häufigsten Biochiptyp, wird Glas verwendet, da es glatt, transparent, mechanisch stabil, chemisch modifizierbar und zudem günstig ist.^[48] Ferner existiert eine Vielzahl chemischer Methoden zur Funktionalisierung von Glas, die überwiegend

auf der Reaktivität der Silanolgruppen an der Glasoberfläche basieren.^[49] Die leichte Verfügbarkeit und chemische Funktionalisierbarkeit erklären die weitläufige Anwendung von Glasoberflächen als Biochipmaterial. Goldoberflächen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle, da sie die einfache Herstellung von SAMs (self-assembled monolayer, selbstorganisierende Monolayer) ermöglichen und standardmäßig für SPR-Messungen (surface plasmon resonance, Oberflächenplasmonresonanz), z.B. im Biacore-System, verwendet werden.^[50] Goldoberflächen werden meist durch Auftragen dünner Goldfilme sowie thermische Abscheidung auf einem Trägermaterial, wie z.B. Glas, erhalten.^[50] Inkubation von Goldfilmen mit Thiolverbindungen führt zu deren spontaner Immobilisierung in einer homogenen Monoschicht, deren Oberflächenchemie durch Wahl geeigneter Anker-moleküle gesteuert werden kann, so dass eine Vielzahl verschieden funktionalisierter Oberflächen für die Herstellung von Goldoberflächen-basierten Biochips zur Verfügung steht. Silizium wurde ebenfalls verwendet, da es sich wie Glas durch mechanische Stabilität sowie durch hohe elektrische Leitfähigkeit auszeichnet und in Form von hochplanaren Wafern aus der Halbleiterindustrie zugänglich ist. Da es jedoch nicht transparent ist, ist es nicht uneingeschränkt in Biochipanwendungen einsetzbar, die auf optische Analysemethoden zurückgreifen. Ein vergleichsweise neues Biochipmaterial ist ITO (indium tin oxide, Indiumzinnoxid), dessen Filme auf Glas leitfähig, aber transparent sind und so eine Verknüpfung von elektrischen und optischen Detektionsmethoden z.B. in Biosensoren ermöglichen könnten. Ferner kommen Polymere als Biochipmaterial zum Einsatz. Polystyrol ist das meistgenutzte Trägermaterial für ELISA-Anwendungen (enzyme-linked immunosorbent assay),^[51] während Nitrozellulose auf Glas zur Herstellung von Proteinmikroarrays verwendet wird (z.B. FAST slides, Whatman).^[23] Hydrogele aus Polysacchariden, wie Dextran, oder hydrophilen Polymermaterialien, wie Polyacrylamid, ermöglichen im Gegensatz zu zweidimensionalen Chipmaterialien den Einschluss von Biomolekülen in einer homogenen, wässrigen Umgebung, die beispielsweise der Denaturierung von Proteinen entgegenwirken kann.^[52, 53] Nachteile sind jedoch oft hohe Hintergrundsignale in Analysen der zugehörigen Biochips sowie Massentransporteffekte durch Diffusion.

In Szenarien, die die Inkubation von Biochips mit Biomoleküllösungen, wie z.B. in Interaktionsassays, vorsehen, ist es häufig notwendig, die unspezifische Anbindung von Biomolekülen und so das Hintergrundsignal zu reduzieren. Diese tritt verstärkt im Fall von Proteinen auf, da diese über eine Vielzahl von Wechselwirkungen, wie elektrostatische, hydrophobe oder Lewis-Säure-Base-Wechselwirkungen, mit Oberflächen interagieren können.^[54] Verschiedene Oberflächenmodifikationen auf der Basis natürlicher oder künstlicher Polymere, wie Elastin oder Polyethylenglykol, sind zur Vermeidung dieser unspezifischen Wechselwirkungen entwickelt worden.^[20] Es wird angenommen, dass die Hydrophilie und hohe Ordnung von Polyethylenglykolschichten auf Oberflächen für ihre proteinabweisende Eigenschaft verantwortlich ist.^[55] Trotz vieler Fortschritte in diesem Bereich bleibt der Einsatz

1. Einleitung

klassischer Blockierreagentien, wie BSA (bovines Serumalbumin) oder Milchpulver, für eine Verhinderung unspezifischer Proteinadsorption bislang notwendig.

1.5 Die Thiol-En-Reaktion

Einen neuen Zugang zur Immobilisierung von Biomolekülen könnte die sogenannte Thiol-En-Reaktion bieten, in der die Umsetzung eines Thiols und einer Doppelbindung zu einem Thioether stattfindet. Die Reaktion folgt einem radikalischen Mechanismus, und kann sowohl photochemisch, thermisch als auch mit Hilfe radikalischer Initiatoren initiiert werden (Abbildung 5).^[56] Als erster Schritt erfolgt die homolytische Spaltung einer Thiofunktion, aus der ein Thiylradikal entsteht, das nachfolgend für den Angriff auf die Doppelbindung eines Reaktionspartners zur Verfügung steht. Die daraus resultierende, ein Kohlenstoffradikal tragende Zwischenstufe abstrahiert ihrerseits ein Wasserstoffradikal von einer weiteren Thiofunktion, so dass der finale Thioether sowie ein neues Thiylradikal entstehen und die Kettenreaktion fortgesetzt werden kann. Als Nebenprodukt treten aus der Homokupplung zweier Thiylradikale resultierende Disulfide auf, aus denen jedoch mit Hilfe von Reduktionsmitteln, wie z.B. DTT (Dithiothritol), wieder das thiofunktionalisierte Edukt regeneriert werden kann.

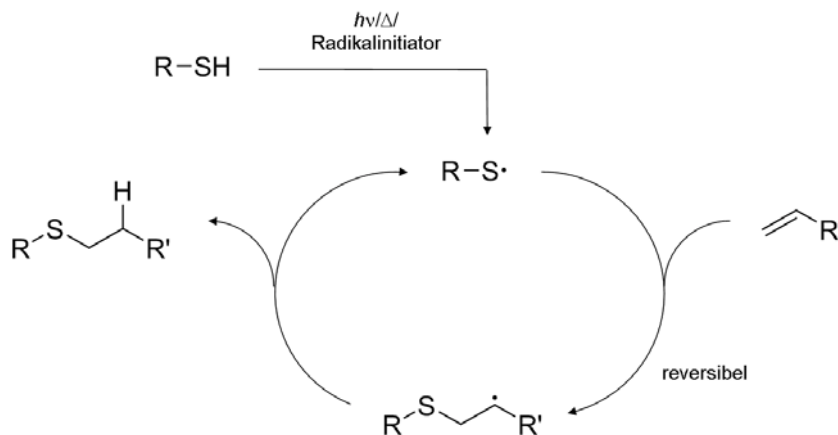


Abbildung 5: Mechanismus der Thiol-En-Reaktion.

Die Entdeckung der Thiol-En-Reaktion liegt bereits über 100 Jahre zurück.^[57] Während sie in der Polymerchemie, z.B. in der photochemischen Oberflächenbeschichtung, bereits seit längerer Zeit etabliert ist,^[56] wurde ihr Potential für Ligationsreaktionen, vergleichbar mit der kupferkatalysierten, 1-3-dipolaren Cycloaddition von Aziden an Alkine (Huisgen-

Zykloaddition),^[58] erst kürzlich entdeckt. So gelang ausgehend von leicht zugänglichen, ungesättigten Polymeren die Herstellung von Fluorpolymeren oder Polymeren, die mit verschiedenen Biomolekülen wie Zuckern, Aminosäuren oder Peptiden modifiziert waren.^[59-61] Ferner wurde über die Herstellung verschiedener organischer und bioorganischer Dendrimere wie z.B. von Glykodendronen berichtet.^[62-64] In jüngster Zeit folgte die Verwendung der Thiol-En-Reaktion zur Erzeugung von Proteinkonjugaten.^[65, 66]

Vorteile der Thiol-En-Reaktion sind zu Biomolekülen kompatible und chemisch stabile Reaktanden, milde Reaktionsbedingungen und ein schneller Reaktionsablauf, der im Vergleich zur für Ligationsreaktionen etablierten kupferkatalysierten Huisgen-Zykloaddition keine Schwermetallkatalyse erfordert.^[56] Die Thiol-En-Reaktion wäre daher als Grundlage für eine generell anwendbare Biomolekülimmobilisierungsmethode geeignet. In einem Immobilisierungsszenario bestünde zudem ein weiterer Vorteil im Einsatz von Licht als Reaktionsinitiator, da auf diese Weise die flexible Steuerung der Geometrie der erhaltenen Biomolekülstrukturen auf Biochips ermöglicht würde.

2. Zielsetzung

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, sind Biochips wertvolle Werkzeuge für Hochdurchsatzanalysen, wie z.B. in der Genomik oder Proteomik, sowie für Anwendungen im Bereich der Nanobiotechnologie. Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen für die Herstellung von Biochips werden intensiv erforscht. Die Eigenschaften der Thiol-En-Reaktion lassen sie als geeignet für eine schonende Immobilisierung von Biomolekülen erscheinen. Zudem würde die Möglichkeit zur Photoaktivierung einer Methode auf Basis der Thiol-En-Reaktion Flexibilität im Hinblick auf die Geometrie der erzeugten Biomolekülstrukturen verschaffen, da diese mit optischen Techniken leicht zu kontrollieren wäre. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine Biochipherstellungsmethode auf Basis der Thiol-En-Reaktion entwickelt und angewendet werden.

In einem ersten Schritt sollte die Thiol-En-Reaktion in Lösung untersucht werden, um geeignete Reaktionspartner und -parameter für eine Immobilisierungsmethode zu etablieren. Mit diesen Erkenntnissen sollte eine Photoimmobilisierungsmethode auf Basis der Thiol-En-Reaktion entwickelt werden. Ausgegangen werden sollte dabei von Ergebnissen von Dr. Maja Köhn (AG Waldmann, MPI Dortmund).^[67] Im Rahmen einer Optimierung sollten ferner verschiedene Oberflächentypen und Reaktionsbedingungen untersucht werden. Nachfolgend sollte die Methode zur Immobilisierung niedermolekularer Biomoleküle in Mikroarrays und mikrostrukturierten Biochips eingesetzt werden.

Es sollte die Ausweitung der Photoimmobilisierungsmethode auf die komplexeren und empfindlicheren Proteine folgen, da die Thiol-En-Reaktion eine schonende, aber kovalentgerichtete Immobilisierung von Proteinen in einem Schritt ermöglichen könnte, wobei gleichzeitig die Flexibilität photochemischer Immobilisierungsmethoden genutzt werden könnte. Proteinmikroarrays sowie mikrostrukturierte Proteinbiochips sollten hergestellt werden, um die generelle Anwendbarkeit der Methode zu demonstrieren.

Ferner war eine Strategie zu etablieren, die eine kovalentgerichtete Immobilisierung von Proteinen ohne zeitaufwändige Aufreinigung und chemische Modifikation, d.h. direkt aus Expressionslysat, ermöglichen würde. Immobilisierungsmethoden dieser Art könnten die Herstellung von Proteinbiochips stark vereinfachen, jedoch sind in diesem Bereich bislang nur wenige Beispiele bekannt.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Photoimmobilisierungsmethode die Möglichkeit der Biochipminiaturisierung von mikrostrukturierten hin zu nanostrukturierten Oberflächen bieten könnte. Nanoarrays oder nanostrukturierte Biochips wären von Vorteil, da sie eine höhere Dichte von Biomolekülstrukturen ermöglichen würden. Diese könnte sowohl eine Ausweitung des Umfangs der mit Biomolekülarrays durchgeführten Hochdurchsatzanalysen erlauben als auch zu miniaturisierten, nanobiotechnologischen Analyseplattformen führen.

3. Allgemeiner Teil

Einer Anwendung der Thiol-En-Reaktion zur Photoimmobilisierung von Biomolekülen ging zunächst die Bestimmung möglichst vorteilhafter Reaktionsparameter voraus, da trotz vielfältiger Anwendung der Reaktion (siehe Abschnitt 1.5) zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit keine Informationen über möglichst günstige Reaktionspartner, d.h. Thiol-Olefin-Kombinationen, existierten, die in verdünnter Lösung hohe Ausbeuten erzielen und damit als Grundlage für ein Photoimmobilisierungssystem auf Basis der Thiol-En-Reaktion dienen könnten. In Abschnitt 3.1 dieser Arbeit werden daher zunächst Lösungsexperimente vorgestellt, die zum einen der Identifikation eines für nachfolgende Photoimmobilisierungsexperimente geeigneten Reaktandenpaares und zum anderen der Untersuchung der Toleranz der Thiol-En-Reaktion gegenüber unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sowie der Optimierung dienen. In Abschnitt 3.2 folgt die Entwicklung und Optimierung eines Thiol-En-Photomikrostrukturierungsprozesses. Die gewonnenen Erkenntnisse werden im Abschnitt 3.3 auf die Photomikrostrukturierung verschiedener niedermolekularer Biomoleküle angewendet. Abschnitt 3.4 behandelt die Herstellung von Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle mit Hilfe der Thiol-En-Reaktion. Dort werden, ähnlich wie in Abschnitt 3.2, zunächst Parameter etabliert und dann auf verschiedene Biomoleküle wie Biotin, Oligonukleotide und Glykopeptide angewendet. Es folgt ein Übergang zur Photoimmobilisierung von Proteinen: Abschnitt 3.5 beschäftigt sich mit deren Thiol-En-Photomikrostrukturierung, während Abschnitt 3.6 die Herstellung von Proteinmikroarrays behandelt. Ferner werden Strategien zur molekularbiologischen Modifikation von Proteinen zur Optimierung der Proteinphotoimmobilisierung vorgestellt, die in Abschnitt 3.7 zur Herstellung von Proteinmikroarrays direkt aus Proteinexpressionslysaten eingesetzt werden. Abschnitt 3.8 schließt mit Versuchen zur Thiol-En-Photonanostrukturierung, in denen die Miniaturisierung von Mikrostrukturen hin zu Nanostrukturen untersucht wird.

Die in den Abschnitten 3.1 bis 3.3, 3.5.2 bis 3.5.5 sowie 3.5.8 gezeigten Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Pascal Jonkheijm (AG Waldmann, MPI Dortmund) durchgeführt, während die Arbeiten der Abschnitte 3.6.2, 3.6.3, 3.7.2.2 und 3.7.2.3 in Kooperation mit Dr. Po-Chiao Lin (AG Waldmann, MPI Dortmund) entstanden. Bei den in den Abschnitten 3.8.1 und 3.8.3 vorgestellten Arbeiten wirkten Dr. Pascal Jonkheijm sowie Dr. P.C.M. Christianen und Dr. H. Engelkamp (Radboud-Universität Nijmegen) mit. Die in Abschnitt 3.8.2 beschriebenen Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Leif Dehmelt (AG Bastiaens, MPI Dortmund).

3.1 Vorversuche zur Thiol-En-Reaktion

3.1.1 Optimierung der Thiol-En-Reaktion in Lösung und an fester Phase

Mit den in Abbildung 8 gezeigten, kommerziell erhältlichen Thiol- und Olefinverbindungen **1** bis **13** wurde der Einfluss verschiedener Reaktandenpaare auf die Thiol-En-Reaktion untersucht. Lösungen der jeweiligen Reaktanden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht zur Reaktion gebracht. Nebenreaktionen mit Sauerstoff wurden durch Verwendung von Argon als Schutzgas ausgeschlossen. Der Arbeitsablauf der Untersuchung ist in Abbildung 6 dargestellt. Um eine große Anzahl von Reaktionen parallel durchführen zu können, wurden GC-Probengläschen als Reaktionsgefäße verwendet, die in einem UV-Karussellreaktor eingebracht wurden. Auf diese Weise konnte in definierten Zeitabständen eine Vielzahl von Reaktionsproben entnommen, und die Reaktionsausbeute direkt mittels Gaschromatographie mit nachgeschalteter Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt werden. Zudem wurden verschiedene Lösungsmittel, Reaktionstemperaturen von 25 °C oder 40 °C, verschiedene pH-Werte einer wässrigen Reaktionslösung sowie zwei Bestrahlungswellenlängen und –intensitäten verglichen.

In einer zweiten, parallel durchgeführten Versuchsreihe wurde der Effekt einer einseitigen Immobilisierung eines Reaktionspartners an einem polymeren Träger untersucht, um Erkenntnisse über das Immobilisierungsverhalten verschiedener Verbindungen zu gewinnen. Der zugehörige Arbeitsablauf ist schematisch in Abbildung 7 gezeigt. Kommerziell erhältliches 2-Chlorotriethylharz wurde mit dem aminfunktionalisiertem Olefinanker **14** beladen (**15**) und nachfolgend mit mehreren Thiolverbindungen zur Reaktion gebracht. Um Nebenreaktionen mit Sauerstoff zu vermeiden, wurde auch in diesem Fall Argon als Schutzgas verwendet. Die

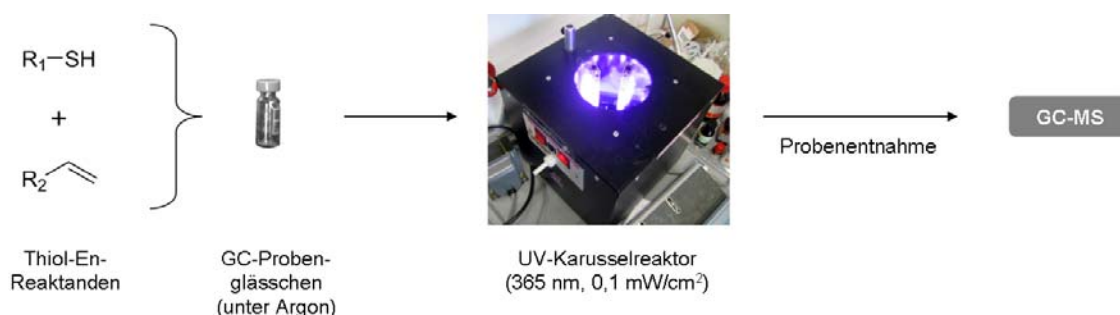


Abbildung 6: Arbeitsablauf der Versuchsreihe zur Thiol-En-Reaktion in Lösung. Verschiedene, kommerziell erhältlich Thiol- und Olefinverbindungen wurden in einer Konzentration von 1 M gelöst und in einem GC-Probengläschen luftdicht und unter Argonatmosphäre verschlossen. UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 365 nm erfolgte in einem UV-Karussellreaktor. Nach Probenentnahme erfolgte Analyse des Reaktionsgemischs mittels GC-MS.

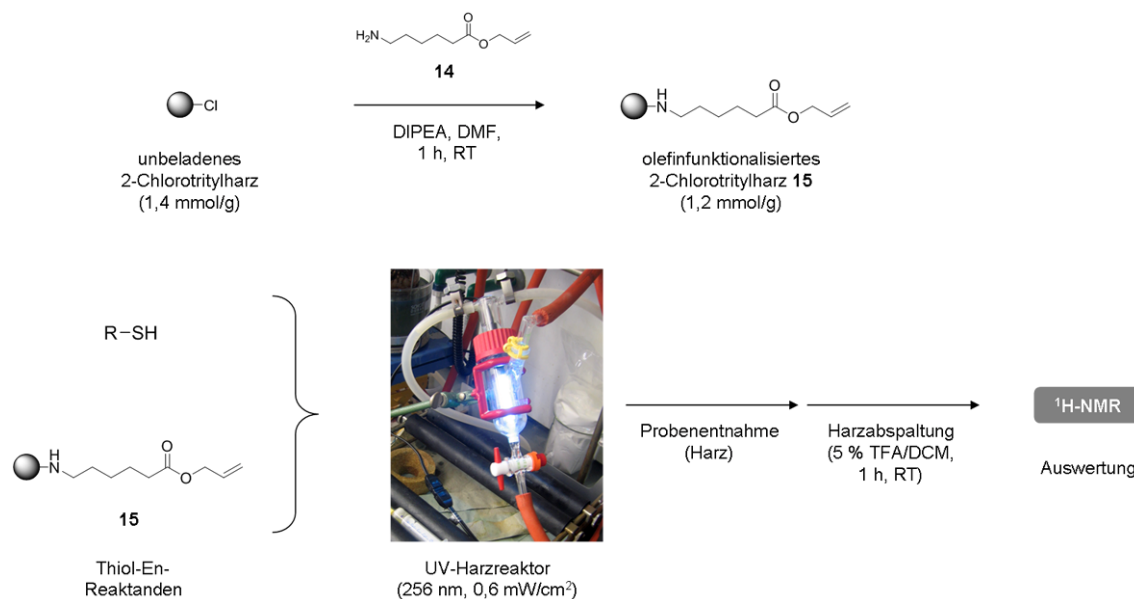
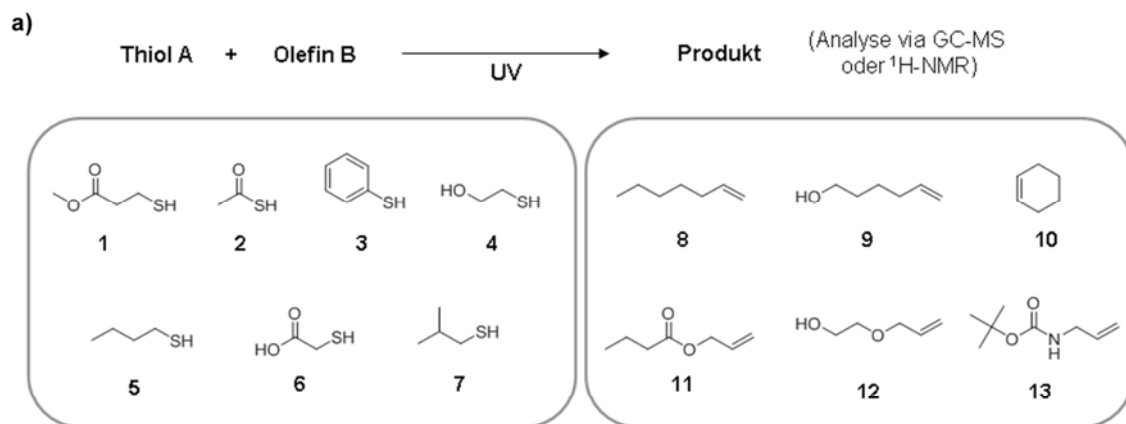


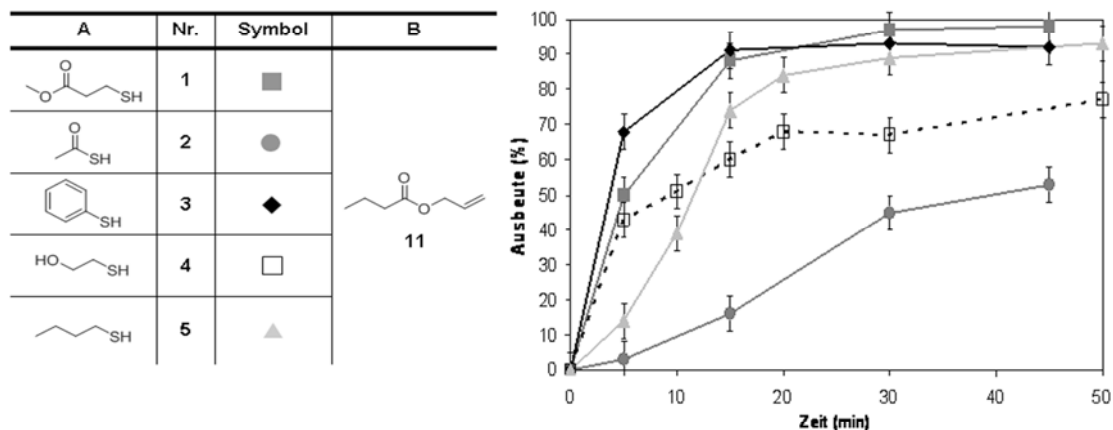
Abbildung 7: Arbeitsablauf der Versuchsreihe zur Thiol-En-Reaktion an der festen Phase. a) 2-Chlorotriethylharz mit dem olefinfunktionalisierten Aminanker **14** beladen, um eine olefinfunktionalisierte feste Phase (**15**) zu erhalten. b) Das olefinfunktionalisierte Harz wurde zu einer Thiollösung gegeben und unter Argonatmosphäre UV-Licht bei 256 nm ausgesetzt (Glasreaktor mit UV-Stablampe). Reaktionskontrolle erfolgte durch Abspaltung des Reaktionsprodukts vom Harz und Analyse mittels ¹H-NMR.

Photoreaktion wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 256 nm induziert, und die Reaktionsausbeute nach Abspaltung des Reaktionsprodukts mittels Integration charakteristischer ¹H-NMR-Signale bestimmt. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen sind in den Abbildungen 8 bis 11 dargestellt. Erkennbar ist, dass bei der Verwendung von terminalen Thiolverbindungen und terminalen Doppelbindungen die höchsten Ausbeuten erzielt wurden (Abbildungen 8b, 8c und 9a). Dieser Befund ist durch sterische Effekte zu erklären, da mit den am wenigsten sterisch gehinderten Reaktanden die höchsten Ausbeuten erzielt wurden. Elektronische Effekte führten zudem zur Ausbildung der anti-Markovnikov-Produkte, da in diesem Fall nach der Addition des Thiylradikals das stabilere Kohlenstoffradikal gebildet wird. Ein Vergleich verschiedener Lösungsmittel ergab im untersuchten Reaktionszeitfenster von 15 Minuten Ausbeuten von 25 % bis 82 % (Abbildung 9b). Die Thiol-En-Reaktion war somit kompatibel zu einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln. Eine Verringerung der Wellenlänge des eingestrahlt UV-Lichts von 365 nm auf 256 nm, d.h. einer

3. Allgemeiner Teil



b)





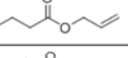
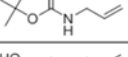



c)

A	Nr.	B	Ausbeute (%)
	1		85
	7		12
	3		n.d.

Abbildung 8: a) In Vorversuchen verwendete, kommerziell erhältliche Thiol- und Olefinverbindungen **1** bis **13**. b) Thiol-En-Reaktion mit verschiedenen Thiolverbindungen in Lösung. Die zu unterschiedlichen Zeiten ermittelten Ausbeuten sind im rechten Diagramm dargestellt (365 nm, 0,2 mW/cm², 40 °C, MeOH). c) Thiol-En-Reaktion mit verschiedenen Thiolverbindungen an der festen Phase, d.h. mit olefinfunktionalisiertem Triethylharz **15** (256 nm, 0,6 mW/cm², DMF, 3 h, 11-15 °C).

a)

A	B	Nr.	Ausbeute (%)
 5		8	99
		9	97
		10	55
		11	74
		12	64
		13	82

b)


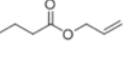
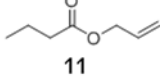
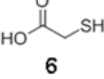
A	B	Lösungsmittel	Ausbeute (%)
 5	 11	MeOH	73
		DMF	43
		Ethylenglykol	82
		Aceton	70
		Acetonitril	25
		DMSO	64
		Diethylether	77

Abbildung 9: a) Thiol-En-Reaktion mit verschiedenen Olefinverbindungen in Lösung bei einer Reaktionszeit von 15 Minuten (365 nm, 0,2 mW/cm², 40 °C, MeOH). b) Vergleich verschiedener Lösungsmittel (15 Minuten, 365 nm, 0,2 mW/cm², 40 °C).

A	B	UV-Licht	Symbol
 11	 6	365 nm, 0,2 mW/cm ²	■
		365 nm, 10 mW/cm ²	●
		256 nm, 0,6 mW/cm ²	◆

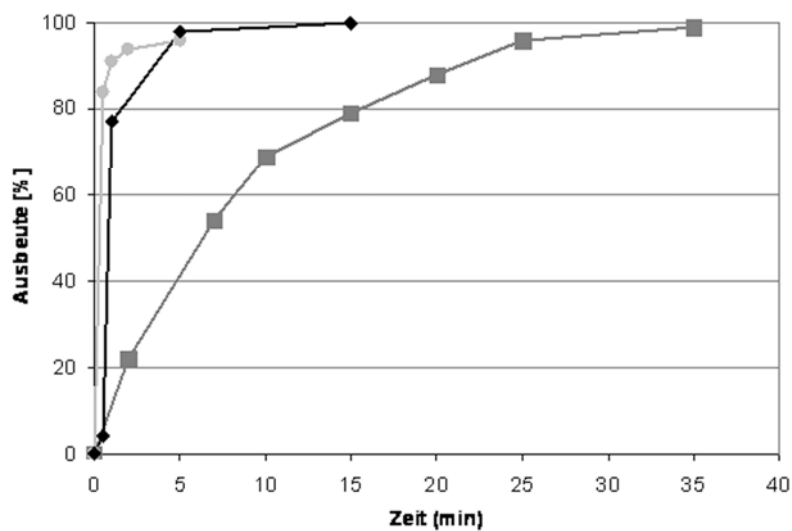

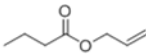


Abbildung 10: Vergleich verschiedener Bestrahlungswellenlängen und -intensitäten bei der Thiol-En-Reaktion in Lösung (25 °C für 365 nm und 10 mW/cm², sonst 40 °C, MeOH).

3. Allgemeiner Teil

a)

A	B	Solvent	Ausbeute (%) 60 min, 25 °C	Ausbeute (%) 240 min, 25 °C	Ausbeute (%) 15 min, 40 °C
 5	 11	MeOH	51	99	73
		DMF	15	40	43
		Ethylenglykol	42	89	82
		Aceton	16	90	70
		Acetonitril	10	57	25
		DMSO	n.b.	n.b.	64
		Diethylether	n.b.	n.b.	77

b)

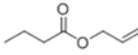
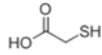
A	B	pH	Ausbeute (%)
 11	 6	4,6	40
		7,5	63
		8,7	42

Abbildung 11: a) Vergleich verschiedener Lösungsmittel bei den Reaktionstemperaturen 25 °C und 40 °C (365 nm, 0,2 mW/cm²). b) Vergleich verschiedener pH-Werte in Wasser (365 nm, 0,2 mW/cm², 40 °C, 15 Minuten).

höherenergetischen Wellenlänge sowie die Erhöhung der Lichtintensität von 0,2 auf 100 mW/cm² (365 nm) führten zur Erhöhung der Reaktionsausbeute (Abbildung 10). Die Verfünzigfachung der UV-Lichtintensität zeigte dabei einen vergleichbaren Effekt wie die Reduktion der Wellenlänge von 356 nm auf 256 nm bei vergleichbarer Lichtintensität von 0,2 bzw. 0,6 mW/cm². Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 25 °C auf 40 °C führte ebenfalls zur Erhöhung der Ausbeute (Abbildung 11a). Während beispielsweise in Methanol bei 25 °C nach 60 Minuten 51 % Ausbeute bestimmt wurden, wurden nach 15 Minuten bei 40 °C bereits 73 % Ausbeute erzielt. Ein Vergleich der drei pH-Werte 4,6, 7,5 und 8,7 in einem wässrigen Puffersystem ergab ein Maximum der Reaktionsausbeute bei einem pH-Wert von 7,5 (Abbildung 11b).

3.1.2 Zusammenfassung

Sowohl in den durchgeführten Lösungsexperimenten als auch mit einer an einem Polymerträger immobilisierten Olefinverbindung wurden mit terminalen, ungehinderten Verbindungen die höchsten Ausbeuten in der Thiol-En-Photoreaktion erzielt. Eine mögliche Erklärung ist die Reversibilität der Addition des Thiylradikals an das Olefin,^[68] die die Reaktion im Fall sterisch gehinderter Reaktionspartner stark verlangsamen könnte. Nachfolgende Immobilisierungsexperimente sollten daher mit terminal ungehinderten Thiol- und Olefinankern durchgeführt werden. Es wurde festgestellt, dass die Thiol-En-Reaktion eine Vielzahl von

Lösungsmitteln tolerierte, so dass auch die Photoimmobilisierung nicht-wasserlöslicher Biomoleküle möglich schien. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Thiol-En-Reaktion unter biologisch kompatiblen Bedingungen, d.h. in verdünnter Lösung in wässrigen Medien bei pH 7 und bei einer UV-Wellenlänge von 365 nm, einem zu Biomolekülen kompatiblen UV-Bereich,^[3, 4] durchführbar war. Die Immobilisierung der komplexen und empfindlichen Proteine erschien somit möglich. Lichtintensitätssteigerung und Verringerung der UV-Wellenlänge von 365 nm auf 256 nm sowie eine von 25 °C auf 40 °C erhöhte Reaktionstemperatur führten zur Erhöhung der Reaktionsausbeute. Da diese Reaktionsbedingungen jedoch zu Problemen bei der Immobilisierung empfindlicher Biomoleküle führen könnten (z.B. Denaturierung von Proteinen), wurden sie im Rahmen der nachfolgenden Photoimmobilisierungsexperimente nicht weiter verfolgt.

3.2 Vorversuche zur Thiol-En-Photomikrostrukturierung

Nach Untersuchung der Thiol-En-Reaktion in Lösung folgte die Entwicklung und Optimierung eines Thiol-En-Photomikrostrukturierungsprozesses (siehe Abschnitt 1.5). Als Ausgangspunkt dienten Parameter, die von Dr. Maja Köhn (AG Waldmann, MPI Dortmund) etabliert worden waren.^[67] Zunächst wurden verschiedene Oberflächentypen untersucht, um die für die Thiol-En-Photomikrostrukturierung günstigste Oberfläche zu identifizieren, mit der möglichst hohe Immobilisierungsausbeuten bei gleichzeitig möglichst niedrigem Hintergrundsignal erzielbar sein sollten. Ferner wurden Untersuchungen zu verschiedenen Ankersystemen, zur optimalen Konzentration der zu immobilisierenden Biomoleküle und zur Bestrahlungsdauer durchgeführt.

3.2.1 Der Thiol-En-Photomikrostrukturierungsprozess

In Abbildung 12b ist der allgemeine Arbeitsablauf der Thiol-En-Photomikrostrukturierung schematisch dargestellt. Olefin- oder thiol-funktionalisierte Biotinverbindungen **16-19** dienen als Modellbiomoleküle für die verschiedenen Vorversuche zur Optimierung der Photomikrostrukturierung in den Abschnitten 3.2.2 bis 3.2.4 (Abbildung 12a). Bis auf die nachfolgenden biologischen Analysen wurden alle Photoimmobilisierungsschritte im Reinraum durchgeführt.

Die vor der eigentlichen Photoimmobilisierung erforderliche Beschichtung der verwendeten, thiol- oder olefinfunktionalisierten Oberflächen mit Biomoleküllösung erfolgte unter Verwendung zweier Verfahren, dem Spin-Coating- oder dem Drop-Casting-Verfahren (Abbildungen 13a bis c). Diese unterschieden sich in der Art des erhaltenen Biomolekülfilms auf der Oberfläche.

3. Allgemeiner Teil

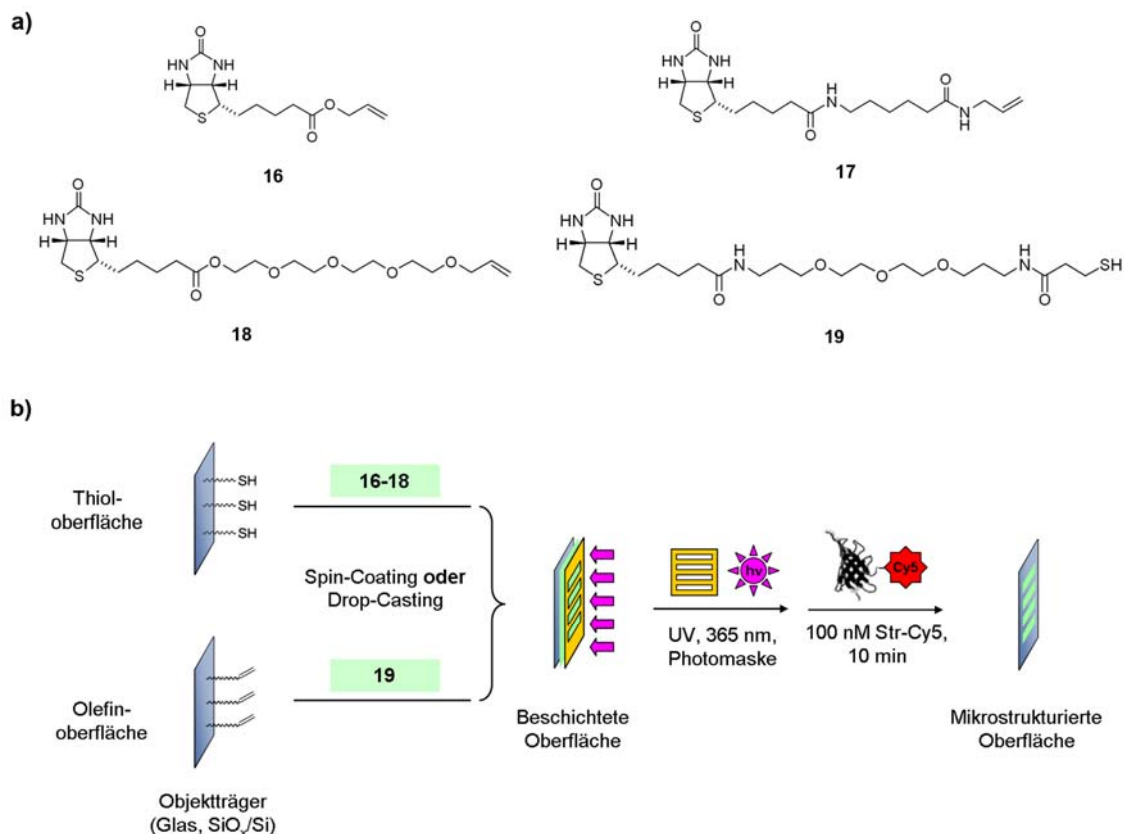


Abbildung 12: a) Biotinverbindungen, die für die Photomikrostrukturierungsvorversuche eingesetzt wurden. b) Photomikrostrukturierungsprozess auf Basis der Thiol-En-Reaktion.

Im Spin-Coating-Verfahren wurden zu beschichtende Objektträger waagrecht in einem Spin-Coater fixiert und die Objektträgeroberfläche mit 700 μl einer Biomoleküllösung benetzt. Ein Zentrifugationsprogramm führte zu einem kontrollierten, lateralen Abfließen der Biomoleküllösung von der Oberfläche gefolgt von kontrolliertem Eintrocknen des verbliebenen Lösungsfilms, so dass ein trockener, homogener Biomolekülfilm erhalten wurde. Der auf diese Weise beschichtete Objektträger wurde nachfolgend in eine Photolithographiemaschine überführt und dort vor UV-Bestrahlung mit einer Photomaske abgedeckt. Die Thiol-En-Reaktion fand nach Anwendung dieses Verfahrens ohne Lösungsmittel und unter direktem Kontakt zwischen Biomolekülfilm und der funktionalisierten Oberfläche statt.

Im Drop-Casting-Verfahren wurden 20 μl Biomoleküllösung auf die zu beschichtende Objektträgeroberfläche aufgebracht und mit einer Photomaske abgedeckt. Kapillarkräfte erzeugten daraufhin einen mikrometerdünnen Lösungsfilm zwischen den beiden Oberflächen. 20 μl waren zuvor als minimales, für die Bedeckung der gesamten Objektträgerfläche notwendiges Volumen bestimmt worden. Die Lösungsfilmstärke war unter Berücksichtigung der Objektträgerfläche von 75 x 25 mm^2 und des Lösungsmittelvolumens von 20 μl auf etwa 10 μm geschätzt worden. Der Aufbau aus Photomaske und Objektträger wurde nachfolgend in

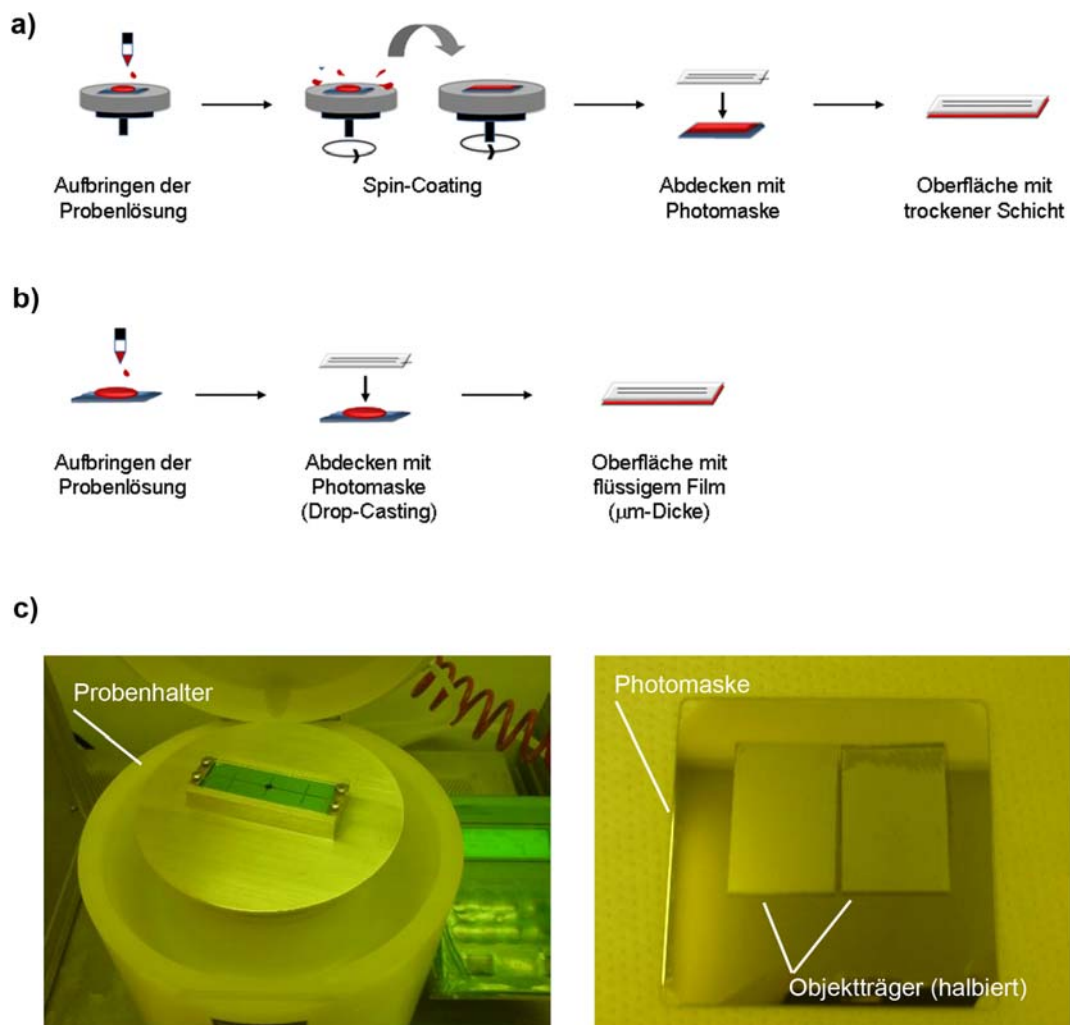


Abbildung 13: a) Arbeitsablauf des Spin-Coating-Verfahrens. b) Arbeitsablauf des Drop-Casting-Verfahrens. c) Apparativer Aufbau. Links: Spin Coater mit Objektträgerhalter. Der Objektträger wurde im Halter mit Schraubklemmen fixiert und konnte anschließend zentrifugiert werden. Rechts: Photomaske mit Objektträgern. Durch Auflegen eines Objektträgers auf einen auf der Photomaske platzierten Tropfen Biomoleküllösung wurde im Drop-Casting-Verfahren ein dünner Flüssigkeitsfilm erzeugt.

eine Photolithographieapparatur überführt. Dieses Verfahren führte zum Ablauf der Photoreaktion in Lösung, da im Verlauf der gesamten Photomikrostrukturierung stets ein Lösungsmittelfilm zwischen Photomaske und Objektträgeroberfläche verblieb.

Die verwendeten Photomasken bestanden aus Glas und wiesen einseitig eine dünne Chromschicht mit Linienstrukturen auf (Liniendicke $5\ \mu\text{m}$ bis $90\ \mu\text{m}$) (Abbildung 15c). Die in

3. Allgemeiner Teil

der Photolithographiemaschine durchgeführte Bestrahlung erfolgte mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm sowie einer Belichtungsintensität von 10 mW/cm². Nach Abschluss der Bestrahlung wurde die Photomaske von der Objektträgeroberfläche entfernt und der Objektträger gereinigt. Mittels Spin-Coating beschichtete Oberflächen wurden erneut im Spin-Coater fixiert und während der Zentrifugation kontinuierlich mit Lösungsmittel benetzt, um den eingetrockneten Biomolekülfilm von der Oberfläche zu entfernen. War der Objektträger im Drop-Casting-Verfahren beschichtet worden, wurde die Photomaske in einem Lösungsmittelbad (Petrischale) entfernt, um ein Eintrocknen des dünnen Biomoleküllösungsfilms zu verhindern. Weitere Reinigung war in diesem Fall nicht notwendig.

Nach vollendeter Photomikrostrukturierung wurde die Objektträgeroberfläche mehrere Male mit Puffer gewaschen. In den mit Biotinverbindungen durchgeführten Vorversuchen folgte Inkubation mit einem Milchpulver enthaltenden Puffer zur Vermeidung unspezifischer Proteinadsorption. Die Mikrostrukturen photoimmobilisierter Biotinverbindungen wurden anschließend mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen, das in einem Mikroarrayfluoreszenzscanner detektiert wurde. Quantitative Auswertung der Photomikrostrukturierung erfolgte durch softwaregestützte Erzeugung von Querschnittsprofilen und Mittelung der erhaltenen Fluoreszenzintensitäten von Mikrostrukturlinien und dem Hintergrund zwischen einzelnen Mikrostrukturlinien. Aus den gemittelten Werten wurde durch Quotientenbildung ein S/N-Verhältnis (Signal/Hintergrund) bestimmt, das als Maß für den Erfolg der jeweiligen Photomikrostrukturierung verwendet wurde. Ziel der Optimierung waren möglichst hohe S/N-Verhältnisse.

3.2.2 Vergleich verschiedener Oberflächen in der Thiol-En-Photomikrostrukturierung

Als Ausgangspunkt für den Oberflächenvergleich diente mit Siliziumoxid beschichtetes Silizium (SiO_x/Si).^[67] Die Verwendung dieses Oberflächentyps war von Vorteil, da sich Oberflächen auf Basis von Silizium bzw. Siliziumwafern durch hohe Oberflächenhomogenität auszeichnen, die zu Reduzierung von Hintergrundsignalen und somit zu einer Erhöhung des S/N-Verhältnisses führen kann.^[69] Verschiedene Varianten dieses Oberflächentyps wurden in der Thiol-En-Photomikrostrukturierung untersucht und mit Glas als Standardbiochipmaterial verglichen. Der Prozess zur Oberflächenherstellung und -funktionalisierung sowie eine entsprechende Übersicht sind in Abbildung 14 dargestellt. Zur Herstellung von SiO_x/Si-Objektträgern wurden Siliziumwafer in einer PECVD-Anlage (plasma-enhanced chemical vapour deposition, plasmagestützte chemische Dampfabscheidung) mit einer Schicht von Siliziumoxid in verschiedenen Schichtdicken von 100 nm bis 1000 nm beschichtet.

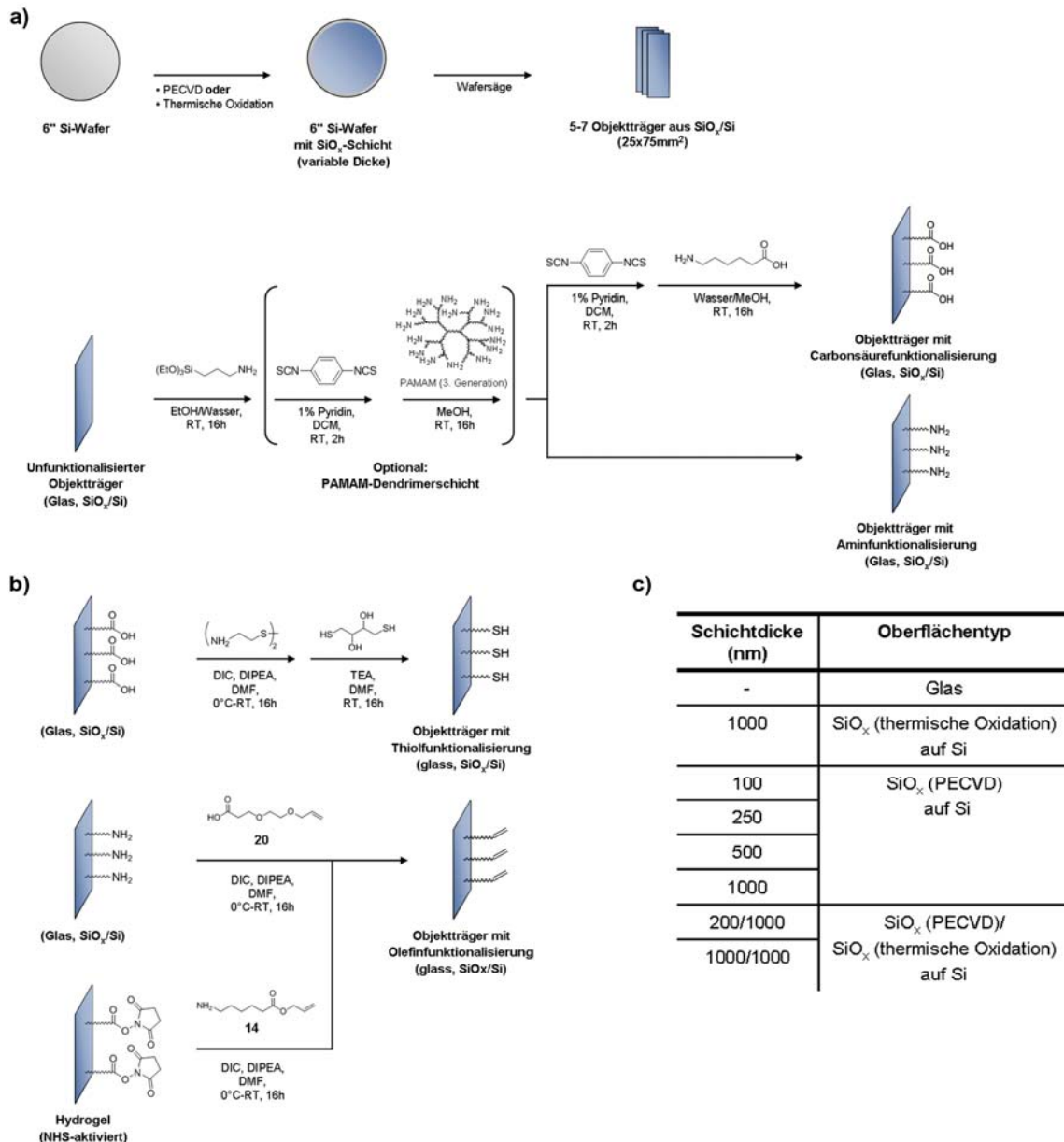


Abbildung 14: a) Herstellung von carboxy- oder aminfunktionalisierten Objektträgern mit optionaler PAMAM-Dendrimerschicht. SiO_x/Si-Oberflächen wurden durch PECVD oder thermische Oxidation an Si-Wafern generiert, die anschließend mittels einer Wafersäge in Objektträgerformat (75x25 mm²) geschnitten wurden. b) Herstellung thiol- oder olefinfunktionalisierter Objektträger für die Thiol-En-Photoimmobilisierung, bis auf Hydrogeloberflächen ausgehend von a). c) Oberflächentypen, die für die Herstellung von Objektträgern genutzt wurden.

Alternativ erfolgte die Erzeugung einer Siliziumoxidschicht von 1000 nm Dicke mittels thermischer Oxidation. Zudem kamen kombinierte Schichten aus durch thermische Oxidation erhaltenem und mittels PECVD generiertem Siliziumoxid als Trägermaterial zum Einsatz. Die SiO_x/Si-Wafer wurden schließlich mit einer Wafersäge in Objektträgerformat geschnitten (75 x 25 mm²). Die erhaltenen SiO_x/Si-Objektträger sowie kommerziell erhältliche Glasobjektträger wurden mittels Aminopropyltriethoxysilan aminfunktionalisiert und unter Verwendung

3. Allgemeiner Teil

etablierter Methoden in mehreren Schritten thiol- bzw. unter Verwendung der Olefinanker **20** und **14** olefinfunktionalisiert (Abbildungen 14a und 14b). Optional erfolgte die Einführung einer PAMAM-Dendrimerschicht (Polyamidoamin), da diese die Dichte der funktionellen Gruppen an der Oberfläche erhöhte, während gleichzeitig unspezifische Adsorption anderer Moleküle und somit eventuelle Hintergrundsignale reduziert wurden.^[70] Amin-, Carbonsäure- und PAMAM-Funktionalisierung erfolgte durch Dr. Hendrik Schröder (Chimera Biotec).

Die olefinfunktionalisierte Biotinverbindung **17** wurde mittels Spin-Coating auf die verschiedenen thioolfunktionalisierten Objektträger aufgebracht und nach dem in Abbildung 12b gezeigten Ablauf photomikrostrukturiert. Die Ergebnisse des Oberflächenvergleichs sind in den Abbildungen 15-18 gezeigt. Mittels PECVD erzeugte SiO_x/Si-Oberflächen erzielten im Vergleich zu Glas etwa zehnfach höhere Fluoreszenzintensitäten der Mikrostrukturlinien bei einem maximalen S/N-Verhältnis von 11:1 (500 nm SiO_x/Si) im Vergleich zu 2:1 für Glas (Abbildung 15a). Mit thermischer Oxidation erzeugtes Siliziumoxid führte im Vergleich zu PECVD-Siliziumoxid zu um 60 % niedrigeren Intensitäten, einem niedrigeren S/N-Verhältnis von 5:1 im Vergleich zu 10:1 (1000 nm SiO_x/Si) und außerdem zu einer inhomogeneren Oberfläche. Eine Erklärung für diese Beobachtung liegt vermutlich in der besseren Aktivierung der Oxidschicht durch PECVD. Es wird vermutet, dass PECVD zu freien Silanolgruppen an der Oberfläche führt, die nachträglich leichter für Funktionalisierungsreaktionen zugänglich sind, als im Fall von thermisch oxidiertem Siliziumoxid, da im Fall einer vergleichbaren Behandlung von SiO₂- und TiO₂-Oberflächen mit Sauerstoffplasma ein Anstieg der Oberflächenhydrophilie beobachtet wurde, der auf eine erhöhte Anzahl freier Hydroxylgruppen zurückgeführt wurde.^[71] Ferner wurde für TiO₂-Oberflächen in Folge der Plasmaaktivierung eine erhöhte Funktionalisierung der Oberfläche beobachtet.^[71] Das beobachtete Maximum im S/N-Verhältnis und der Maximalintensität bei einer SiO_x/Si-Schichtdicke von 500 nm ist vermutlich auf optische Interferenzeffekte in der Oxidschicht zurückzuführen, die die lokale Lichtintensität an der Thioloberfläche in Abhängigkeit von der Dicke der sich darunter befindenden Siliziumoxidschicht abschwächen oder verstärken könnten. Interferenzeffekte sind im Fall fluoreszierender Moleküle auf Siliziumoberflächen mit Siliziumoxidschichten bekannt.^[72] Eine Untersuchung verschiedener Schichtdicken in kleineren Abstufungen wäre zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese notwendig. Der Einfluss der PAMAM-Schicht ist in Abbildung 16 dargestellt. PAMAM-Funktionalisierung führte zu etwa fünffach höherer Signalintensität bei vergleichbarem S/N-Verhältnis von etwa 10:1 (1000 nm SiO_x/Si). Diese Beobachtung wird auf eine höhere Oberflächenbeladung zurückgeführt. Ferner wurde eine homogenere Oberfläche erhalten, während die Oberfläche ohne PAMAM-Dendrimerschicht Inhomogenitäten aufwies. Die mittels PECVD erzeugte SiO_x/Si-Oberfläche mit einer SiO_x-Schichtdicke von 500 nm ergab nach PAMAM- und Thioolfunktionalisierung somit die besten Ergebnisse bei der Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Biotinverbindung **17**.

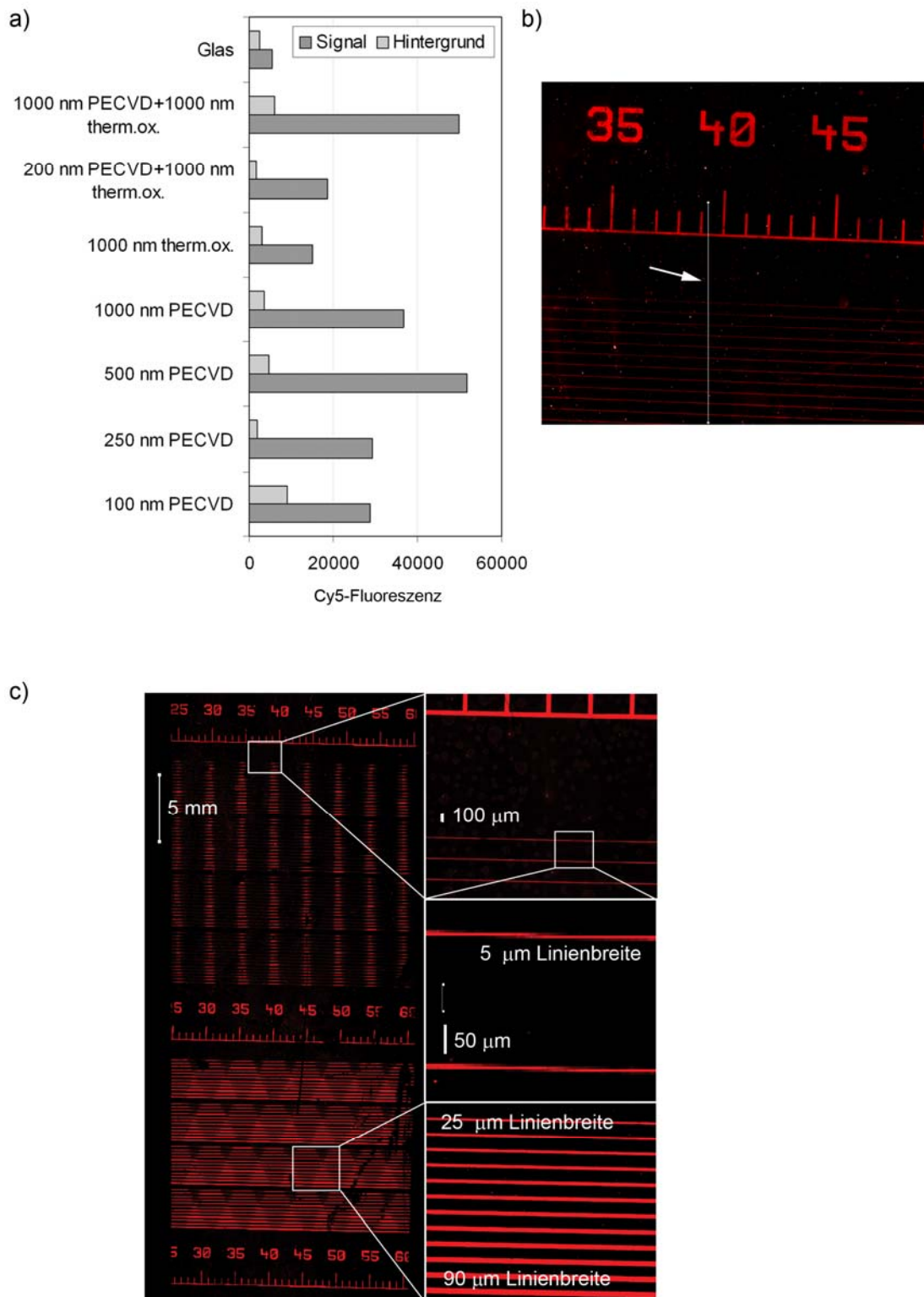
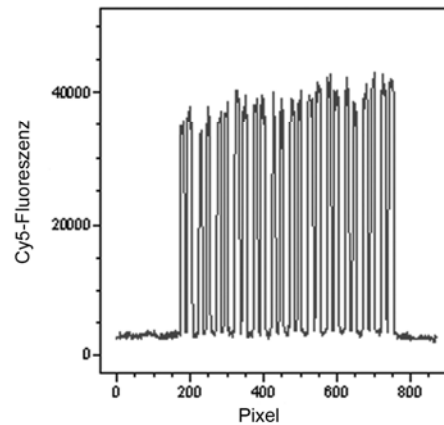
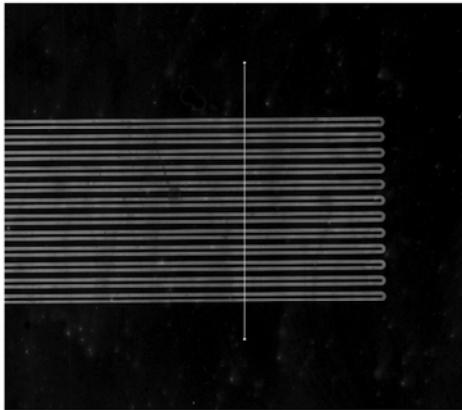


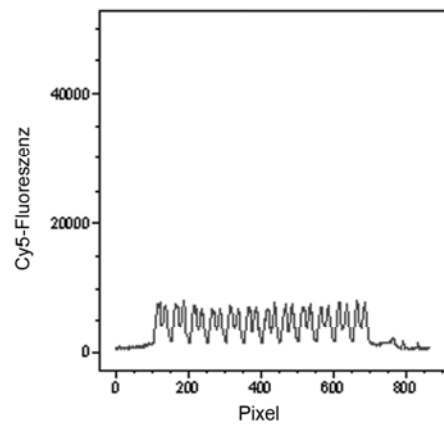
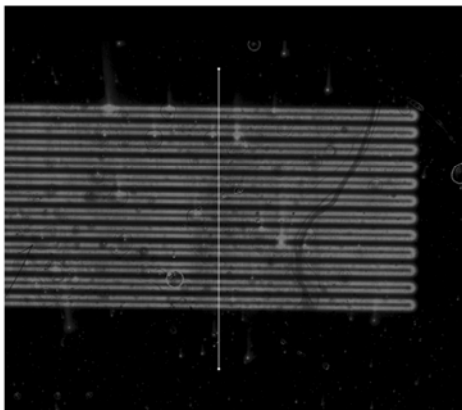
Abbildung 15: a) Oberflächenvergleich bei der Photomikrostrukturierung von **17**. Immobilisiertes Biotin wurde mit Streptavidin-Cy5 nachgewiesen (alle Oberflächen thiol-PAMAM-funktionalisiert, 10 mM **17** in DMF/Toluol 3:1, Spin-Coating, 10 min 365 nm). b) Ausgeschnittener Bereich eines Objektträgers, in dem die mittlere Signalintensität für a) durch Querschnittbildung über die feinen Biotinlinienstrukturen mit einer Linienbreite von 5 μm bestimmt wurde (weiße Linie). c) Gesamtansicht der erzeugten Biotinmikrostrukturen auf einer objektträgergroßen Fläche (75x25 mm^2). Mittels Thiol-En-Photoimmobilisierung wurden Linienstrukturen in Breiten von 5 μm bis 90 μm erzeugt (Ausschnitte).

3. Allgemeiner Teil

a) Mit PAMAM



b) Ohne PAMAM



c) Vergleich

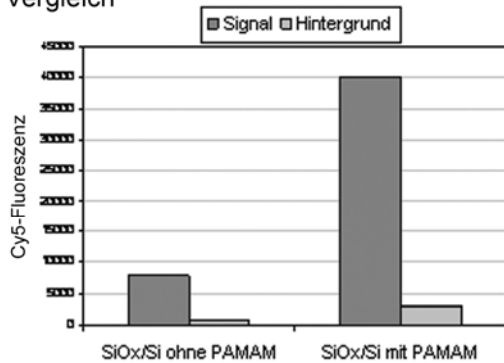


Abbildung 16: Vergleich zwischen 1000 nm SiO_x/Si-Oberflächen mit und ohne PAMAM-Dendrimerschicht (thiolfunktionalisierte Oberfläche, Spin-Coating von 10 mM **17** in DMF/Toluol 3:1, 10 min 365 nm, Streptavidin-Cy5). a) Fluoreszenzaufnahme der erhaltenen Biotinmikrostrukturen auf mit einer Dendrimerschicht funktionalisierten Oberfläche. Die weiße Linie zeigt einen Querschnitt, dessen Histogramm auf der rechten Seite gezeigt ist. b) Fluoreszenzaufnahme einer Oberfläche ohne Dendrimerschicht mit wie in a) erhaltenem Histogramm. c) Quantitativer Vergleich der gemittelten Intensitäten beider Histogramme.

3.2.3 Vergleich verschiedener Ankergruppen in der Thiol-En-Photomikrostrukturierung

Der Einfluss der Länge und Art des Olefinankers verschiedener Biotinverbindungen auf die Photomikrostrukturierung wurde ebenfalls untersucht. Die Biotinverbindungen **16**, **17** und **18** wurden mittels Spin-Coating auf thiol-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si-Objektträger aufgebracht und der Photomikrostrukturierung unterzogen. Nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin wurden vergleichbare Signalintensitäten für **17** und **18** beobachtet (Abbildung 17a). Die Hydrophilie des Olefinankers hatte somit keinen erkennbaren Einfluss auf die Immobilisierungseffizienz oder die Bindung von Streptavidin. Für die Photomikrostrukturierung von **16** wurde eine verglichen mit **17** und **18** um den Faktor 100 geringere Signalintensität beobachtet. Diese ist vermutlich durch den kürzeren Olefinanker von **16** zu erklären, der die Bindung von Streptavidin im nachfolgenden Detektionsassay durch zu geringen Abstand zwischen Oberfläche und Biotinheterozyklus und daraus resultierender sterischer Hinderung behindern könnte. Eine Aussage über die Ausbeute der Photomikrostrukturierung von **16** ist daher nicht möglich.

Mit den Biotinverbindungen **18** und **19** wurde die Photomikrostrukturierung auf thiol- bzw. olefinfunktionalisierten Oberflächen verglichen. **18** und **19** wurden mittels Drop-Casting auf entsprechend funktionalisierte SiO_x/Si-Oberflächen mit PAMAM-Schicht aufgebracht und photomikrostrukturiert. **18** ergab in Kombination mit der thiolefunktionalisierten Oberfläche bei vergleichbarer Linienintensität ein weitaus höheres S/N-Verhältnis von 10:1 im Vergleich zu nur etwa 1:1 für **19** (Abbildung 17b). Diese Beobachtung ist nicht eindeutig zu erklären, zeigt jedoch, dass Thiol-En-Photomikrostrukturierung olefinfunktionalisierter Biomoleküle auf thiolefunktionalisierten Oberflächen vermutlich zu bevorzugen ist.

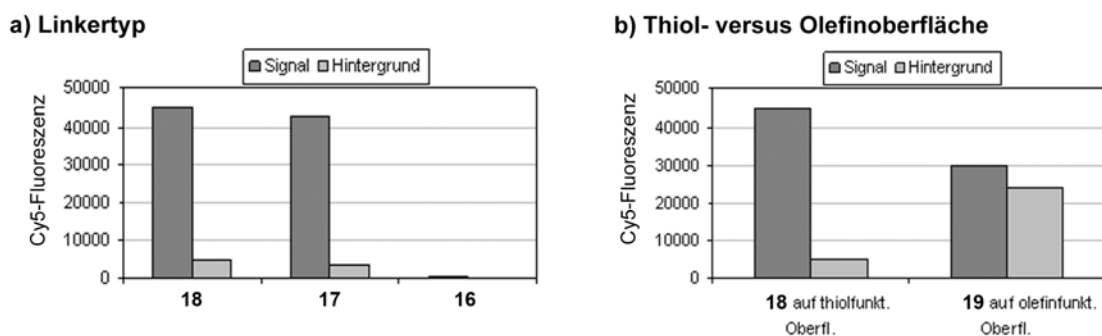


Abbildung 17: a) Einfluss des Biotinankers auf die Photomikrostrukturierung (thiol-PAMAM-funktionalisierte 1000 nm SiO_x/Si-Oberfläche, Spin-Coating von 10 mM **17** und **16** in DMF/Toluol 3:1 sowie 10 mM **18** in EtOH. Detektion mit Streptavidin-Cy5). b) Vergleich thiol- und olefinfunktionalisierter Oberflächen bei der Photomikrostrukturierung mittels Spin-Coating (1000 nm SiO_x/Si mit PAMAM-Schicht, 10 mM **18** oder **19** in EtOH, Detektion mit Streptavidin-Cy5).

3.2.4 Einfluss von Konzentration und Bestrahlungsdauer auf die Thiol-En-Photomikrostrukturierung

Der Einfluss von Konzentration und Bestrahlungsdauer auf die Photoimmobilisierung wurde sowohl mit mittels Spin-Coating als auch mittels Drop-Casting beschichteten Oberflächen untersucht. Im Fall von Spin-Coating wurde Biotinverbindung **17** verwendet, während für Drop-Casting Verbindung **18** zum Einsatz kam. Die Verwendung von zwei verschiedenen Biotinverbindungen war in deren unterschiedlicher Löslichkeit begründet: **17** wurde für Spin-Coating-Beschichtung üblicherweise in DMF/Toluol 3:1 gelöst, das in Vorversuchen aufgrund von Verdampfung des Lösungsfilms zwischen Photomaske und Objektträgeroberfläche jedoch zu schlechten Ergebnissen bei der Drop-Casting-Beschichtung geführt hatte. Da **17** nicht in hochsiedendem Ethylenglykol löslich war, das bevorzugt für Drop-Casting eingesetzt wurde, um Verdampfung zu vermeiden, wurde stattdessen die hydrophilere Verbindung **18** verwendet. Nach Spin-Coating von **17** auf Thioloberflächen (1000 nm SiO_x/Si mit PAMAM-Schicht) wurde für die Photoimmobilisierung sowohl eine Abhängigkeit von der Lösungskonzentration als auch von der Bestrahlungszeit beobachtet (Abbildung 18). Eine Erhöhung der Biotinkonzentration in vier Schritten von 0,01 mM bis 10 mM führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der Linienintensität und des S/N-Verhältnisses. Mit einer Konzentration von 10 mM wurde so eine um den Faktor 75 höhere Linienintensität erzielt als mit 0,01 mM, während sich das S/N-Verhältnis von 2:1 auf 10:1 verbesserte. Gleichsam führte die Verlängerung der Bestrahlungszeit in vier Schritten von 3 Sekunden auf 10 Minuten zu einer Erhöhung von Linienintensität und S/N-Verhältnis. 10 Minuten Bestrahlungszeit erhöhten die Linienintensität im Vergleich zu 3 Sekunden um den Faktor 8 und das S/N-Verhältnis von 1,5:1 auf etwa 10:1. Drop-Casting von **18** führte zu vergleichbaren Tendenzen. Eine Erhöhung der Konzentration von 0,5 mM auf 10 mM erhöhte die Linienintensität um den Faktor 15 und das S/N-Verhältnis von 4:1 auf 10:1, während eine Verlängerung der Bestrahlungszeit von einer Minute auf 10 Minuten zu einer Erhöhung der Linienintensität um den Faktor 6 und des S/N-Verhältnisses von 2:1 auf 10:1 führte. In der Drop-Casting-Versuchsreihe wurden zudem längere Bestrahlungszeiten und höhere Biomolekülkonzentrationen untersucht. Bei Verlängerung der Bestrahlungszeit von 10 Minuten auf 30 Minuten wurde eine doppelt so hohe Linienintensität wie auch eine Erhöhung des S/N-Verhältnisses von 10:1 auf 20:1 beobachtet, während eine Erhöhung der Konzentration von 10 mM auf 20 mM oder 50 mM zwar zu einer weiteren Erhöhung der Linienintensität, jedoch auch zu einer wesentlich stärkeren Erhöhung des Hintergrundsignals führte, so dass eine Verringerung des S/N-Verhältnisses von 10:1 auf 3:1 bzw. 1,7:1 resultierte.

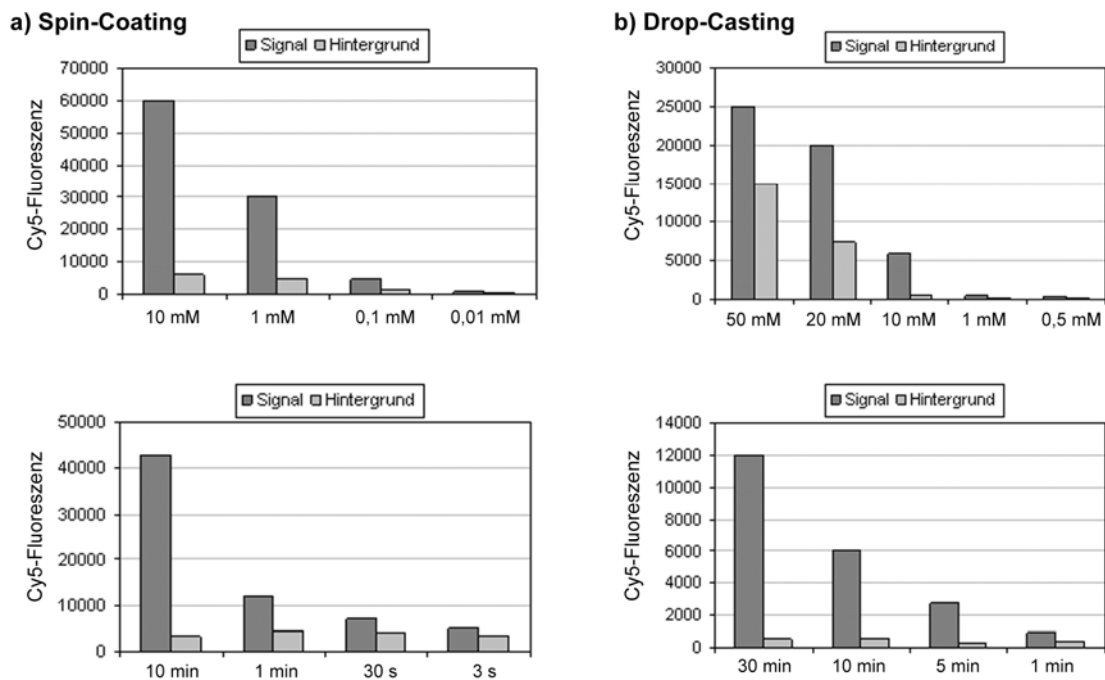


Abbildung 18: a) Fluoreszenzintensitäten nach Spin-Coating von **17** unter Verwendung verschiedener Bestrahlungszeiten und Konzentrationen (Spin-Coating aus DMF/Toluol 3:1, thiol-PAMAM-funktionalisierte 1000 nm SiO_x/Si-Oberfläche, Detektion mit Streptavidin-Cy5). b) Analoge Untersuchung zum Drop-Casting von **18** (Drop-Casting von **18** aus Ethylenglykol, sonstige Parameter wie a).

Sowohl für Drop-Casting- als auch für Spin-Coating-beschichtete Oberflächen erwies sich somit eine Biomoleküllkonzentration von 10 mM als günstig. Ferner erwies sich eine Bestrahlungszeit von 10 Minuten als guter Kompromiss zwischen Photoimmobilisierungsausbeute und Schnelligkeit der Immobilisierung. Beide Beschichtungsverfahren führten zu Mikrostrukturen vergleichbarer Qualität. Spin-Coating ergab jedoch im Vergleich zu Drop-Casting bei gleichem S/N-Verhältnis etwa zehnfach höhere Signalintensitäten. Dieser Umstand ist vermutlich durch die größere Nähe der Reaktanden zu erklären, die aus dem Eintrocknen der aufgetragenen Biotinlösung und der Filmbildung resultiert. Trotz der Abwesenheit von Lösungsmittel und der daraus resultierenden geringeren Mobilität der Biotinmoleküle scheint die Photoimmobilisierung in diesem Fall begünstigt. Hingegen erfolgt die Thiol-En-Reaktion im Fall von Drop-Casting zwischen der Oberfläche und der darüberstehenden Biomoleküllösung, so dass die Nähe der Reaktanden durch Diffusion zustande kommen muss und die Immobilisierungsausbeute daher geringer ist.

Nachteile des Spin-Coating-Verfahrens sind ein vergleichsweise hoher Verbrauch an Biomoleküllösung sowie Eintrocknen der Biomoleküllösung in Folge der Zentrifugation. Spin-Coating benötigt pro Objektträgerfläche ein Biomoleküllösungsvolumen von etwa 750 μ l,

3. Allgemeiner Teil

während im Drop-Casting-Prozess 20 μl für die Fläche eines Objektträgers (75x25 mm^2) ausreichen. Eine Biomolekülkonzentration von 10 mM führt bei einem Molekül eines Molekulargewichts von etwa 400 g/mol, wie beispielsweise im Fall von Biotinverbindung **18**, bereits zu einem Mengenunterschied von 3,5 mg im Fall von Spin-Coating gegenüber 0,1 mg im Fall von Drop-Casting.

Niedermolekulare Biomoleküle, die unempfindlich gegenüber Eintrocknen auf der Oberfläche sind und in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, können somit mittels Spin-Coating aufgebracht werden, um den Vorteil der etwa zehnfach höheren Immobilisierungsausbeute zu nutzen. Für empfindliche Biomoleküle, wie beispielsweise Proteine, deren Aktivität durch Eintrocknen und daraus resultierender Denaturierung verloren gehen kann und die ferner nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehen, ist Drop-Casting die geeignete Beschichtungsmethode.

3.2.5 Zusammenfassung

Die aus den Vorversuchen erhaltenen Parameter sind in Tabelle 4 zusammengefasst und wurden als Leitlinie für weitere Thiol-En-Photoimmobilisierungen verwendet. Mittels PECVD hergestellte SiO_x/Si -Objektträger mit einer SiO_x -Schichtdicke von 500 nm erwiesen sich als bestes Material für die Photomikrostrukturierung. Ferner ergab Oberflächenfunktionalisierung mit PAMAM-Dendrimern eine etwa zehnfache Erhöhung der Linienintensität sowie eine homogenere, artefaktfreie Oberfläche. Die Mikrostrukturierung von **17** auf thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Oberflächen führte zu guten S/N-Verhältnissen von 10:1 bis 20:1, während die Mikrostrukturierung von Biotinverbindung **19** auf olefin-PAMAM-funktionalisierten Oberflächen zu S/N-Verhältnissen von nur etwa 1:1 führte. Im Vergleich verschiedener Olefinanker wurden in der Photomikrostrukturierung von **17** und **18** mit

Parameter	Ergebnis
Oberfläche	500 nm PECVD- SiO_x/Si mit PAMAM-Dendrimerschicht (via Carbonsäurefunktionalisierung)
Funktionalisierung	Thiofunktionalisierte Oberfläche, olefinfunktionalisierte Biomoleküle
Konzentration	10 mM
Bestrahlungszeit (365 nm, 10 mW/cm ²)	10 min
Auftragungsverfahren	<ul style="list-style-type: none">• Spin-Coating: unempfindliche Biomoleküle in ausreichender Menge (z.B. Biotin, Peptide)• Drop-Casting: empfindliche Biomoleküle in begrenzter Menge, die durch Austrocknen geschädigt werden (z.B. Proteine)

Tabelle 4: Zusammenfassung der optimierten Prozessparameter für Thiol-En-Photoimmobilisierung von Biomolekülen.

unterschiedlich hydrophilen Anker-molekülen ähnliche Ergebnisse erzielt, jedoch führte ein zu kurzer Anker, wie im Fall der Verbindung **16**, zu sehr niedrigen Fluoreszenzintensitäten, die vermutlich auf eine gehinderte Bindung des fluoreszenzmarkierten Streptavidins nach der Immobilisierungsreaktion zurückzuführen sind. Während eine Bestrahlungszeit von 30 Minuten zu der maximalen beobachteten Immobilisierungseffizienz und dem besten S/N-Verhältnis führten, stellten zehn Minuten einen guten Kompromiss zwischen Schnelligkeit und Immobilisierungsausbeute dar. Eine Verlängerung der Bestrahlungszeit darüber hinaus wurde nicht untersucht, jedoch ist eine weitere Erhöhung von Linienintensität und S/N-Verhältnis denkbar. Biotinkonzentrationen von 10 mM erwiesen sich sowohl für mit Spin-Coating als auch für mit Drop-Casting beschichtete Oberflächen als günstig. Höhere Konzentrationen führten im Drop-Casting-Verfahren zur starken Erhöhung des Hintergrundsignals. Spin-Coating ergab bei gleichbleibendem S/N-Verhältnis zehnfach höhere Ausbeuten als Drop-Casting, ist aber aufgrund des Eintrocknens der Biomoleküllösung nicht für empfindliche Biomoleküle, wie z.B. Proteine, geeignet. Es konnte gezeigt werden, dass mittels Thiol-En-Photomikrostrukturierung die Erzeugung von Biotinlinienstrukturen auf einer Fläche von 25x75 mm² mit Linienbreiten bis unterhalb von 10 µm möglich ist (Abbildung 15c). Thiol-En-Photomikrostrukturierung ist somit in Hinblick auf Strukturform, -größe und zu strukturierenden Oberflächenbereich flexibel.

3.3 Thiol-En-Photomikrostrukturierung niedermolekularer Biomoleküle auf Oberflächen

Abschnitt 3.2 zeigt die Möglichkeit einer Photomikrostrukturierung von Biotinverbindungen mit der Thiol-En-Reaktion. Im Folgenden wurde im Rahmen der Photomikrostrukturierung eines Phosphopeptids eine andere niedermolekulare Biomolekülklasse getestet, um die Vielseitigkeit der Methode zu belegen. In einem zusätzlichen Experiment erfolgte die Anwendung mikrofluidischer Systeme als Alternative zu Photomasken. Weitere niedermolekulare Biomoleküle wurden nicht untersucht, da nachfolgend direkt der Übergang zur Photomikrostrukturierung von Proteinen erfolgte. Diese stellten die für eine Photoimmobilisierungsmethode interessantesten Biomoleküle dar (siehe Abschnitt 3.5).

3.3.1 Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Phosphopeptiden

Die Untersuchung der Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Phosphopeptiden erfolgte mit dem olefinfunktionalisierten Phosphododekapeptid **21** (Abbildung 19). Die Peptidsequenz war in einem Hochdurchsatzuntersuchung als Konsensussequenz, d.h. als bestes Substrat, für die

3. Allgemeiner Teil

Phosphatase PTP1B (Proteintyrosinphosphatase 1B) erhalten worden.^[73] PTP1B spielt eine wichtige Rolle im Insulin- und Leptinsignalweg und hat sich als wichtiges Zielmolekül in der Entwicklung von Wirkstoffen gegen Diabetes Typ 2 sowie Adipositas herauskristallisiert.^[74] Phosphopeptid **21** wurde mittels automatisierter Peptidfestphasensynthese ausgehend von Rink-Amid-MBHA-Harz synthetisiert und vor der Abspaltung N-terminal mit dem Olefinanker **20** versehen. Der Arbeitsablauf der Mikrostrukturierung ist in Abbildung 19b dargestellt. **21** wurde mit dem Spin-Coating-Verfahren auf eine thiol-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si-Oberfläche aufgebracht und durch zehnmünütige UV-Bestrahlung bei 365 nm mikrostrukturiert.

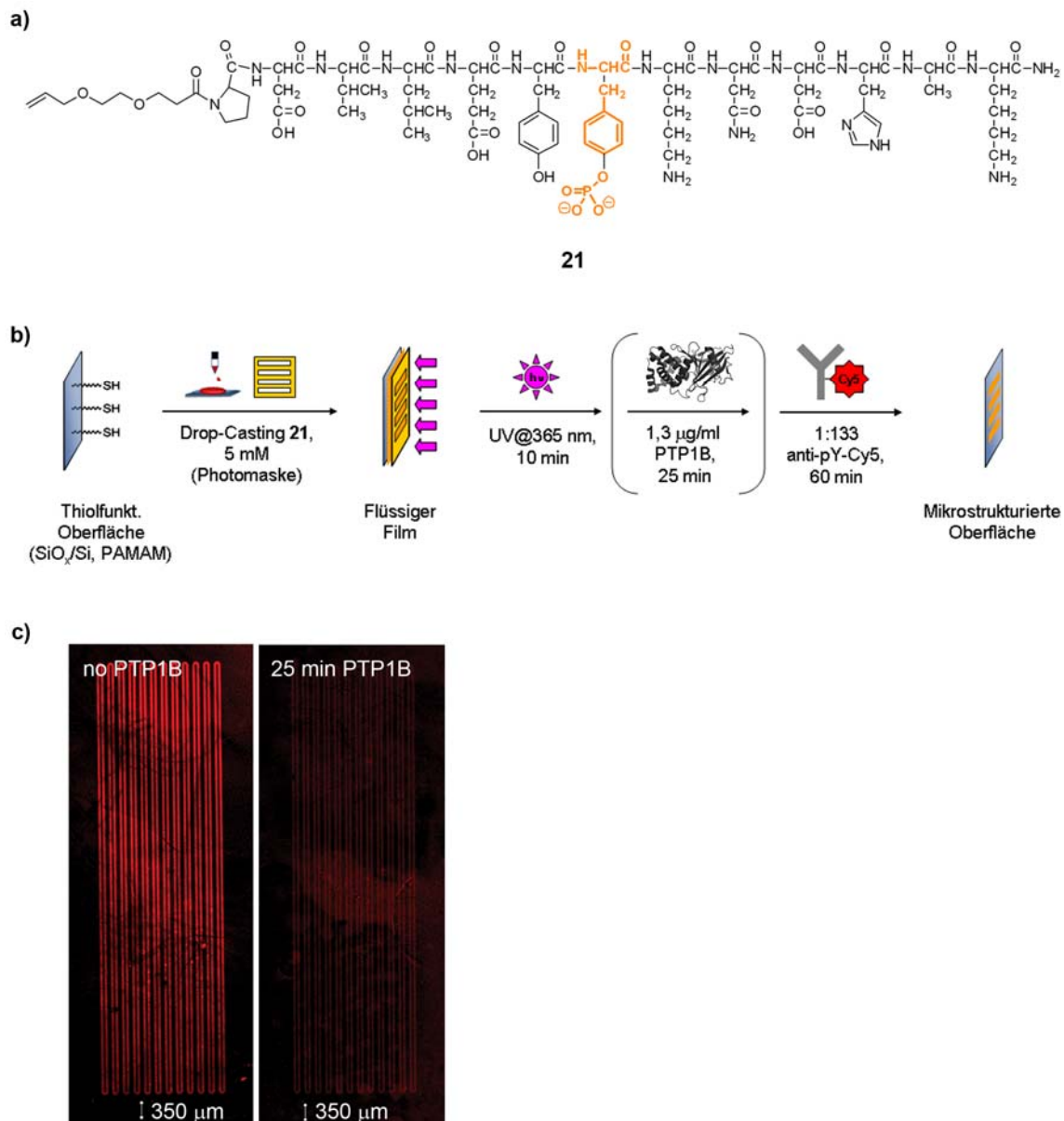


Abbildung 19: Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Phosphopeptid **21**. a) Das olefinfunktionalisiertes Dodecaphosphopeptid **21**, das als Substrat der Phosphatase PTP1B identifiziert wurde. b) Arbeitsablauf der Mikrostrukturierung. Nachweis immobilisierten Peptids geschah mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Phosphotyrosinantikörper. c) Fluoreszenzaufnahmen der Phosphopeptidmikrostrukturen auf der Oberfläche ohne Inkubation mit PTP1B (links) und nach Inkubation mit PTP1B für 25 Minuten (rechts).

Phospho-Tyrosin wurde nachfolgend mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-Phospho-Tyrosinantikörper detektiert. Eine analog hergestellte Oberfläche wurde nach der Photoimmobilisierung 25 Minuten mit der Phosphatase PTP1B inkubiert, um die Dephosphorylierung des immobilisierten Phosphopeptids zu überprüfen. Die nicht mit PTP1B inkubierte Oberfläche zeigte deutlich erkennbare Mikrostrukturen, während auf der mit PTP1B inkubierten Oberfläche Strukturen mit dreifach geringerer Intensität erkennbar sind (Abbildung 19c). **21** konnte somit auch nach der Thiol-En-Photomikrostrukturierung erfolgreich durch das Enzym erkannt werden.

3.3.2 Sonstige Experimente – Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Biotin mittels Mikrofluidik

Mit den für die Photomikrostrukturierung verwendeten Applikationsverfahren Spin-Coating und Drop-Casting ist gleichzeitige Mikrostrukturierung von Oberflächen mit mehreren Biomolekülen nicht möglich, da für jede Immobilisierung die gesamte funktionalisierte Oberfläche beschichtet werden muss. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Pascal Jonkheijm die Möglichkeit des Einsatzes von mikrofluidischen Systemen untersucht. Mit Hilfe mikrofluidischer Kanäle sind Bereiche auf einer funktionalisierten Oberfläche getrennt adressierbar und damit die parallele Immobilisierung verschiedener Biomoleküle möglich.

Ein passendes mikrofluidisches System aus elastischem PDMS (Polydimethylsiloxan) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Fleger am Institut für Hochfrequenztechnologie der TU Dortmund angefertigt (Abbildungen 20a und 20b). Der PDMS-Chip bestand aus einem 100 µm breiten Kanal mit drei offenen Flüssigkeitsreservoirien zur Zuführung oder Abführung von Flüssigkeit, die mit Teflonschläuchen mit etwa 1,5 mm Durchmesser selbstabdichtend verbunden werden konnten. Der PDMS-Chip wurde auf einen thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (500 nm PECVD-SiO_x) aufgedrückt und mit transparentem Klebeband fixiert. Der Kontakt der beiden Oberflächen war reversibel, um nachträgliches Ablösen des PDMS-Chips und damit nachfolgende Nachweisreaktionen unter Ausnutzung der gesamten Objektträgeroberfläche zu ermöglichen. Eine Lösung von Biotinverbindung **17** (10 mM in DMF/Toluol 3:1) wurde in eines der drei Flüssigkeitsreservoirs eingefüllt und der zentrale Kanal durch Erzeugung von Unterdruck mit Hilfe einer Einwegspritze (1 ml Volumen) befüllt. Nach Befüllung des Kanals wurde die Einwegspritze entfernt und der gesamte Aufbau zehn Minuten mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Durch erneuten Einsatz der Einwegspritze und Befüllung der Reservoirs mit Waschlösungen konnten der Kanal sowie die im Kontakt stehende Oberfläche nach der Bestrahlung gewaschen werden. Der PDMS-Chip wurde entfernt und immobilisiertes Biotin mit Streptavidin-Cy5 nachgewiesen. Abbildung 20c zeigt die erhaltene

3. Allgemeiner Teil

Fluoreszenzaufnahme. Immobilisierung der Biotinverbindung **17** auf der mit dem Kanal in Kontakt stehenden Fläche ist deutlich sichtbar. Flecken an den Flüssigkeitsreservoirs entstanden durch versehentliches mechanisches Trennen der beiden Oberflächen und daraus resultierende Leckage der Biotinlösung aufgrund von spontan auftretenden Kapillarkräften zwischen den beiden Oberflächen. Das Ergebnis zeigt, dass Thiol-En-Photoimmobilisierung mit Hilfe von mikrofluidischen Systemen grundsätzlich möglich ist. Parellele Mikrostrukturierung verschiedener Verbindungen kann somit durch Wahl eines geeigneten mikrofluidischen Kanalsystems erreicht werden.

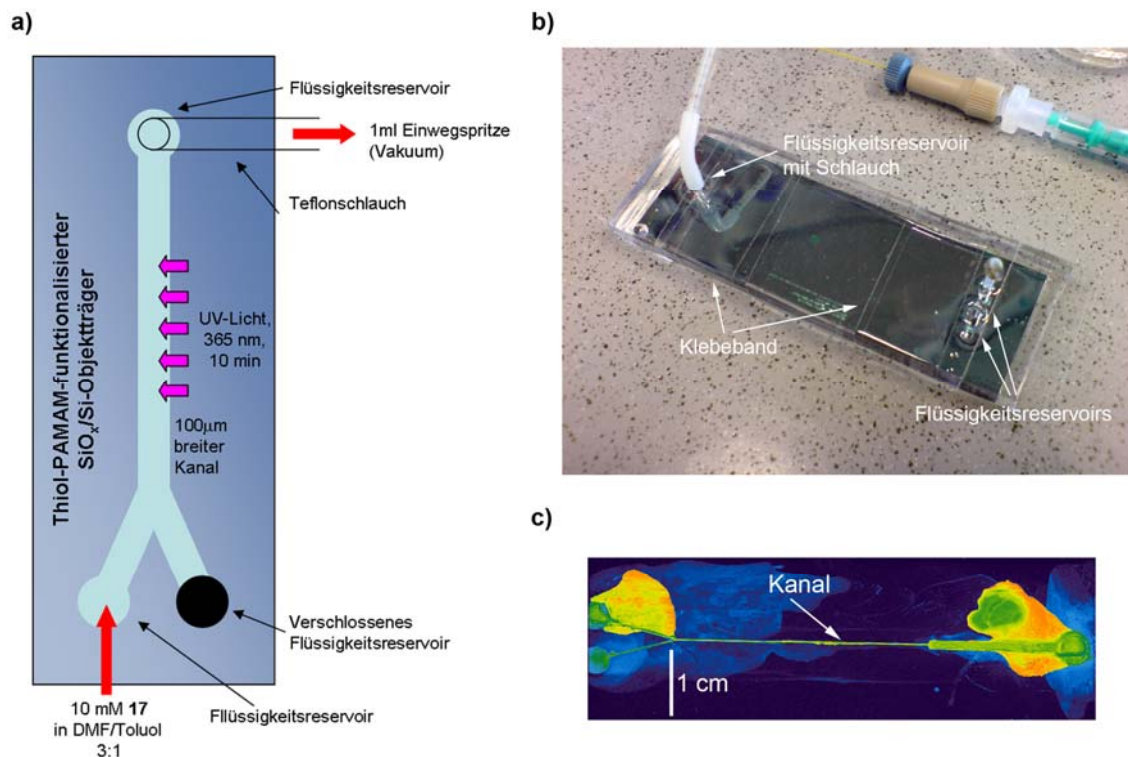


Abbildung 20: Thiol-En-Mikrostrukturierung mit Hilfe eines mikrofluidischen Systems. a) Schematische Darstellung des mikrofluidischen Aufbaus. Ein PDMS-Chip mit einem halboffenen 100 µm breiten Kanal sowie drei Flüssigkeitsreservoirs auf der abgewandten Seite wird auf einen thioleffunktionalisierten Objektträger aufgebracht und mit transparentem Klebeband fixiert. Der Kanal wird anschließend über mit einer Einwegspritze erzeugtes Vakuum mit 10 mM **17** in DMF/Toluol 3:1 befüllt und zehn Minuten mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Nach Waschen erfolgt Detektion immobilisierten Biotins mit 100 nM Streptavidin-Cy5. b) Aufnahme des mikrofluidischen Aufbaus. c) Fluoreszenzaufnahme nach der Mikrostrukturierung. Die Immobilisierung von **17** im mikrofluidischen Kanal ist deutlich sichtbar (weißer Pfeil).

3.3.5 Zusammenfassung

Die Thiol-En-Photomikrostrukturierung niedermolekularer Biomoleküle konnte mit olefinfunktionalisierten Biotinverbindungen (Abschnitt 3.2) und einem Phosphopeptid auf

Thiol-PAMAM-PECVD-SiO_x/Si-Oberflächen demonstriert werden. Das in Mikrostrukturen immobilisierte Phosphopeptid, ein Substrat der Phosphatase PTP1B, wurde von der Phosphatase erfolgreich auf der Oberfläche erkannt und dephosphoryliert. Die Herstellung von Biochips mittels Thiol-En-Photomikrostrukturierung scheint somit unter Erhaltung der Aktivität von niedermolekularen Biomolekülen möglich. In späteren Teilen dieser Arbeit (siehe Abschnitt 3.5) wurde darauf aufbauend die Photomikrostrukturierung von Proteinen untersucht, da diese zu den komplexesten und empfindlichsten Biomolekülen gehören.

3.4 Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle

Neben der Herstellung mikrostrukturierter Biochips sollte die Thiol-En-Reaktion auch zur Herstellung von Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle verwendet werden. Zunächst wurden hierzu Vorversuche mit Biotin durchgeführt und die gewonnenen Erkenntnisse nachfolgend in der Herstellung von Mikroarrays mit Oligonukleotiden und Glykopeptiden umgesetzt.

3.4.1 Biotin-basierte Mikroarrays

Die Herstellung von Mikroarrays mit Hilfe der Thiol-En-Photoimmobilisierung wurde, wie im Fall der Photomikrostrukturierung, mit Biotin untersucht (siehe Abschnitt 3.2). Da die für die Photomikrostrukturierung verwendeten SiO_x/Si-Objektträger aufgrund der aufwändigen Herstellungsweise schwer zugänglich waren (siehe Abschnitt 3.2), waren sie - im Hinblick auf eine generelle Anwendbarkeit - als Trägermaterial für Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle nicht geeignet. Glas sollte daher als Trägermaterial verwendet werden, da es als Standardträgermaterial für Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle dient und eine auf der Thiol-En-Reaktion basierende Immobilisierungsmethode auf diese Weise mit etablierten Methoden verglichen werden konnte.

Die Verwendung von Mikroarrayspottern führte üblicherweise zur Erzeugung von Biomoleküllösungstropfen mit einem Durchmesser von nur wenigen hundert Mikrometern auf dem Trägermaterial. Bei Verwendung niedrigsiedender Lösungsmittel bzw. Wasser führte die geringe Größe dieser Tropfen zum Verdampfen des Lösungsmittels innerhalb weniger Sekunden und damit zum Eintrocknen der Biomoleküllösung auf der Objektträgeroberfläche. Da dies die nachträgliche Entfernung unspezifisch an der Oberfläche haftender Biomoleküle erschweren würde, sollten ausschließlich wässrige Lösungsmittelsysteme mit hochsiedenden Zusätzen zum Einsatz kommen. Wie im Fall der Photomikrostrukturierung sollten thiol- und olefinfunktionalisierte Oberflächen verglichen werden, um das für die Mikroarrayherstellung

3. Allgemeiner Teil

geeignete System zu identifizieren. Daher wurden die thiol- und olefinfunktionalisierten, wasserlöslichen Biotinverbindungen **18** und **19** als Testbiomoleküle verwendet (Abbildung 21a).

Kommerziell erhältliche Glasobjektträger wurden, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, mit einer PAMAM-Dendrimerschicht versehen und thiol- bzw. olefinfunktionalisiert. Die Biotinverbindungen **18**, **19** sowie **22** als Negativkontrolle wurden mit Hilfe eines Piezospotters in drei Konzentrationen von 1 mM bis 50 mM auf thiol- bzw. olefin-PAMAM-funktionalisierte Oberflächen gespottet. Zu allen Lösungen wurden 20 % Glycerin zugesetzt, um ein Verdampfen der Biomoleküllösung in den Punkten auf der Objektträgeroberfläche zu vermeiden. Zur Durchführung der Thiol-En-Photoimmobilisierung wurden die Objektträger für zehn Minuten mit Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt, wonach immobilisiertes Biotin mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen wurde. Der gesamte Arbeitsablauf sowie die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

Wie anhand der Fluoreszenzaufnahmen erkennbar, verlief die Generierung von Mikroarrays der Verbindungen **18** auf thioleffunktionalisierten und **19** auf olefinfunktionalisierten Oberflächen erfolgreich und mit einer mit der Biotinkonzentration ansteigenden Immobilisierungseffizienz (Abbildungen 21c und 21d). Für die Kontrollverbindung **22** wurden bei einer Konzentration von 10 mM etwa 2,5 % des entsprechenden Signals für **18** und **19** gemessen, so dass nur wenig unspezifische Immobilisierung vorlag. Unterschiede zwischen den beiden Biotinverbindungen wurden in Bezug auf Punktmorphologie und -qualität beobachtet: Mit Verbindung **18** wurden auf thioleffunktionalisierten Oberflächen breite und inhomogene Punkte erzielt, während Verbindung **19** auf olefinfunktionalisierten Oberflächen kleine und geometrisch wohldefinierte Punkte ergab (Abbildungen 21c und 21d rechts). Dieser Umstand ist mit der unterschiedlichen Hydrophilie der beiden Oberflächentypen zu erklären: Die hydrophile Thioleoberfläche führte zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung der Biomoleküllösung und damit zu breiteren und inhomogeneren Punkten, während aus der vergleichsweise höheren Hydrophobizität der Olefinoberfläche ein dazu entgegengesetzter Effekt resultierte. Während beide Strategien somit die Herstellung von Biomolekülmikroarrays zulassen, ist der Unterschied in der Punktqualität ein wichtiger Faktor, da auf Mikroarrays größtmögliche Dichte von Biomolekülpunkten und homogener Punktmorphologie erwünscht ist. Zur Mikroarrayherstellung ist daher die Immobilisierung thioleffunktionalisierter Biomoleküle auf Olefinoberflächen zu bevorzugen, da in diesem Fall Arraypunkte höherer Qualität erhalten werden, sofern die Eigenschaften des Biomoleküls, z.B. potentiell die Reaktion störende, reaktive Gruppen, wie z.B. Thiolgruppen von Cysteinen im Fall von Peptiden oder Proteinen, die mit der olefinfunktionalisierten Oberfläche unspezifisch reagieren könnten, dies nicht verhindern.

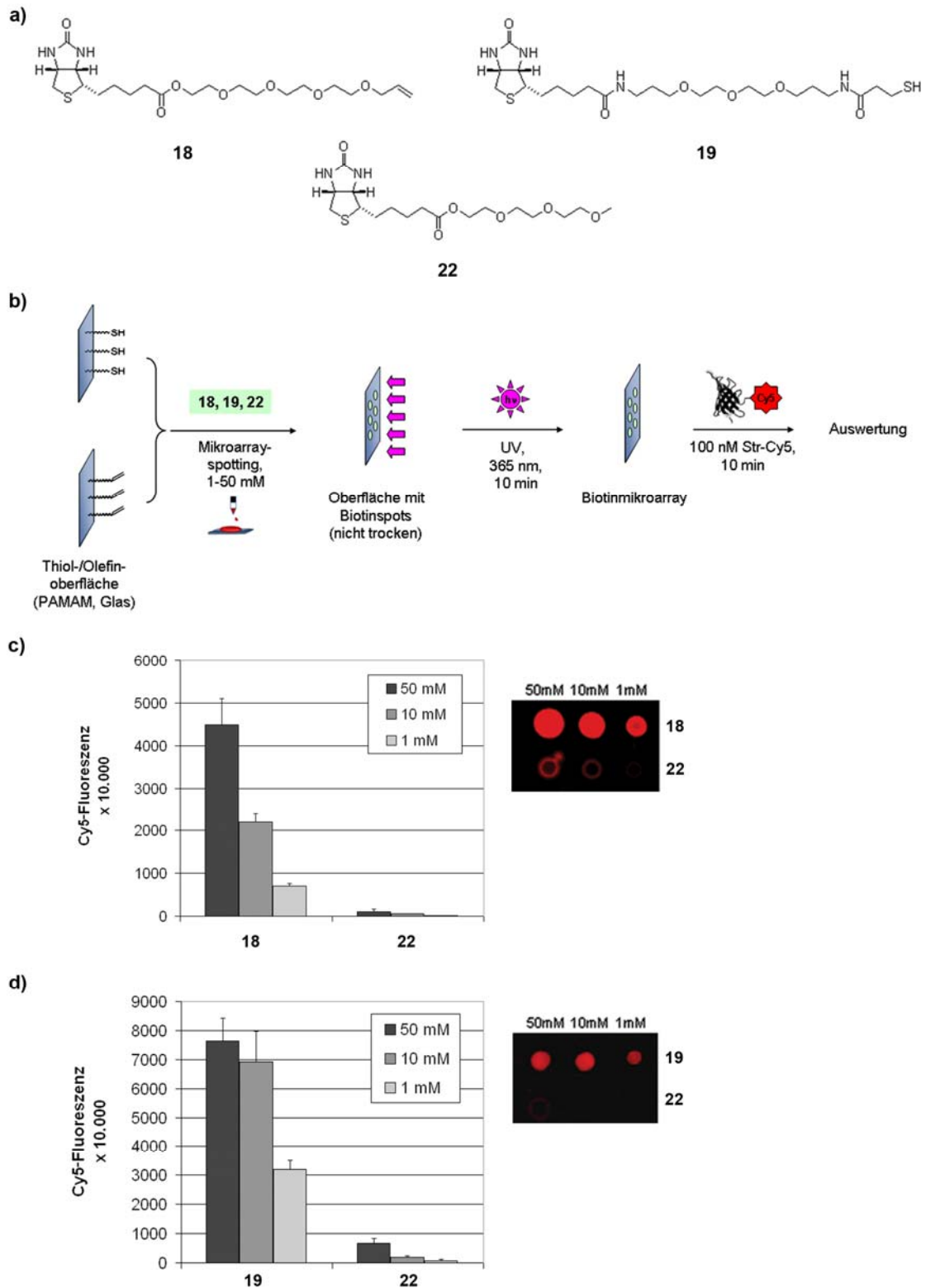


Abbildung 21: Herstellung eines Biotinmikroarrays. a) Verwendete Biotinverbindungen. b) Arbeitsablauf der Mikroarrayherstellung. c) Links: Quantitative Ergebnisse des Mikroarrays mit **18** und **22** als Negativkontrolle (Mittelung über 9 Punkte). Rechts: Fluoreszenzaufnahme eines Mikroarrayabschnitts. d) Links: Quantitative Ergebnisse des Mikroarrays mit **19** und **22** als Negativkontrolle. Rechts: Fluoreszenzaufnahme eines Mikroarrayabschnitts.

3.4.2 Oligonukleotidmikroarrays

Da die Vorversuche zur Herstellung von Biomolekülmikroarrays erfolgreich verlaufen waren, wurde die Anwendung der Methode auf Oligonukleotide als weitere Biomolekülklasse untersucht. Aufgrund des großen Anteils von DNA-Mikroarrays an der Gesamtheit der derzeit genutzten Biomolekülmikroarrays kann die erfolgreiche Herstellung von Oligonukleotidmikroarrays als Mindestanforderung an eine generell anwendbare Biomolekül immobilisierungsmethode gelten.

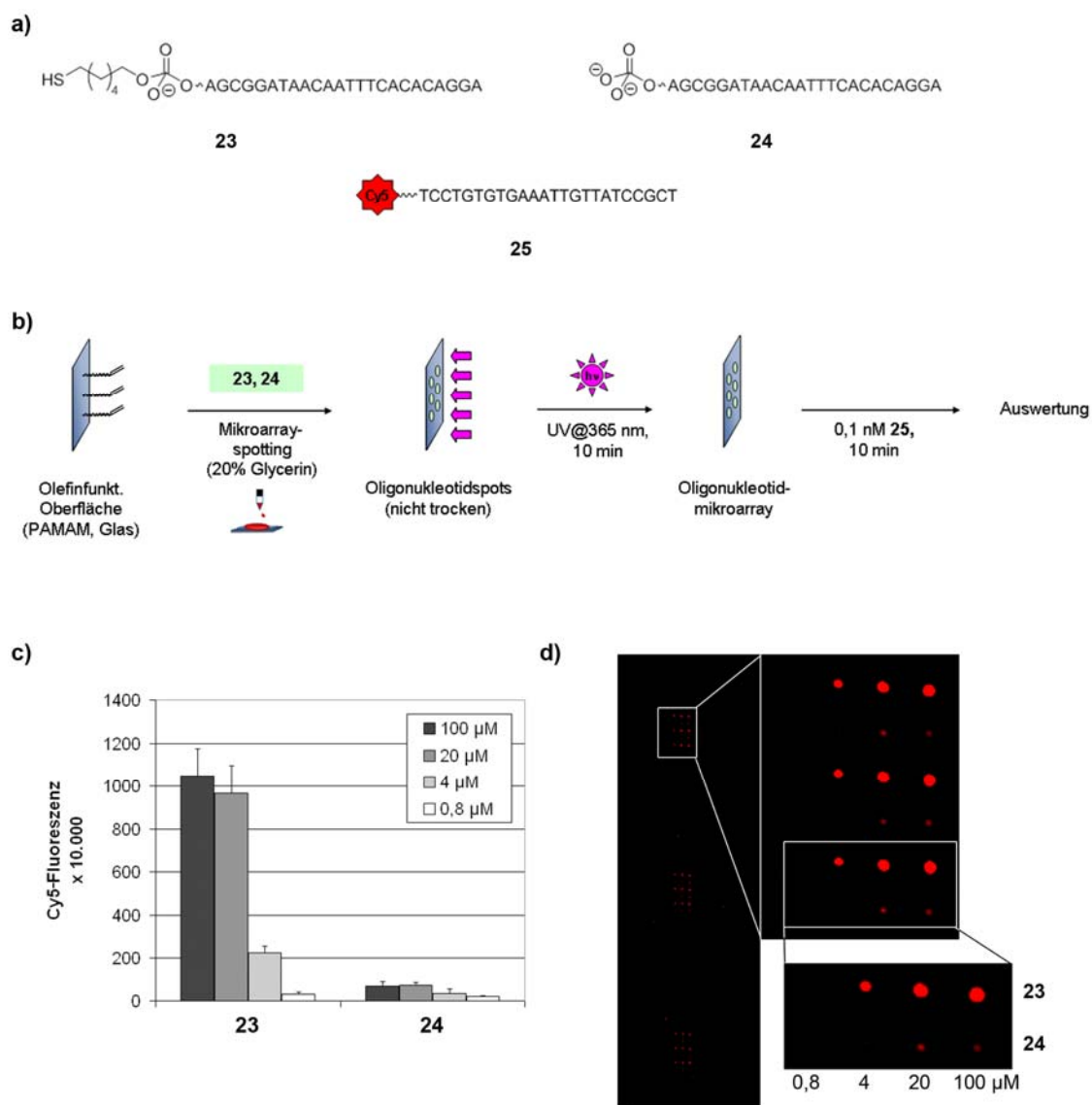


Abbildung 22: Herstellung eines Oligonukleotidmikroarrays. a) Verwendete Oligonukleotide **23**, die Negativkontrolle **24** sowie das zur Detektion verwendete Oligonukleotid **25**. b) Darstellung des Arbeitsablaufs. c) Quantitative Auswertung des Oligonukleotidmikroarrays (Mittelung über 9 Punkte). d) Fluoreszenzaufnahme des Oligonukleotidmikroarrays in verschiedenen Vergrößerungsstufen.

Das thiolethylfunktionalisierte Oligonukleotid **23** wurde zusammen mit der Negativkontrolle **24** auf olefin-PAMAM-funktionalisierte Glasobjektträger gespottet und zehn Minuten mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt (Abbildungen 22a und 22b). Aufgrund der bei der Optimierung der Herstellung von Biotinmikroarrays gewonnenen Erkenntnisse zu Punktmorphologie und –qualität (siehe Abschnitt 3.4.1) wurde die Herstellung von Mikroarrays olefinfunktionalisierter Oligonukleotide nicht untersucht. Wie zuvor kamen im Rahmen des Spottens glycerinbasierte Puffer zum Einsatz, um Eintrocknen der Oligonukleotidpunkte auf der Oberfläche zu verhindern. Als Maximalkonzentration wurde im Gegensatz zu den zuvor üblichen Konzentrationen bis 50 mM nur 100 μ M verwendet, da andernfalls aufgrund des vergleichsweise hohen Molekulargewichts der verwendeten Oligonukleotide im Bereich um etwa 8000 g/Mol ein zu hoher Materialverbrauch die Folge gewesen wäre. Detektion der immobilisierten Oligonukleotide erfolgte durch Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten, komplementären Oligonukleotid **25**. Die Abbildungen 22c und 22d zeigen die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen sowie die quantitative Auswertung des Mikroarrays. **23** ergab gut definierte Punkte mit steigender Immobilisierungseffizienz bei höheren Konzentrationen, während für die Negativkontrolle **24** bei der maximalen Konzentration von 100 μ M die Fluoreszenzintensität nur 6 % des Wertes für **23** betrug, so dass von geringer unspezifischer Immobilisierung ausgegangen werden kann. Die Herstellung von Oligonukleotidmikroarrays mittels Thiol-En-Photoimmobilisierung ist somit möglich.

3.4.3 MUC1-Glykopeptidmikroarrays

In weiteren Experimenten wurde von Dr. Ulrika Westerlind (AG Waldmann, MPI Dortmund) die Herstellung von Mikroarrays der komplexen, von Mucinen abgeleiteten MUC1-Glykopeptide untersucht. Mucine, zu denen MUC1 gehört, werden von Zellen der Drüsenepithelien synthetisiert und dienen dem Schutz des Epitheliums, spielen aber auch eine Rolle bei der interzellulären Kommunikation.^[14-16] Viele Krebszellen weisen eine erhöhte Expression von membrangebundenem MUC1^[14, 15] sowie ein an der Zelloberfläche im Vergleich zu gesunden Zellen abweichendes Glykosylierungsmuster auf,^[75] das als mögliche Erkennungssequenz für Antikörper und somit als potentielle Impfstoffe für die Krebsbehandlung gesehen wird. Die Entwicklung von Impfstoffen auf Mucinbasis wird jedoch durch die Komplexität der verschiedenen auftretenden Glykosylierungsmuster erschwert. Glykopeptidmikroarrays auf Mucinbasis, die die parallele Analyse verschiedenster Glykosylierungsmuster ermöglichen, wären daher wertvolle Werkzeuge zu ihrer Aufklärung. Zur Überprüfung der Photoimmobilisierungsparameter wurden das biotinylierte, thiolethylfunktionalisierte MUC1-Peptid **26** ohne Zuckerrest sowie das nicht-thiolethylfunktionalisierte

3. Allgemeiner Teil

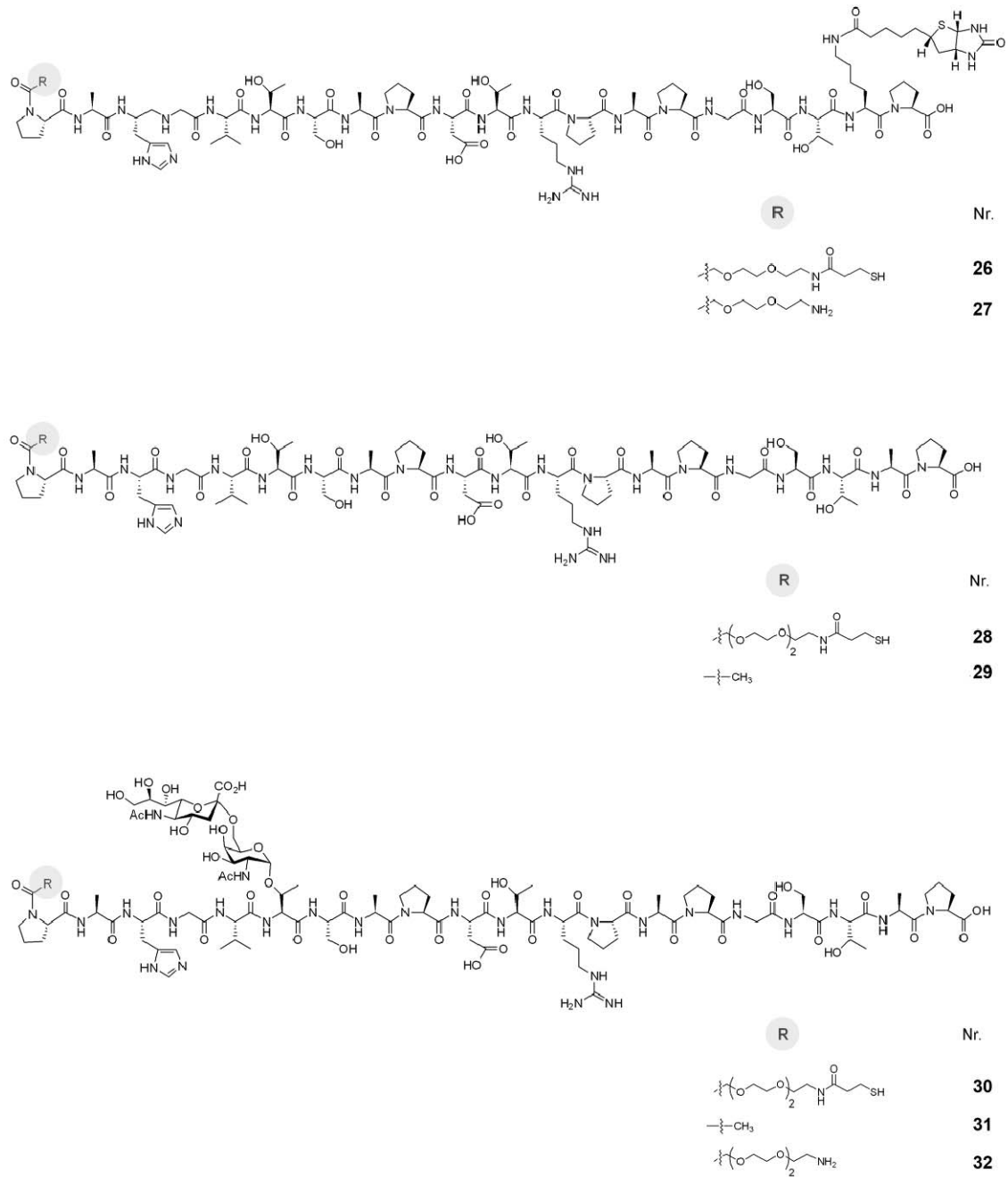


Abbildung 23: Von MUC1 abgeleitete Peptide und Glykopeptide für die Herstellung von Mikroarrays.

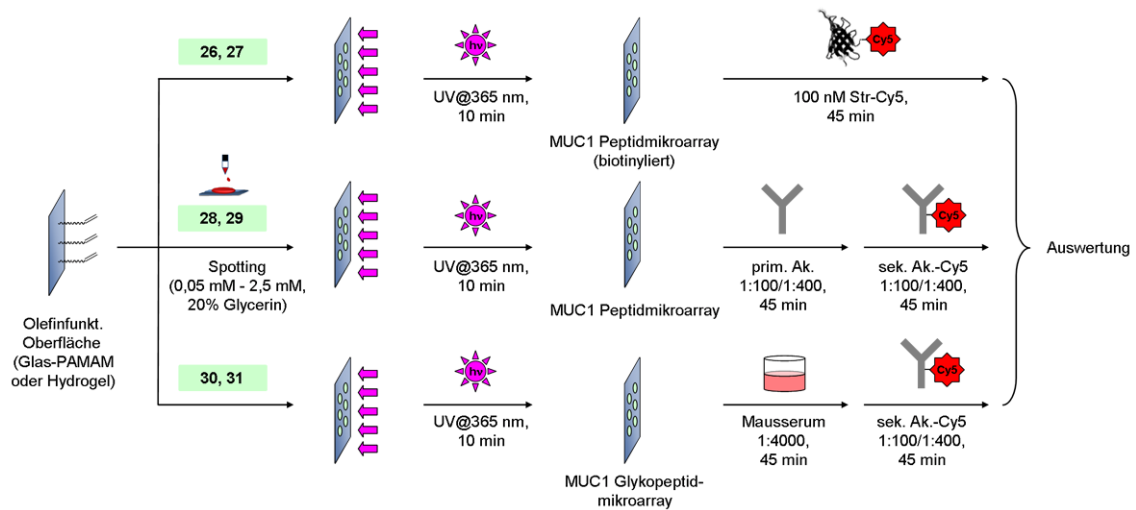


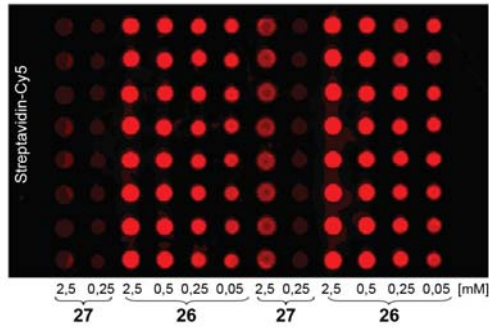
Abbildung 24: Arbeitsablauf zur Herstellung der MUC1-Peptid- und Glykopeptidmikroarrays.

Kontrollpeptid **27** verwendet (Abbildung 23). Die Biotinylierung diente der vereinfachten Detektion des Peptids mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nach der Immobilisierung. Die Peptide **26** und **27** wurden in verschiedenen Konzentrationen auf einen olefin-PAMAM-funktionalisierten Glasobjektträger gespottet und durch zehnmütige Bestrahlung bei 365 nm photoimmobilisiert. Der Nachweis immobilisierter Peptide erfolgte anschließend mit Streptavidin-Cy5 (Abbildung 24). Die Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 25a zeigt erfolgreiche Immobilisierung des Peptids **26**, während für die Kontrolle **27** nahezu keine Immobilisierung beobachtet wurde. Die verwendeten Parameter schienen somit die selektive Photoimmobilisierung olefinfunktionalisierter MUC1-Peptide zu ermöglichen.

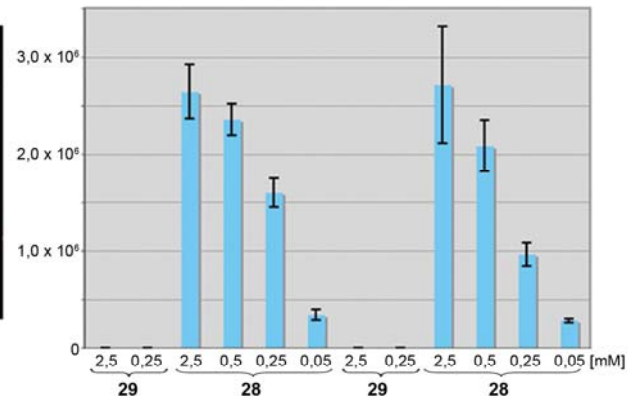
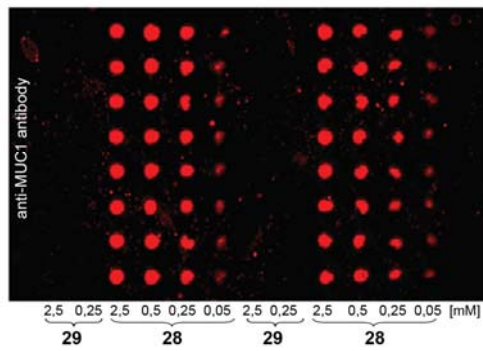
Um die Integrität der immobilisierten MUC1-Peptide zu überprüfen, wurden die nicht-biotinylierten Peptide **28** und **29** als Negativkontrolle verwendet. Als Oberfläche für die Thiol-En-Photoimmobilisierung kamen in diesem Experiment im Unterschied zu den zuvor verwendeten Glasoberflächen olefinfunktionalisierte, hydrogelbeschichtete Glasobjektträger zum Einsatz, da diese in Vorversuchen zur Verbesserung der Signalqualität geführt hatten. Die Herstellung der olefinfunktionalisierten Hydrogelobjektträger wurde ausgehend von kommerziell erhältlichen, N-Hydroxysuccinimid-aktivierten, hydrogelbeschichteten Glasobjektträgern durchgeführt, die mit dem Olefinanker **14** funktionalisiert wurden (siehe Abbildung 14b). Nach Spotten der Peptide **28** und **29** in verschiedenen Konzentrationen gefolgt von zehnmütiger Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm, wurde das erhaltene MUC1-Peptidmikroarray mit einem monoklonalen, gegen die Peptidsequenz der unglykosylierten MUC1-Tandemsequenz gerichteten Antikörper (SM3, unglykosyliertes MUC1)^[13, 14] inkubiert (Abbildung 24). Dieser wurde nachfolgend mit einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. Die Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 25b zeigt die Detektion des

3. Allgemeiner Teil

a) Biotinylierte MUC1-Peptide (26 und 27)



b) MUC1-Peptide (28 und 29)



c) MUC1-Glykopeptide (30 und 31)

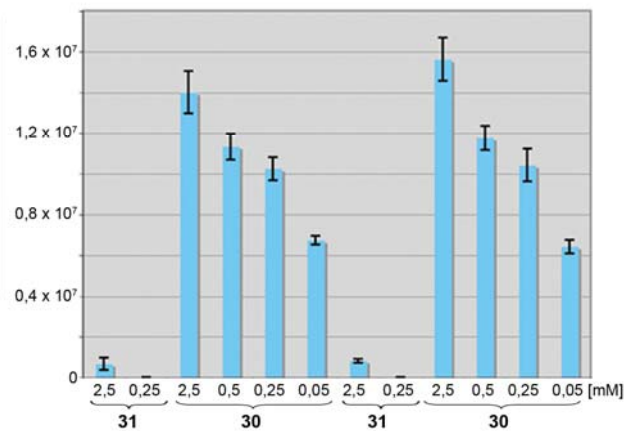
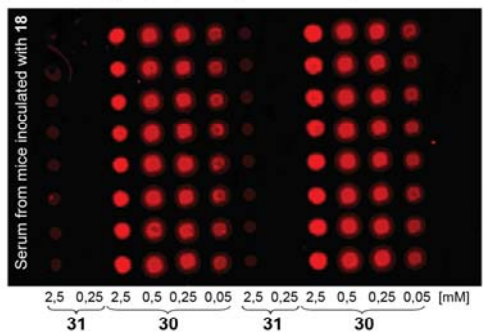


Abbildung 25: Auswertung MUC1-Peptid- und -Glykopeptidmikroarrays. a) Mikroarray des biotinylierten Peptids **26** und der Negativkontrolle **27** auf olefinfunktionalisiertem Glas (PAMAM-Dendrimere). Nachweis erfolgte mit Streptavidin-Cy5. b) Mikroarray des MUC1-Peptids **28** und der Negativkontrolle **29** auf olefinfunktionalisierten Hydrogelslides. Nachweis erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper. c) Mikroarray des Sialyl-T_N-MUC-Glykopeptids **30** und der Negativkontrolle **31** auf olefinfunktionalisierten Hydrogelslides. Nach Inkubation mit Maus-Serum, das nach Impfung mit einem MUC1-Glykopeptidkonstrukt gewonnen worden war, folgte der Nachweis aus dem Serum bindender Antikörper mit einem markierten, sekundären anti-Maus Antikörper.

immobilisierten, olefinfunktionalisierten Peptids **28** auf der Oberfläche, während das Kontrollpeptid **29** nahezu nicht nachweisbar war. Die erfolgreiche Erkennung durch den Antikörper wies auf Erhalt der Struktur des photoimmobilisierten Peptids auf der Oberfläche hin, so dass nachfolgend die Photoimmobilisierung der komplexeren MUC1-Glykopeptide in Angriff genommen werden konnte.

Zur Herstellung eines MUC1-Glykopeptidmikroarrays wurden das thioolfunktionalisierte Glykopeptid **30** sowie die acetylierte Negativkontrolle **31** verwendet. Beide Peptide trugen einen für Tumorzellen spezifischen, glykosidischen, an eine Threoninseitenkette gebundenen Sialyl-T_N-Rest.^[76] Spotten erfolgte in verschiedenen Konzentrationen auf olefinfunktionalisierten Hydrogeloberflächen, während die Photoimmobilisierung wiederum durch zehnmütige Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm durchgeführt wurde. Das auf diese Weise erhaltene MUC1-Glykopeptidmikroarray wurde nachfolgend mit Maus-Serum inkubiert, das in Folge einer mit einem Konjugat aus Glykopeptid **32** und einem Tetanusprotein durchgeführten Immunisierung gewonnen worden war (Abbildung 24).^[77] Auf diese Weise sollten mit Hilfe des MUC1-Glykopeptidmikroarrays eventuell vorhandene Antikörper im untersuchten Serum nachgewiesen werden. Immobilisierte Antikörper wurden wiederum mit einem fluoreszenzmarkierten, Anti-Maus-Antikörper detektiert. Abbildung 25c zeigt die erhaltene Fluoreszenzaufnahme. An das Glykopeptid **30** gebundene Serumantikörper konnten erfolgreich detektiert werden, während die Kontrolle **31** nur geringe Immobilisierung zeigte. Die Thiol-En-Reaktion ist somit auch für die Herstellung von Mikroarrays komplexer Biomoleküle einsetzbar, wie anhand der MUC1-Glykopeptide gezeigt werden konnte.

3.4.4 Zusammenfassung

Mittels Thiol-En-Photoimmobilisierung gelang die Herstellung von Mikroarrays von Biotinverbindungen, Oligonukleotiden sowie von MUC1-Peptiden und -Glykopeptiden. Im Unterschied zur Photomikrostrukturierung niedermolekularer Biomoleküle (Abschnitt 3.2) wurde statt SiO_x/Si Glas als Trägermaterial verwendet, um die Konkurrenzfähigkeit der Methode zu demonstrieren. Vorversuche zeigten die Möglichkeit einer Verwendung sowohl von thiol- als auch von olefinfunktionalisierten Oberflächen mit PAMAM-Dendrimerschicht. Trotz der gleichwertigen Immobilisierungseffizienz unterschieden sich diese jedoch in der Punktqualität, da auf hydrophoben, olefinfunktionalisierten Oberflächen kleinere, besser definierte Punkte erhalten wurden. Diese Oberflächen wurden daher bevorzugt verwendet, sofern bestimmte Eigenschaften des Biomoleküls, z.B. störende chemische Funktionalitäten, dies nicht ausschlossen. Entgegen dieser Strategie erfolgte beispielsweise die Herstellung von MUC1-Peptid- und Glykopeptidarrays durch Dr. Ulrika Westerlind (MPI Dortmund, Abteilung Waldmann) mit thioolfunktionalisierten Biomolekülen aufgrund deren synthetischer

Zugänglichkeit. Die unspezifische Immobilisierung der Negativkontrollen war in allen Experimenten durchgängig niedrig. Ferner kamen zur Vermeidung des Eintrocknens von Biomoleküllösungen auf den für die Herstellung der Mikroarrays verwendeten Objektträgeroberflächen hochsiedende Lösungsmittelgemische (20 % Glycerin in Wasser) zum Einsatz. Die Anwendbarkeit der erzeugten Biomolekülmikroarrays konnte ebenfalls demonstriert werden: In einem biologischen Anwendungsszenario wurden MUC1-Glykopeptidmikroarrays erfolgreich zum Nachweis von Antikörpern in Maus-Seren eingesetzt.

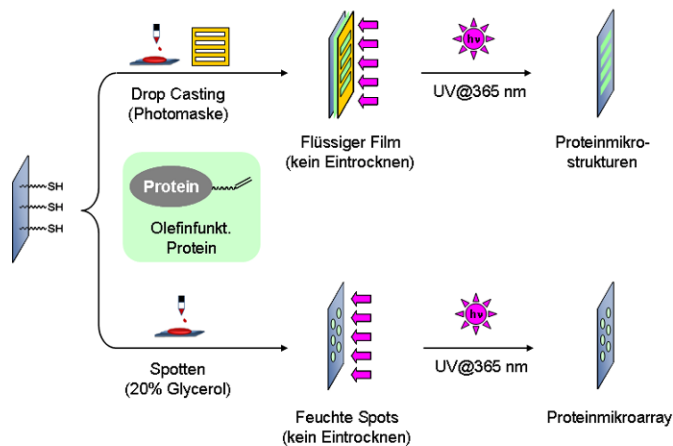
3.5 Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Proteinen auf Oberflächen

3.5.1 Indirekte und direkte Thiol-En-Mikrostrukturierung von Proteinen

Proteine sind gekennzeichnet durch hohe Komplexität und Empfindlichkeit. Aus diesem Grund stellt die Immobilisierung von Proteinen zur Herstellung von Proteinbiochips besondere Anforderungen an die zu verwendende Immobilisierungsmethode. Diese muss milde Immobilisierungsbedingungen ermöglichen und vor allem Eintrocknen von Proteinlösungen auf der für die Immobilisierung verwendeten Oberfläche verhindern, da andernfalls die Gefahr der Proteindenaturierung und somit von Aktivitätsverlust besteht. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, bestehen die Möglichkeit der kovalenten, d.h. direkten chemischen Immobilisierung von Proteinen, an der eine oder mehrere funktionelle Gruppen des Proteins in einer chemischen Reaktion beteiligt sind, sowie der nicht-kovalenten, d.h. indirekten Immobilisierung, die niedermolekulare Moleküle, wie z.B. Biotin oder Oligonukleotide, oder Aminosäuresequenzen nutzt, um die eigentliche Proteinimmobilisierung zu erzielen.

Da die Thiol-En-Mikrostrukturierung, wie in Abschnitt 3.2 gezeigt, für die Herstellung von Biotinmikrostrukturen geeignet ist, sollte die indirekte Mikrostrukturierung von Proteinen über das Biotin-Streptavidin-System untersucht werden. Dieses Verfahren, dessen Ablauf schematisch in Abbildung 26b gezeigt ist, wäre somit als indirekte Thiol-En-Proteinmikrostrukturierung zu bezeichnen. Vorteile dieser Immobilisierungsmethode sind hohe Modularität, da jedes biotinylierte Protein immobilisiert werden kann, sowie die milden Reaktionsbedingungen, da die zu immobilisierenden Proteine nur mit der zuvor erzeugten Biotinoberfläche inkubiert werden und nicht der eigentlichen Photoimmobilisierungsreaktion ausgesetzt werden müssen. Ein weiterer bedeutender Vorteil ist der Einsatz von Licht als Reaktionsinitiator, da dieser der Methode aufgrund der durch optische Techniken frei gestaltbaren Biomolekülsstrukturgeometrie eine hohe Flexibilität verleiht.

a) Direkte Proteinimmobilisierung



b) Indirekte Proteinimmobilisierung

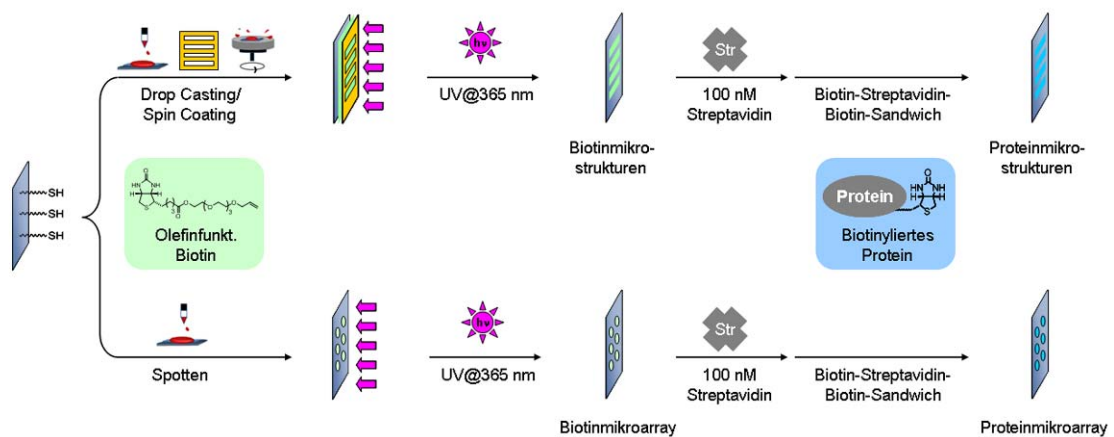


Abbildung 26: Strategien zur Thiol-En-Proteinimmobilisierung. a) Direkte Immobilisierung eines olefinfunktionalisierten Proteins auf thiolethoxylierten Oberflächen. b) Indirekte Immobilisierung eines biotinylierten Proteins mit Hilfe eines Biotin-Streptavidin-Biotin-Sandwichs.

Der Einsatz der Thiol-En-Reaktion ist ferner für die direkte Mikrostrukturierung von Proteinen denkbar, da sie gerichtet und kovalent ablaufen würde, was die günstigste Kombination bei der Immobilisierung von Proteinen ist (siehe Abschnitt 1.3). Diese direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung würde die Vorteile der kovalenten, gerichteten Immobilisierung mit der Flexibilität der Verwendung von Licht vereinen. Die beteiligten Reaktionspartner sind theoretisch inert gegenüber den funktionellen Gruppen des beteiligten Proteins, und die Reaktion kann unter physiologischen Bedingungen (Raumtemperatur, pH 7 in wässrigen Systemen) durchgeführt werden, die für die Stabilität und damit für die Erhaltung der Aktivität der Proteine erforderlich sind. In der direkten Thiol-En-Photomikrostrukturierung ist die Immobilisierung olefinfunktionalisierter Proteine zu bevorzugen, nicht jedoch die thiolethoxyliertester Proteine, da im letzteren Fall Cysteinreste des Proteins unspezifisch mit der Olefinoberfläche reagieren und zu ungerichteter Orientierung auf der Oberfläche führen

3. Allgemeiner Teil

könnten. Der Ablauf der direkten Thiol-En-Photoimmobilisierung ist in Abbildung 26a schematisch dargestellt.

3.5.2 Indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von CIAP

Für die Untersuchung der indirekten Thiol-En-Photomikrostrukturierung wurde biotinylierte alkalische Phosphatase (calf-intestine alkaline phosphatase, CIAP) als Testprotein ausgewählt, da sie sich durch hohe Stabilität auszeichnet und häufig in enzymbasierten Immunoassays eingesetzt wird (enzyme-based immunosorbent assay, ELISA).^[78] Aus diesem Grund existiert zudem eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Detektionssystemen, mit

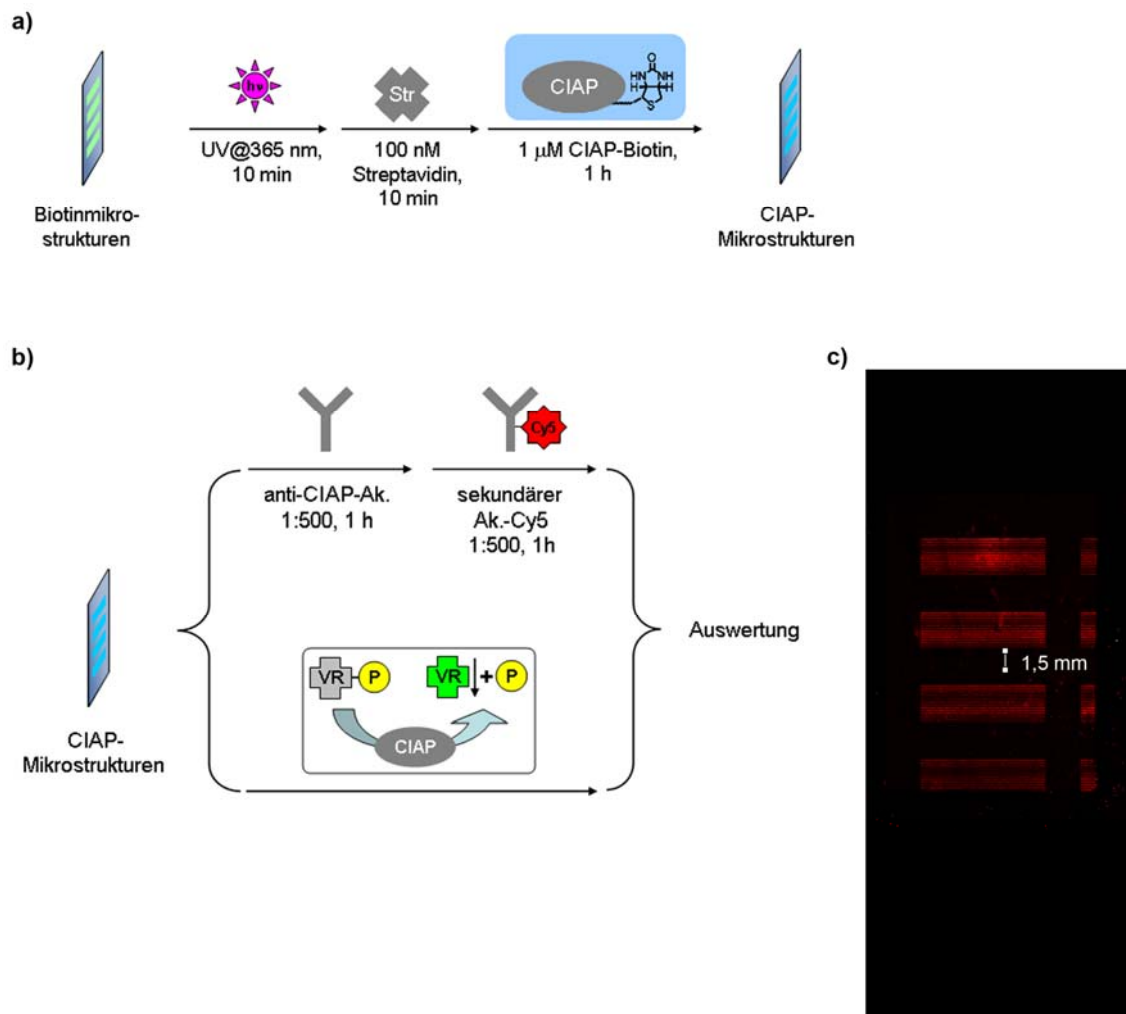


Abbildung 27: Indirekte Thiol-En-Photoimmobilisierung von CIAP-Biotin. a) Arbeitsablauf der Herstellung von CIAP-Mikrostrukturen ausgehend von Biotinmikrostrukturen. b) Nachweis von CIAP-Mikrostrukturen mittels eines CIAP-Antikörpers oder VectorRed (VR). Das fluorogene CIAP-Substrat VectorRed wird von CIAP dephosphoryliert und präzipitiert aus der Lösung. c) Fluoreszenzaufnahme von mit Antikörpern nachgewiesenen CIAP-Mikrostrukturen auf Objektträgergröße (25x27 mm²).

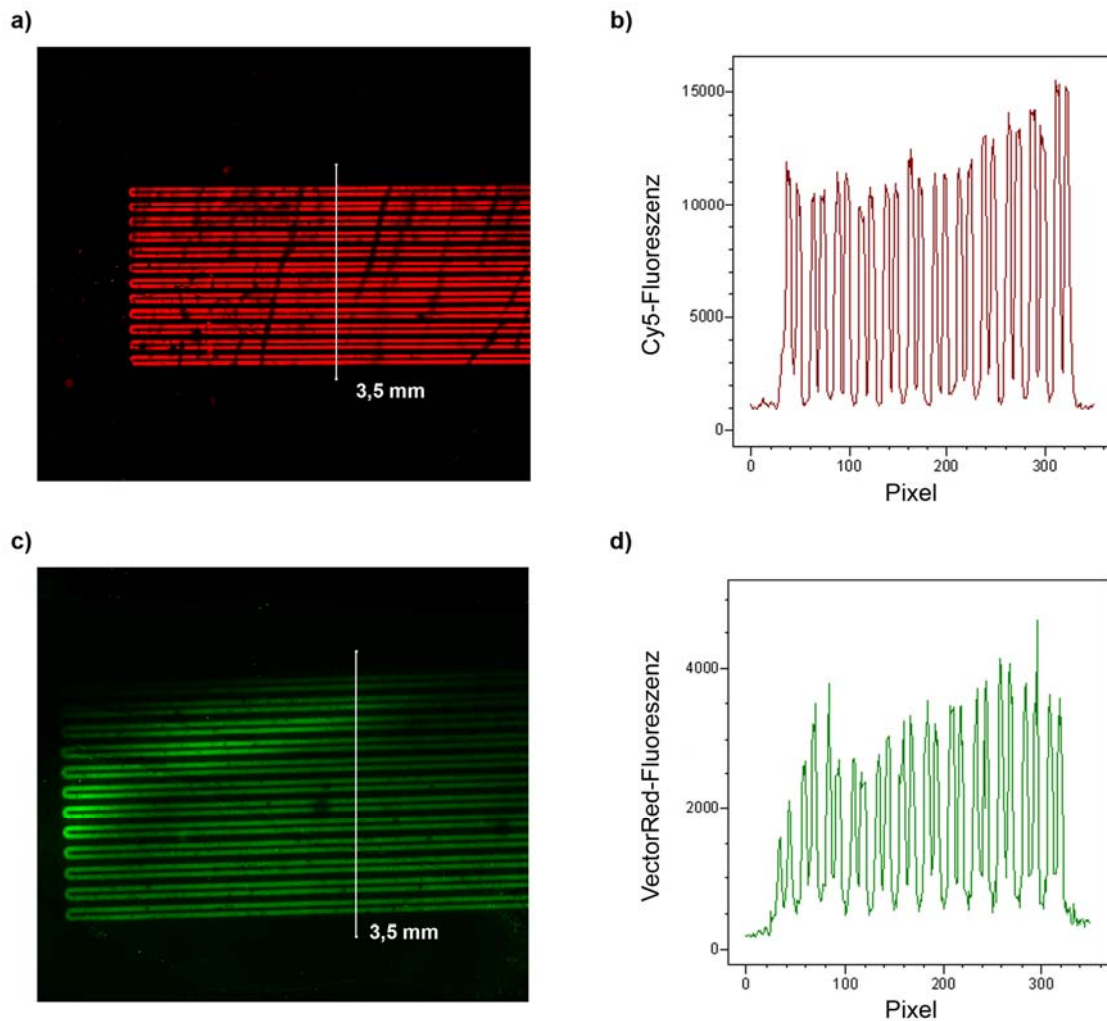


Abbildung 28: Ergebnisse der Auswertung der CIAP-Mikrostrukturierung. a) Fluoreszenzaufnahme von mittels Antikörper nachgewiesenen CIAP-Mikrostrukturen. b) Intensitätshistogramm des Querschnitts in a). c) Fluoreszenzaufnahme der Mikrostrukturen von ausgefallenem VectorRed. d) Intensitätshistogramm des Querschnitts in c).

denen die Aktivität der immobilisierten CIAP überprüft werden kann. Als Templat für die Immobilisierung von CIAP wurden Biotinmikrostrukturen verwendet, die, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, durch Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Biotinverbindung **18** auf thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Objektträgern hergestellt wurden. Die mikrostrukturierte Biotinoberfläche wurde nachfolgend sequentiell mit Streptavidin sowie mit biotinylierter CIAP inkubiert. Nachweis immobilisierter CIAP erfolgte mit dem CIAP-Substrat VectorRed (VectorLabs), das nach Dephosphorylierung durch CIAP in einer fluoreszierenden Form präzipitiert und so eine Visualisierung der erzeugten CIAP-Mikrostrukturen ermöglicht. Alternativ wurde immobilisierte CIAP mit Hilfe eines anti-CIAP-Antikörpers nachgewiesen. Der gesamte Prozess ist schematisch in Abbildung 27 dargestellt. Die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 28 zeigen sowohl für den Antikörpernachweis also auch

für VectorRed deutlich erkennbare Strukturen auf der mikrostrukturierten Oberfläche, so dass die Aktivität der CIAP belegt werden konnte. Indirekte Thiol-En-Photoimmobilisierung eines funktionalen Enzyms konnte somit erfolgreich demonstriert werden.

3.5.3 Indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die indirekte Thiol-En-Photoimmobilisierung der GTPase N-Ras untersucht (GTP: Guanosintriphosphat). N-Ras ist Teil der Ras-Superfamilie von kleinen GTPasen. Ras ist ein Element des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs^[20] und liegt in der Zelle sowohl in einer inaktiven, GDP-gebundenen (GDP: Guanosindiphosphat) sowie einer aktiven, GTP-gebundenen Form vor. Eine mutierte, dauerhaft aktive Form von Ras ist in 30 % aller menschlichen Krebsformen involviert.^[21, 22] Um biotinyliertes N-Ras zu erhalten, wurde das maleimid- und biotinfunktionalisierte Peptid **34** verwendet (Abbildung 29a). Die Sequenz des Peptids wurde gewählt, um durch die drei Lysinreste die Wasserlöslichkeit des Peptids zu gewährleisten, die durch die N-terminale Maleimidfunktionalisierung und durch die Verknüpfung des Aspartatrestes mit einem Biotinanker reduziert wird. Peptid **34** wurde an die verkürzte N-Ras Variante N-Ras¹⁻¹⁸¹ ligiert, die aufgrund eines leicht zugänglichen, C-terminalen Cysteins für maleimidbasierte Ligationsreaktionen (MIC-Ligation, MIC: 6-Maleimidocapronsäure)^[79] zur Verfügung stand (Abbildung 29b).^[80] Nach Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Biotinverbindung **18** auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (zu Herstellung siehe Abschnitt 3.2) und Inkubation der Oberfläche mit Streptavidin erfolgte Immobilisierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹ durch Inkubation der Oberfläche mit biotinyliertem N-Ras¹⁻¹⁸¹. Das indirekt immobilisierte N-Ras wurde anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Ras-Antikörper auf der Oberfläche detektiert. Alle Arbeitsschritte sowie die Ergebnisse sind in den Abbildung 29c und 29d dargestellt. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt deutlich sichtbare Mikrostrukturen auf der Oberfläche. Da der Antikörper an eine Helix in der Nähe des aktiven Zentrums des Proteins bindet, zeigt dies zudem den Erhalt der Struktur des Proteins auf der Oberfläche.^[81]

In einem weiteren Experiment wurden Protein-Protein-Interaktionen zwischen indirekt immobilisiertem N-Ras¹⁻¹⁸¹ und der Ras-bindenden Domäne (RBD) von cRaf1 untersucht. cRaf1 ist ein zellulärer Bindungspartner von aktivem, GTP-gebundenen Ras in der Zelle. Die Affinität der RBD für GTP-gebundenes N-Ras liegt bei ca. 160 nM, während für GDP-gebundenes N-Ras eine Aktivität von etwa 50 µM bestimmt wurde.^[82] Durch Nukleotidaustausch von GDP gegen GppNHp, ein nicht-hydrolysierbares Analogon von GTP, wurde GppNHp-gebundenes N-Ras¹⁻¹⁸¹ gewonnen (erhalten von Christine Nowak; für die Vorschrift siehe ^[83]). GDP- und GppNHp-beladenes N-Ras¹⁻¹⁸¹ wurden anschließend C-terminal an das biotinylierte Peptid **34** ligiert. N-Ras¹⁻¹⁸¹:GDP und N-Ras¹⁻¹⁸¹:GppNHp wurden in

3. Allgemeiner Teil

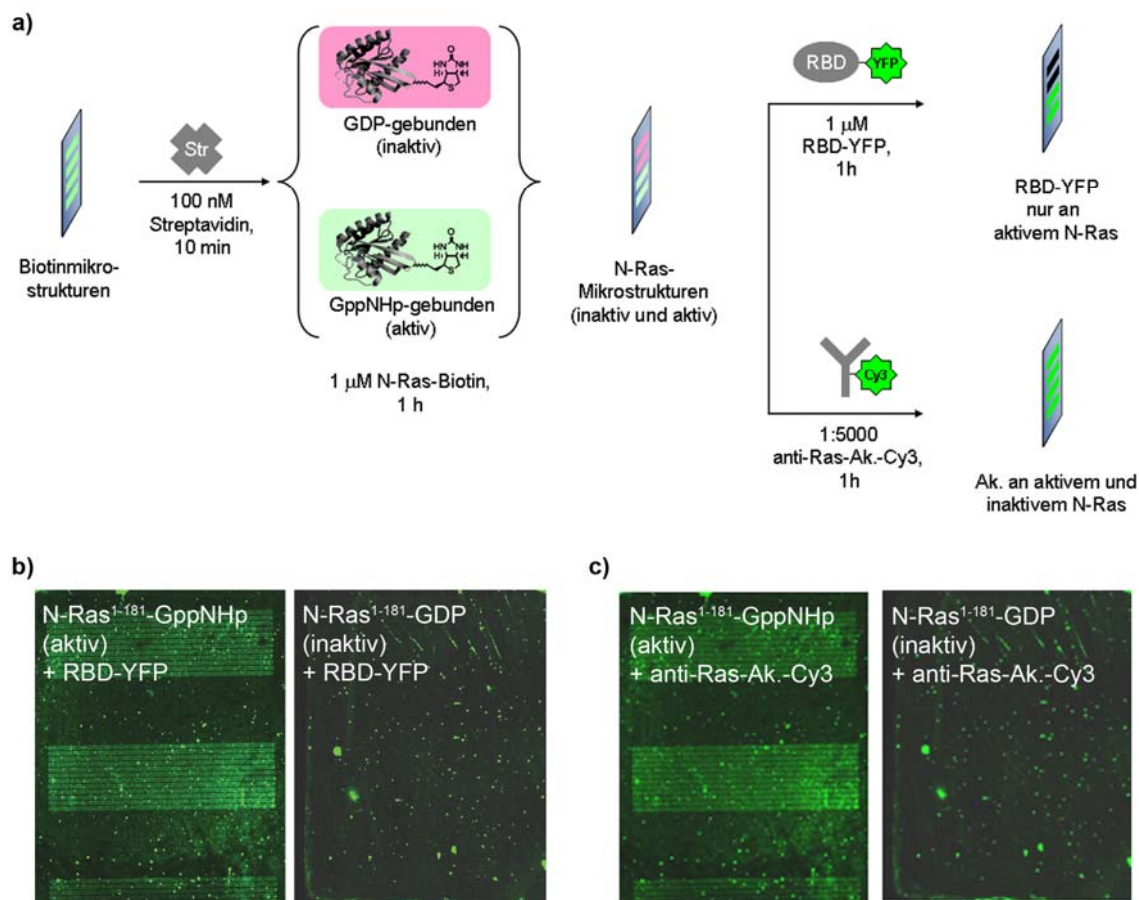


Abbildung 30: Indirekte Mikrostrukturierung von biotinyliertem N-Ras¹⁻¹⁸¹ und Interaktionsexperiment mit RBD-YFP. a) Arbeitsablauf. b) Fluoreszenzaufnahme der mit RBD-YFP inkubierten Oberfläche. c) Fluoreszenzaufnahme der mit dem Cy3-markierten anti-Ras-Antikörper inkubierten Oberfläche.

verschiedenen Bereichen eines biotinmikrostrukturierten SiO_x/Si-Objektträgers immobilisiert und mit einem Fusionsprotein aus der Ras-bindenden Domäne (RBD) von cRaf1 und gelbem fluoreszierenden Protein (yellow fluorescent protein, YFP) inkubiert (RBD-YFP).^[80]

In einem parallel durchgeführten Experiment wurde eine identische hergestellte, mit biotinyliertem N-Ras¹⁻¹⁸¹ (GDP- und GppNHp-gebunden) mikrostrukturierte Oberfläche mit fluoreszenzmarkiertem anti-Ras-Antikörper inkubiert, um das Vorhandensein beider Formen des biotinylierten N-Ras¹⁻¹⁸¹ auf der Oberfläche zu verifizieren. Der Versuchsablauf sowie die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 30 gezeigt. Mikrostrukturen von sowohl GDP- als auch GppNHp-gebundenem N-Ras¹⁻¹⁸¹ wurden durch den anti-Ras-Antikörper auf der Oberfläche detektiert, während die Bindung von RBD-YFP nur im Fall von GppNHp-gebundenem N-Ras¹⁻¹⁸¹ nachgewiesen wurde. Der Aktivitätszustand der beiden N-Ras¹⁻¹⁸¹-Isoformen konnte daher auf der Oberfläche durch Interaktion mit einem weiteren Protein unterschieden werden. Der Nachweis von spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen ist mit diesen Proteinbiochips somit möglich.

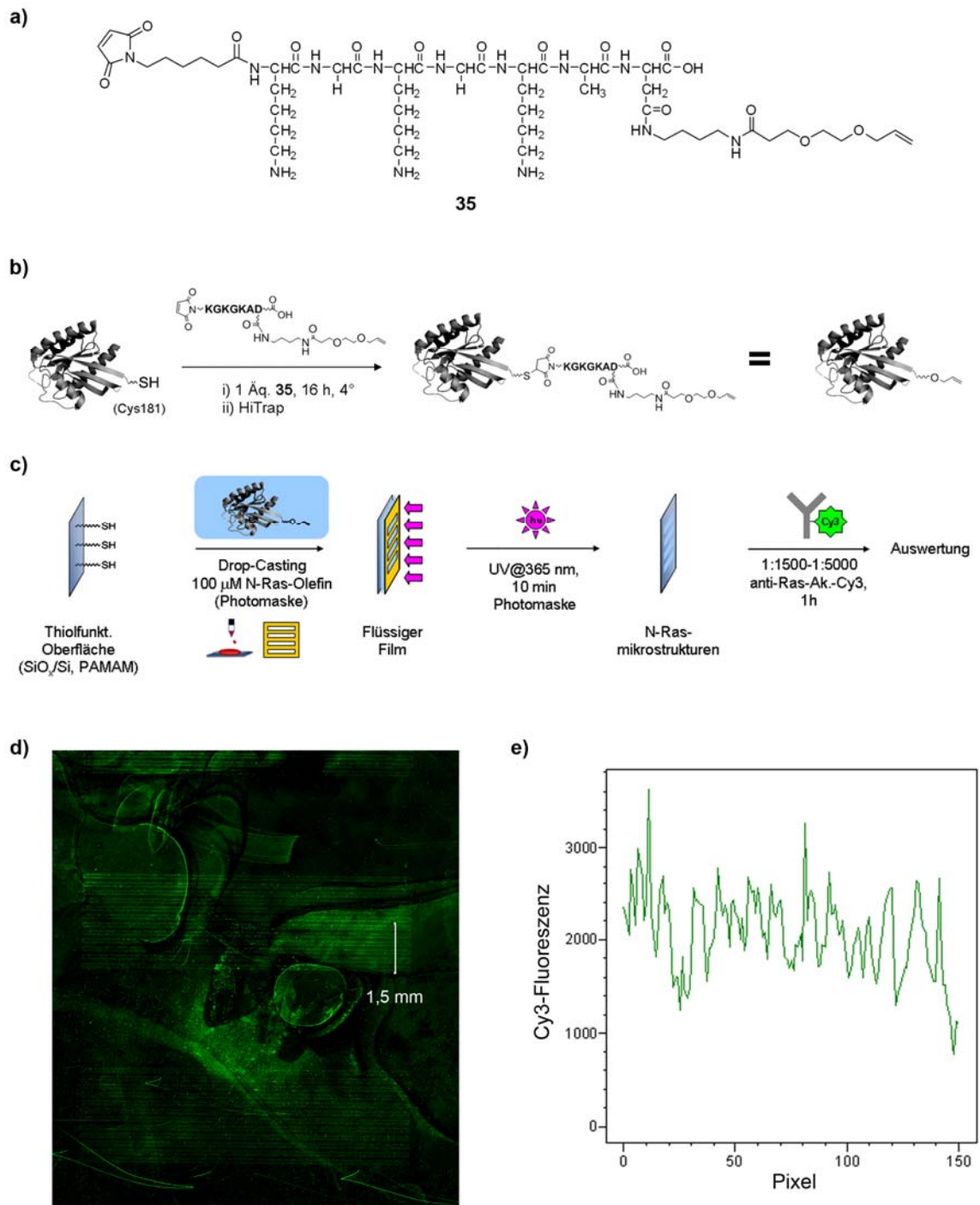
3.5.4 Direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Olefin

Abbildung 31: Direkte Photoimmobilisierung von olefinfunktionalisiertem N-Ras¹⁻¹⁸¹ auf einer thiofunktionalisierten PAMAM-SiO_x/Si-Oberfläche. a) MIC- und olefinfunktionalisiertes Peptid **35** zur Herstellung von olefinfunktionalisiertem N-Ras¹⁻¹⁸¹. b) Arbeitsablauf zur Herstellung von olefinfunktionalisiertem N-Ras¹⁻¹⁸¹ (N-Ras-Olefin) über MIC-Ligation. c) Arbeitsablauf der direkten Photoimmobilisierung von N-Ras-Olefin. d) Fluoreszenzaufnahme der Oberfläche mit mikrostrukturiertem N-Ras-Olefin nach Nachweis mit Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper. e) Intensitätshistogramm des Querschnitts (weiße Linie) in d).

3. Allgemeiner Teil

Um die in Abschnitt 3.5.1 erwähnten Vorteile der direkten Thiol-En-Photomikrostrukturierung nutzen zu können wurde parallel zur indirekten Immobilisierung biotinylierter Proteine die direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung olefinfunktionalisierter Proteine untersucht.

Für einen Vorversuch wurde mittels einer MIC-Ligation des maleimid- und olefinfunktionalisierten Peptids **35** an N-Ras¹⁻¹⁸¹ olefinfunktionalisiertes N-Ras¹⁻¹⁸¹ erhalten (Abbildung 31a und 31b). Immobilisierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Olefin erfolgte durch Drop-Casting auf eine thiol-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si-Oberfläche gefolgt von zehnminütiger UV-Bestrahlung bei 365 nm. Immobilisiertes N-Ras wurde mit fluoreszenzmarkiertem anti-Ras-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 31c bis 31e). Die erhaltene Fluoreszenzaufnahme zeigt nur schwache Mikrostrukturen, so dass die direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung olefinfunktionalisierter Proteine mit dieser Strategie nicht als aussichtsreich eingeschätzt und nicht weiter verfolgt wurde.

3.5.5 Direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung farnesylierter Proteine: H-RasFar, N-RasFar und K-Ras4BFar

Die direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von farnesyliertem Ras wurde parallel zur Immobilisierung des olefinfunktionalisierten Ras untersucht. Der Farnesylrest ist ein natürlicher, ungesättigter Lipidanker mit drei Doppelbindungen, der der stabilen Verankerung von Ras in der Zellmembran dient, die für die Funktionsfähigkeit des Proteins in der Zelle notwendig ist (Abbildung 32).^[84]

In vivo erfolgt die Farnesylierung von Zielproteinen durch das Enzym Farnesyltransferase (FTase). Diese erkennt eine C-terminale Sequenz aus vier Aminosäuren, die sogenannte CAAX-Box, und überträgt mit Hilfe von Farnesylpyrophosphat (Fpp) als Substrat einen Farnesylrest

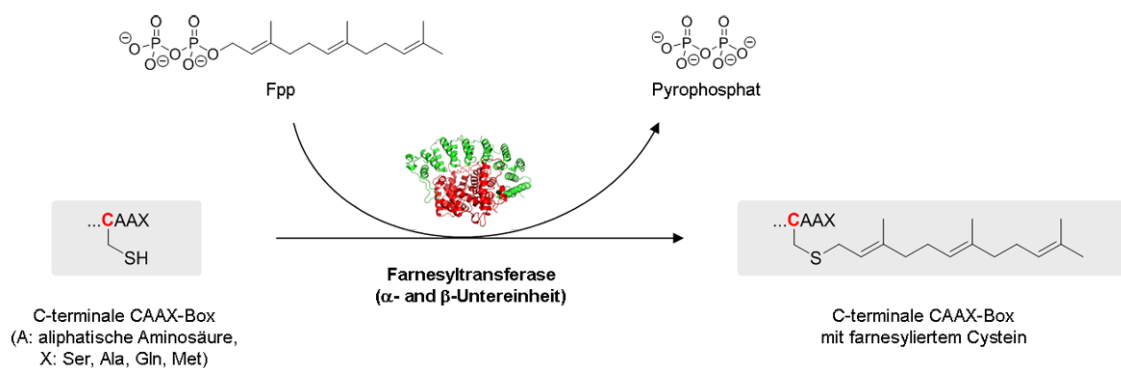


Abbildung 32: Farnesylierung der C-terminalen CAAX-Box mit Farnesyltransferase (FTase). FTase besteht aus zwei Untereinheiten und nutzt Farnesylpyrophosphat (Fpp) zur Übertragung des Farnesylrestes auf den Cysteinrest der CAAX-Box, das FTase-Erkennungsmotiv.

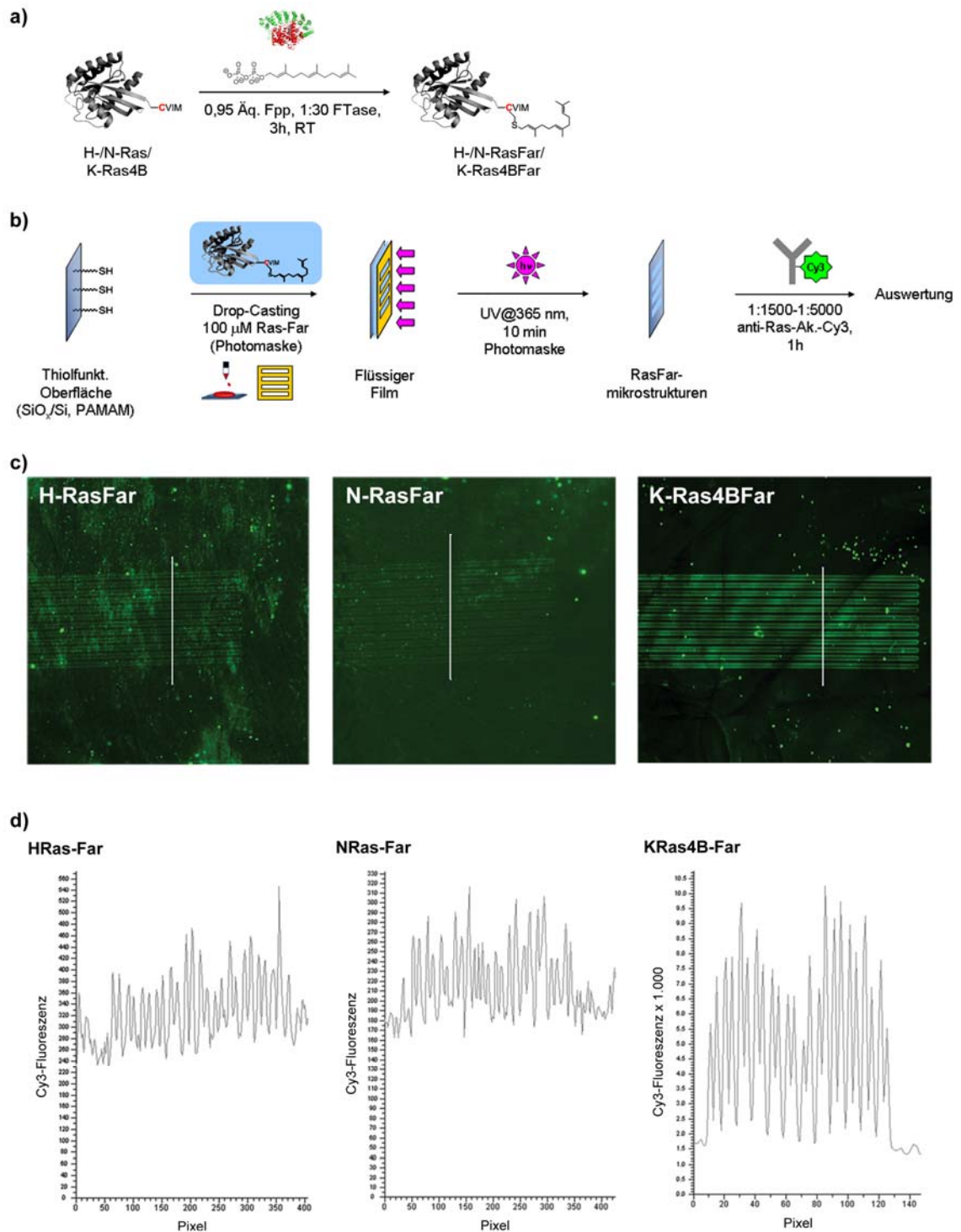


Abbildung 33: Direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung der drei farnesylierten Rasisoformen H-RasFar, N-RasFar und K-Ras4BFar. a) Arbeitsablauf der Farnesylierung mit FTase und Fpp *in vitro*. b) Arbeitsablauf der Mikrostrukturierung. RasFar wird mittels Drop-Casting auf eine thiolfunktionalisierte PAMAM-PECVD-SiO_x/Si-Oberfläche gebracht und zehn Minuten UV-Licht bei 365 nm ausgesetzt. Nachweis von immobilisiertem Ras erfolgte mit Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper. c) Fluoreszenzaufnahmen der erhaltenen Mikrostrukturen. d) Intensitätshistogramme der Querschnitte (weiße Linien) aus c).

3. Allgemeiner Teil

auf die Cysteinseitenkette der CAAX-Box.^[85] Die Verwendung des Farnesylrestes zur Immobilisierung von Proteinen mit der Thiol-En-Reaktion wäre von Vorteil, da dieser über die FTase in Proteine eingeführt werden kann, so dass chemische Methoden zur Einführung von Olefinen in Proteine entfallen könnten. In vergleichbaren Ansätzen wurden kürzlich Analoga des Farnesylrestes zur Immobilisierung von Proteinen mit der Huisgen [3+2]-Cycloaddition sowie der Staudinger-Ligation verwendet.^[25, 26] Ferner ist von *E.coli* endogen erzeugtes Fpp als Farnesylquelle für die der Thiol-En-Photoimmobilisierung vorausgehenden Proteinfarnesylierung denkbar, so dass die vollständig modifikationsfreie Herstellung eines farnesylierten Proteins ausschließlich mit molekularbiologischen Methoden denkbar wäre.

H-Ras, N-Ras und K-Ras4B, drei der vier Isoformen der kleinen GTPase Ras, wurden unter Verwendung von FTase und Fpp nach bekannten Protokollen *in vitro* farnesyliert,^[86] um H-RasFar, N-RasFar und K-Ras4B-Far zu erhalten (Abbildung 33a). Kontrolle der Farnesylierung erfolgte mittels MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption ionisation, matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation). Die farnesylierten Ras-Isoformen wurden nachfolgend mit Drop-Casting auf je eine thiol-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si-Oberfläche aufgebracht und zehn Minuten mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Detektion der immobilisierten Ras-Proteine erfolgte mit dem fluoreszenzmarkierten anti-Ras-Antikörper. Der gesamte Prozess sowie die Ergebnisse sind in den Abbildungen 33b bis 33d dargestellt. Unerwarteterweise zeigten die farnesylierten Ras-Isoformen ein stark unterschiedliches Immobilisierungsverhalten. K-Ras4BFar ergab deutlich erkennbare Mikrostrukturen, während im Fall von N-RasFar und H-RasFar Mikrostrukturen mit einer um den Faktor 20 bis 30 niedrigeren Fluoreszenzintensität erhalten wurden. Dieser Unterschied wird im folgenden Abschnitt näher beleuchtet.

3.5.6 Die K-Ras-Hypothese

Da der Proteinkern der drei verwendeten Ras-Isoformen H-Ras, N-Ras und K-Ras4B sehr ähnlich ist, sind die beobachteten Unterschiede in der Thiol-En-Photomikrostrukturierung der drei farnesylierten Isoformen nur durch deren unterschiedliche C-Termini zu erklären. K-Ras besitzt einen polybasischen, lysinreichen C-Terminus, während die C-Termini von N-Ras und H-Ras ungeladen bis schwach azide sind (Abbildung 34b). Da die Thiolfunktionalisierung der für die Thiol-En-Photoimmobilisierung verwendeten, PAMAM-funktionalisierten Oberflächen über Carbonsäuren als Intermediate verläuft (Abbildung 34a, oben links), könnte eine unvollständige Funktionalisierungsreaktion, beispielsweise durch schwer erreichbare Säurefunktionen, zu einer negativ geladenen Oberfläche führen. Ionische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Oberfläche und dem positiv geladenen C-Terminus von K-Ras (KRT, K-Ras-C-Terminus) könnten dann Anlagerung von K-Ras an die Oberfläche und Vororientierung von Oberflächenthiolegruppen und Farnesylrest zur Folge haben, die die

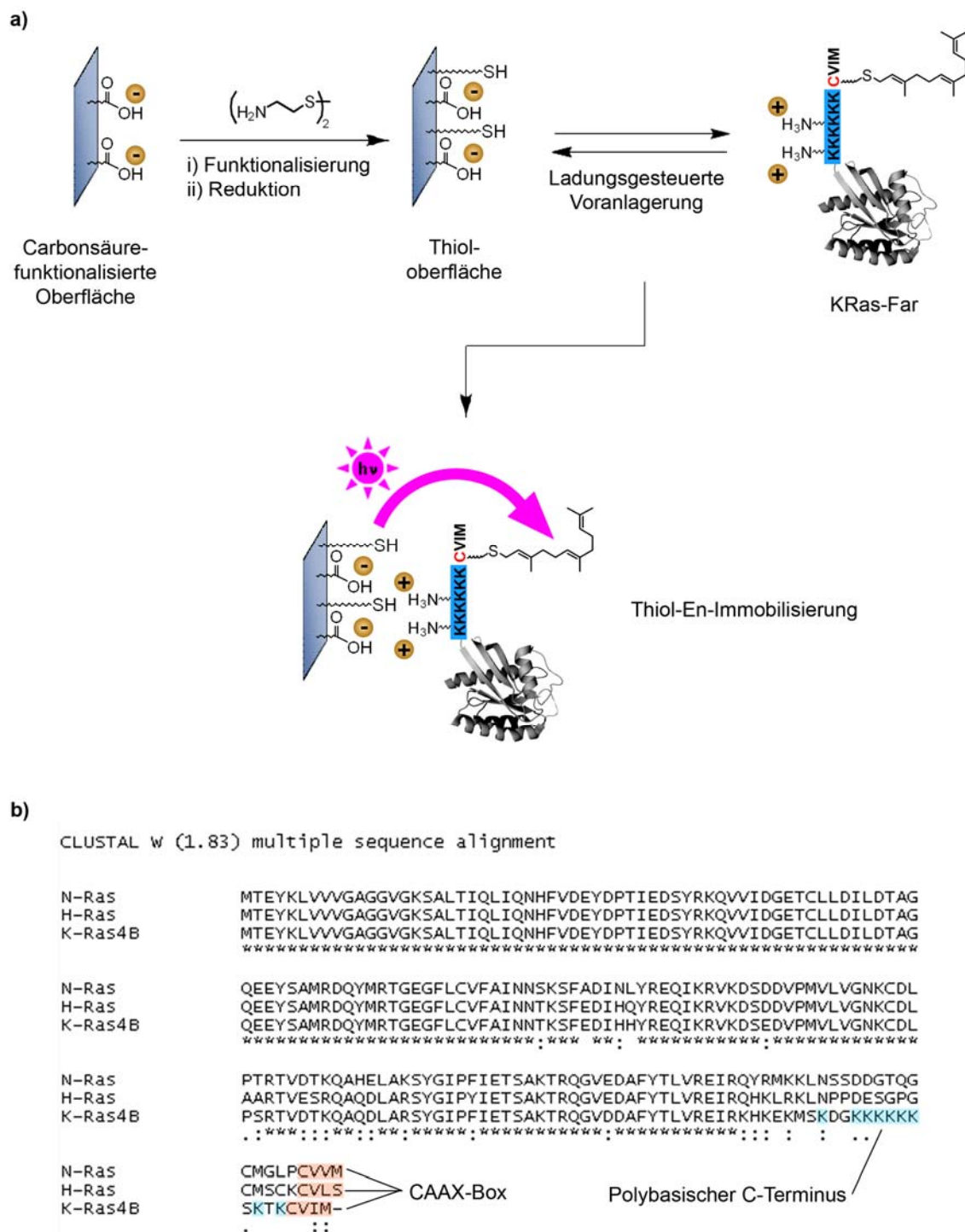


Abbildung 34: Die K-Ras-C-Terminus-Hypothese (KRT-Hypothese). a) Durch Ladungsinteraktionen begünstigte Thiol-En-Photoimmobilisierung von K-Ras4B-Far. b) Vergleich von H-Ras, N-Ras und K-Ras4B. Der Proteinkern der drei Isoformen ist hochkonserviert, die C-Termini sind jedoch unterschiedlich. K-Ras4B trägt einen polybasischen C-Terminus mit neun Lysinseitenketten, während die Termini von H-Ras und N-Ras aufgrund von Aspartat- und Glutamatseitenketten schwach negativ geladen sind.

3. Allgemeiner Teil

nachfolgende Thiol-En-Reaktion durch eine erhöhte lokale Konzentration beschleunigen könnte (Abbildung 34a, oben rechts). Da H-Ras und N-Ras keinen polybasischen C-Terminus besitzen, könnte in diesem Fall Nähe zwischen Thiolgruppen an der Oberfläche und dem Farnesylrest des Proteins nur durch Diffusion erzeugt werden bzw. würde sie durch den schwach aziden C-Terminus und daraus resultierende Abstoßungseffekte zur Oberfläche ggf. sogar erschwert.

Die postulierte Interaktion des KRT mit den verwendeten thioleffunktionalisierten Oberflächen deckt sich mit der natürlichen Funktion des KRT, die vermutlich ebenfalls auf Ladungsinteraktion basiert. Es wird angenommen, dass der polybasische C-Terminus der stabilen Verankerung von farnesyliertem K-Ras in der Zellmembran von Säugerzellen dient, die aufgrund der Lipidphosphatgruppen negativ geladen ist,^[87] während die neutral bis schwach aziden C-Termini von H-RasFar und N-RasFar für stabile Verankerung in der Zellmembran einen weiteren Lipidrest, den Palmitoylanker, benötigen.^[88]

Ein erster Vorteil der Verwendung des KRT im Rahmen der Thiol-En-Proteinimmobilisierung wäre eine potentielle Beschleunigung der Immobilisierungsreaktion aufgrund der ladungsinduzierten Vororientierung. Ein zweiter Vorteil des KRT wäre eine potentiell hohe Selektivität gegenüber nicht-KRT-modifizierten Proteinen, die selektive Immobilisierung KRT-modifizierter Proteine in Gegenwart nicht-KRT-modifizierter Proteine ermöglichen könnte. Ein dritter Vorteil wäre leichte genetische Kodierbarkeit mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. Ein zu immobilisierendes Protein könnte bereits KRT-modifiziert exprimiert werden, so dass eine zeitaufwändige chemische Funktionalisierung entfallen könnte. Diese Aspekte werden in den folgenden Teilen dieser Arbeit näher untersucht. Zuvor erfolgte eine Untersuchung der Reaktivität des Farnesylrestes in der Thiol-En-Reaktion in Lösung, um die Reaktivität der einzelnen Doppelbindungen der Farnesyilkette zu überprüfen.

3.5.7 Reaktivität des Farnesylrestes in der Thiol-En-Reaktion in Lösung

Um die Reaktivität des Farnesylrestes zu untersuchen, wurde mit der farnesylierten Aminosäure H-Cys(Far)-OMe (**36**) eine Thiol-En-Reaktion in Lösung durchgeführt (erhalten von Kristina Görmer, AG Waldmann, MPI Dortmund, Abbildung 35). **36** wurde mit zehn Äquivalenten Butan-1-thiol in einer Konzentration von 1 M in DMF gelöst und mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Reaktionskontrolle erfolgte mittels HPLC-MS (high-performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie). Nach vier Tagen Reaktionszeit war ein Umsatz von ca. 60 % erreicht, und die Reaktion wurde abgebrochen. Mittels HPLC-MS wurden Edukt **36** sowie ein Butanthiolmonoaddukt identifiziert und mit präparativer HPLC-MS isoliert. Da für den Angriff des Butan-1-thiols aufgrund der im Farnesylrest vorliegenden drei Doppelbindungen drei Möglichkeiten bestanden (**37a**, **37b** und **37c**, Abbildung 36), wurde das erhaltene Monoaddukt mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

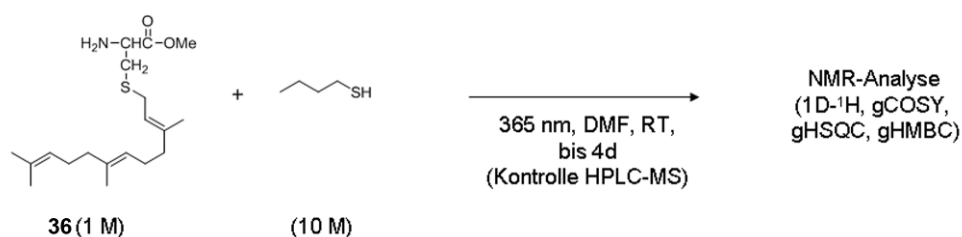


Abbildung 35: Kontrollexperiment zur Reaktivität des Farnesylrestes. H-Cys(Far)-OMe (**36**) und zehn Äquivalente Butan-1-thiol wurden in Lösung mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Reaktionskontrolle erfolgte mit HPLC-MS. Nach vier Tagen wurde die Reaktion abgebrochen und das Reaktionsprodukt mittels präparativer HPLC-MS isoliert. Auswertung erfolgte mit ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie.

untersucht (¹H-NMR, gCOSY, gHSQC, gHMBC). Obwohl aufgrund der Komplexität der Spektren keine vollständige Zuordnung aller Signale möglich war, konnte das Reaktionsprodukt, wie in den Abbildungen 36 und 37 dargestellt, aufgrund charakteristischer Signale als ein Gemisch der Verbindungen **37a** und **37b** identifiziert werden. Die Kombination der im gHMBC-Spektrum in Abbildung 36 markierten Kreuzpeaks zwischen olefinischen Methylprotonen und olefinischen Kohlenstoffatomen des Farnesylrestes wies auf das Vorhandensein aller drei Doppelbindungen im Produktgemisch hin, so dass ein einzelnes Reaktionsprodukt ausgeschlossen werden konnte. Im gHSQC-Spektrum in Abbildung 37 wurden charakteristische Kreuzpeaks zwischen Proton und Kohlenstoffatom der dem Schwefelatom des Butanthiols benachbarten, äquivalenten CH-Gruppen der Verbindungen **37a** und **37b** nachgewiesen, nicht jedoch die der CH-Gruppe der Verbindung **37c**, so dass diese als Reaktionsprodukt ausgeschlossen werden konnte. Die Thiol-En-Reaktion zwischen H-Cys(Far)-OMe und Butan-1-thiol verlief daher über die beiden terminal gelegenen Doppelbindungen des Farnesylrestes. Die sehr niedrige Reaktionsgeschwindigkeit, die zu einem Umsatz von nur ca. 60 % nach vier Tagen Bestrahlungszeit führt, ist vermutlich mit der starken sterischen Hinderung der hochsubstituierten Farnesyldoppelbindungen zu erklären, und deckt sich mit den in Abschnitt 3.1 erhaltenen Ergebnissen für das Verhalten sterisch anspruchsvoller Olefine bei der Thiol-En-Reaktion in Lösung.

Für die Thiol-En-Photoimmobilisierung farnesylierter Proteine wurden typischerweise Proteinkonzentrationen im Bereich um 100 µM verwendet, da diese für Proteine im Größenbereich von Ras als typische Endkonzentrationen nach Proteinexpression und Aufreinigung erhalten wurden, während im Kontrollexperiment für **36** eine Konzentration von 1 M zum Einsatz kam. Im Fall farnesylierter Proteine ist daher aufgrund des um den Faktor 10000 niedrigeren Konzentrationsbereichs eine weit geringere Reaktionsgeschwindigkeit für die

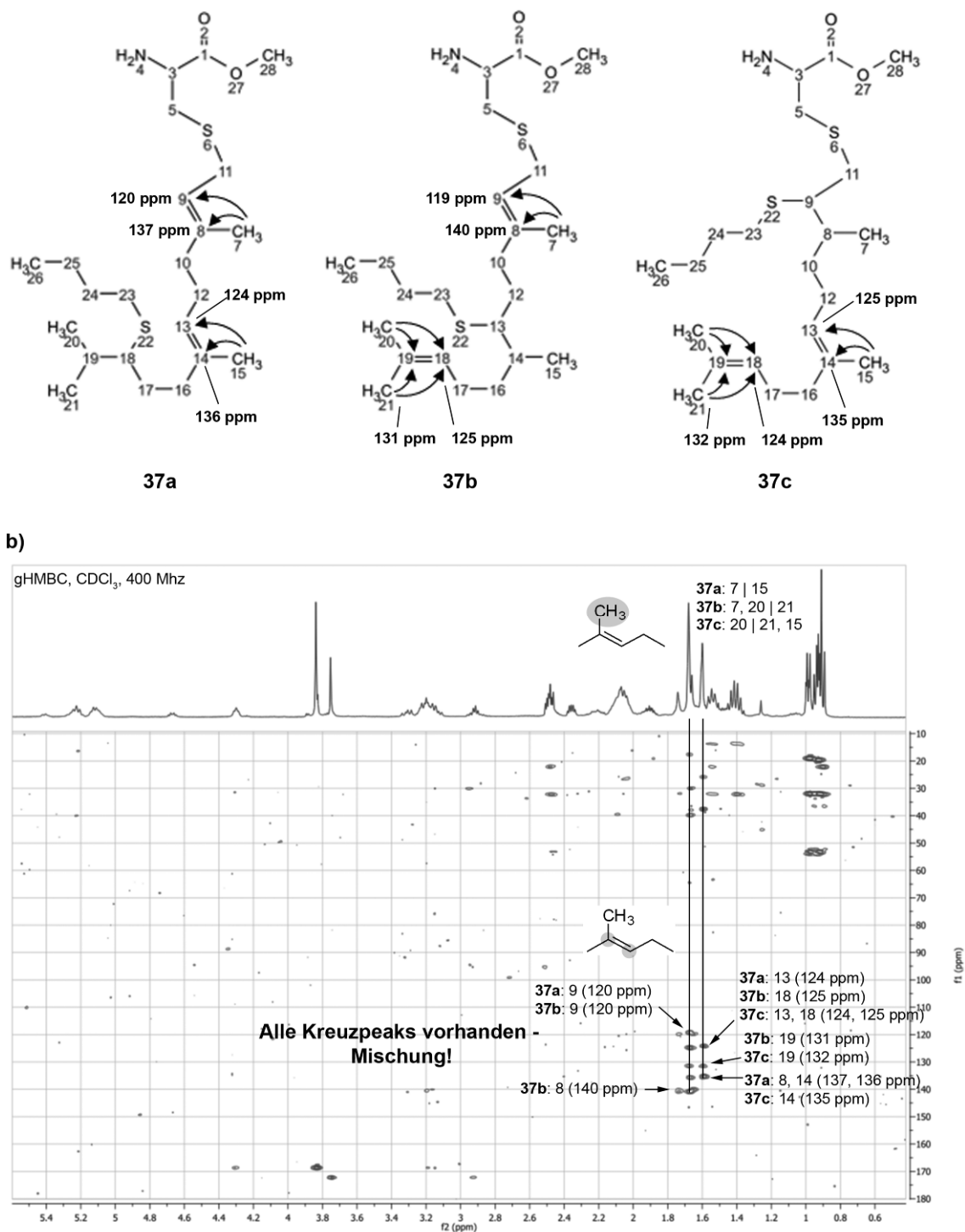


Abbildung 36: NMR-Auswertung des Kontrollexperiments – gHMBC. a) Die drei möglichen Monoaddukte **37a-37c** der Reaktion in Lösung. Markiert sind berechnete chemische Verschiebungen der olefinischen Kohlenstoffatome (Inkrementensystem). Bisaddukte wurden durch HPLC-MS ausgeschlossen. b) gHMBC-NMR-Spektrum des Reaktionsprodukts. Markiert sind Kreuzkupplungen zwischen olefinischen Methylprotonen und den jeweils zwei olefinischen Kohlenstoffatomen.

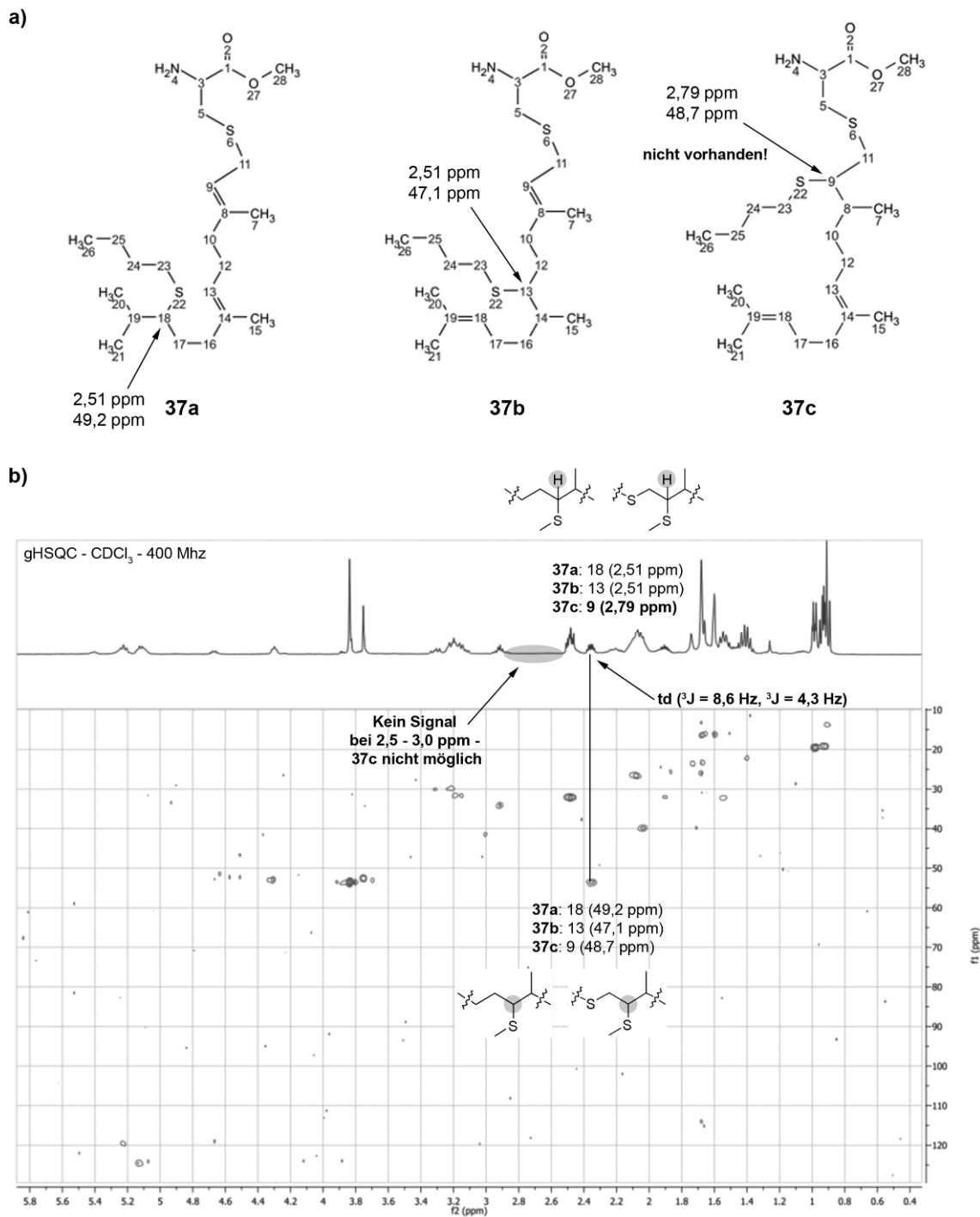


Abbildung 37: NMR-Auswertung des Kontrollexperimentes – gHSQC. a) Mögliche Reaktionsprodukte. In den drei Verbindungen **37a-37c** ist jeweils das Kohlenstoffatom markiert, über das Butan-1-thiol gebunden werden könnte. Angegeben sind die berechneten chemischen Verschiebungen für Proton und Kohlenstoffatom (Inkrementensystem). b) gHSQC-NMR-Spektrum des Reaktionsprodukts. Das gekennzeichnete Multiplett (Triplet vom Dublett, td) entspricht den markierten Zentren in a). Für eine erwartete chemische Verschiebung von 2,79 ppm der markierten CH-Gruppe in **37c** wurde kein Multiplett detektiert.

3. Allgemeiner Teil

Thiol-En-Reaktion in Lösung anzunehmen, so dass das Risiko intermolekularer Nebenreaktionen des Farnesylrestes z.B. mit Cysteinresten anderer Proteine oder thiolbasierten Reagenzien, wie z.B. DTT, als gering eingeschätzt wurde. Die aufgrund der sterisch gehinderten Doppelbindungen geringe Reaktivität des Farnesylrestes gegenüber Thiolverbindungen in Lösung könnte somit zu einer erhöhten Selektivität zugunsten der Immobilisierungsreaktion führen. Die direkte Nähe zwischen Farnesylrest und Thioloberfläche aufgrund ladungsinduzierter Vororientierung würde die Thiol-En-Reaktion auf der Glasoberfläche begünstigen, die geringe Reaktivität des Farnesylrestes kompensieren und eine schnelle Immobilisierungsreaktion farnesylierter Proteine ermöglichen. In der Kombination dieser Hypothesen könnte das KRT-Farnesylsystem im Rahmen der Immobilisierung von Proteinen eine ideale Kombination für hohe Selektivität einerseits und hohe Immobilisierungsgeschwindigkeit andererseits darstellen. Ferner würde der Einsatz von Licht der KRT- und farnesylbasierten Thiol-En-Photoimmobilisierung eine hohe Flexibilität in Bezug auf die geometrische Gestaltung der zu erzeugenden Proteinoberfläche verleihen, die für die Mikrostrukturierung von Proteinen vorteilhaft wäre (siehe Abschnitt 1.5).

3.5.8 Weitere Untersuchungen zur direkten Thiol-En-Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar

Um zu überprüfen, ob die Thiol-En-Photoimmobilisierung von K-Ras4BFar tatsächlich über den Farnesylrest verlief, wurden die Thiol-En-Mikrostrukturierung von farnesyliertem K-Ras4BFar und nicht-farnesyliertem K-Ras4B verglichen. Die verwendeten Proteinproben wurden von Dr. T. T. Uyen Nguyen (AG Alexandrov, MPI Dortmund) hergestellt, während die Photomikrostrukturierung und der Nachweis immobilisierten Ras-Proteins mit einem Antikörper, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, durchgeführt wurden. Die Ergebnisse in Abbildung 38a zeigen ein erhöhtes Fluoreszenzsignal für K-Ras4B im Vergleich zu K-Ras4BFar. Dieses unerwartete Ergebnis deutete auf mögliche Nebenreaktionen zwischen K-Ras4B und der Thioloberfläche hin. Literaturbekannt sind radikalische Nebenreaktionen ausgehend von Cysteinthiylradikalen (Abbildung 39a).^[89] Da diese Reaktionen jedoch nur intramolekular oder bei hohen Reaktandenkonzentrationen beobachtet wurden, erschienen sie für eine unspezifische Proteinimmobilisierung als wenig relevant. Eine wahrscheinlichere Alternative stellte unspezifische Immobilisierung über Disulfidbrücken zwischen dem Cysteinrest der CAAX-Box und der Thioloberfläche dar (Abbildung 39b). Disulfide waren in Thiol-En-Reaktionen als Nebenprodukte nachgewiesen worden.^[56]

Mit Hilfe der Reduktionsmittel DTE und TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) wurde versucht die Bildung von Disulfidbrücken zu unterdrücken bzw. umzukehren. Ferner wurde

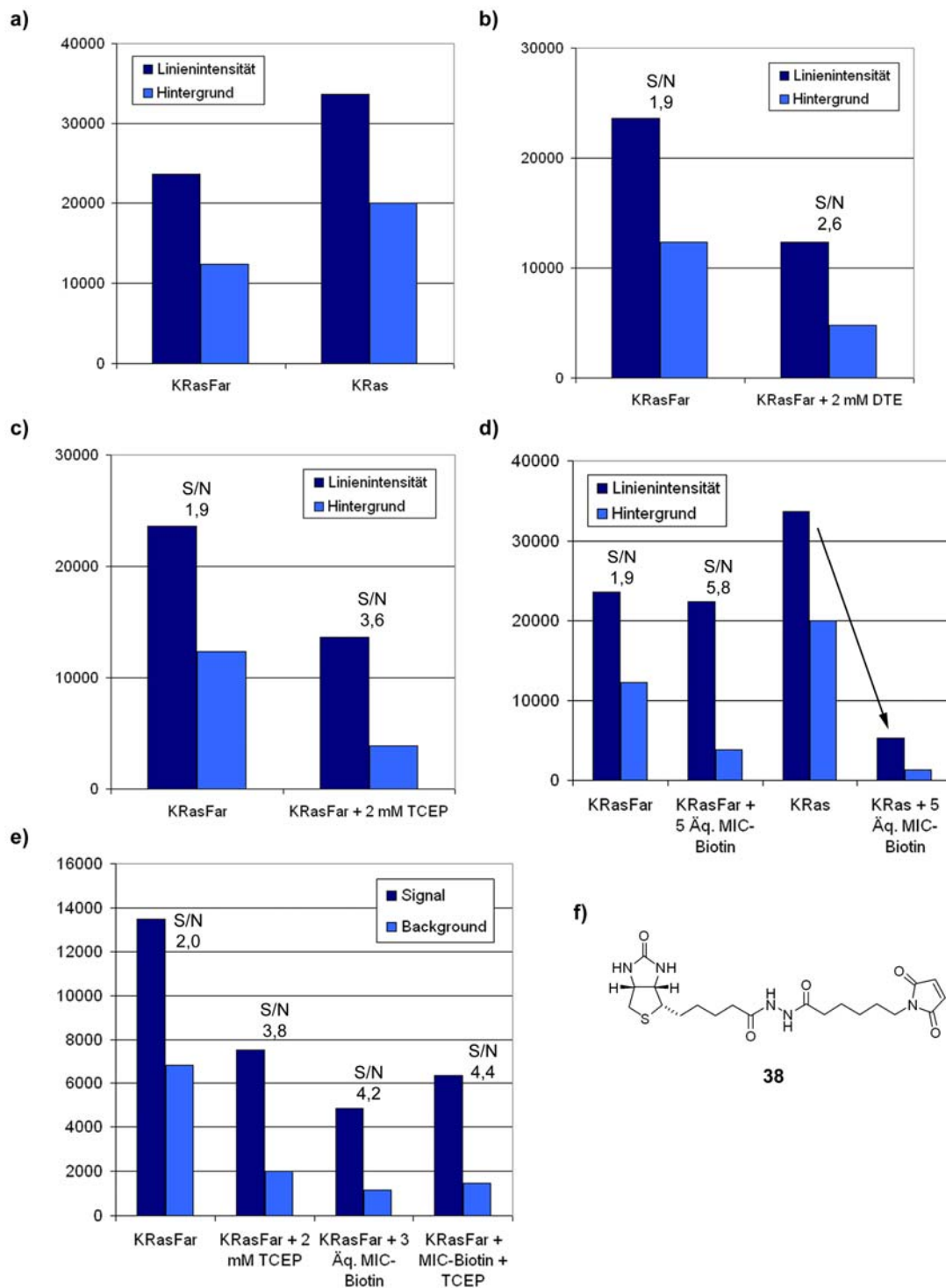


Abbildung 38: Thiol-En-Photomikrostrukturierung von K-Ras4B. Linienintensität bezeichnet die gemittelte maximale Fluoreszenzintensität der erhaltenen Linienstrukturen, während Hintergrund die Fluoreszenzintensität zwischen den Linienstrukturen, d.h. unbestrahlte Bereiche auf der Oberfläche, bezeichnet. a) Vergleich der Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar und K-Ras4B. b) Vergleich der Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar mit und ohne DTE. c) Vergleich der Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar mit und ohne TCEP. d) Vergleich von K-Ras4BFar und K-Ras4B mit und ohne MIC-Biotin. e) Vergleich von K-Ras4BFar bei Zugabe von TCEP, MIC-Biotin oder einer Kombination von TCEP und MIC-Biotin. f) Struktur von MIC-Biotin (38).

3. Allgemeiner Teil

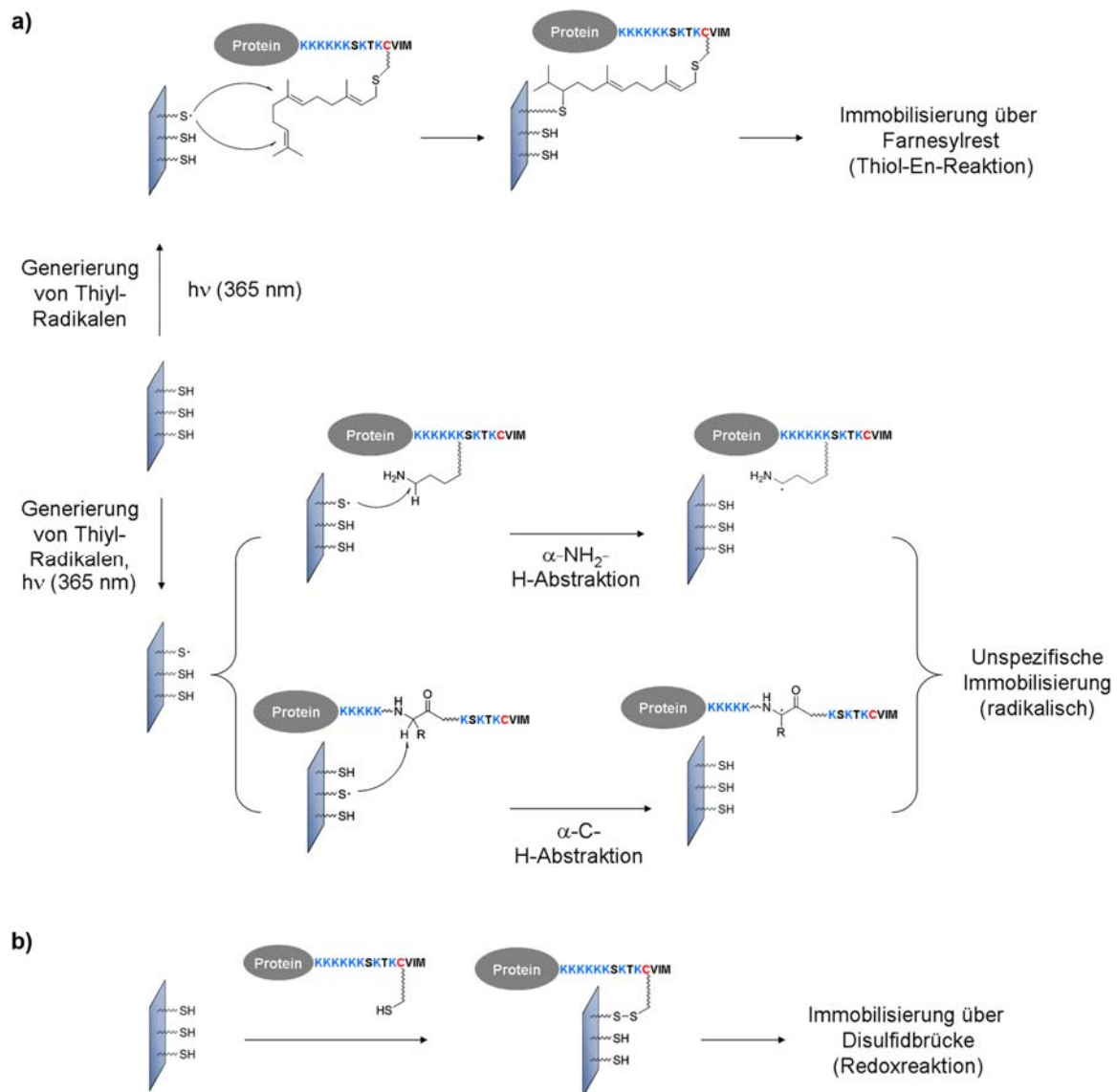


Abbildung 39: Möglichkeiten der Thiol-En-Photoimmobilisierung von K-Ras4BFar und K-Ras4B. a) Die Immobilisierung von K-Ras4BFar erfolgt über Angriff eines Thiolradikals auf eine Doppelbindung des Farnesylrests (oben). Nicht-farnesyliertes K-Ras4B könnte in Folge der radikalischen Abstraktion eines α -Protons unspezifisch immobilisiert werden (unten). b) Wahrscheinlicher ist die unspezifische Immobilisierung von K-Ras4B über Disulfidbrückenbildung.

maleimidfunktionalisiertes Biotin (MIC-Biotin) **38** eingesetzt, um die Cysteinseitenkette der CAAX-Box in K-Ras4B zu blockieren und auf diese Weise die Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Abbildungen 38b bis 38e dargestellt. Zusatz von 2 mM DTT oder 2 mM TCEP hatte keinen Einfluss auf die unspezifische Immobilisierung von K-Ras4B, jedoch wurde dieser Umstand auf zu niedrige Reduktionsmittelkonzentration zurückgeführt. Höhere Reduktionsmittelkonzentrationen führten in Abschnitt 3.7.2.3 zur starken Reduzierung der unspezifischen Immobilisierung nicht-farnesylierter KRT-modifizierter Proteine. Durch Blockierung des freien Cysteins mit **38** wurde die unspezifische Immobilisierung ebenfalls um etwa 80 % reduziert. Diese Beobachtungen

deuten auf die Validität der Disulfidhypothese hin.

Das S/N-Verhältnis der Thiol-En-Photomikrostrukturierung des farnesylierten Proteins, K-Ras4BFar, konnte durch den Einsatz von Reduktionsmitteln und **38** um 50 % bis 100 % verbessert werden (Abbildungen 38a bis 38e). Eine eindeutige Erklärung für diesen Effekt konnte bislang nicht gefunden werden, da das Cystein der CAAX-Box durch den Farnesylrest blockiert ist. TCEP und DTE könnten zur Reduktion von im Rahmen der Thiol-En-Reaktion gebildeten Oberflächendisulfidbrücken führen und die Oberfläche auf diese Weise für erneute Proteinimmobilisierung regenerieren. Eine andere Erklärung wäre die Ausbildung von Disulfidbrücken über Cysteinseitenketten außerhalb der CAAX-Box. Aufgrund des positiven Einflusses auf das S/N-Verhältnis kamen Reduktionsmittel in allen nachfolgenden Untersuchungen zur Photoimmobilisierung farnesylierter Proteine zum Einsatz.

3.5.9 Zusammenfassung

Sowohl die indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung biotinylierter Proteine unter Ausnutzung des Biotin-Streptavidin-Systems, als auch die direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung farnesylierter Proteine konnte erfolgreich demonstriert werden. Biotinylierte CIAP und biotinyliertes N-Ras¹⁻¹⁸¹ wurden indirekt immobilisiert und mit Antikörpern nachgewiesen. CIAP zeigte ferner enzymatische Aktivität auf der Chipoberfläche, während im Fall von N-Ras¹⁻¹⁸¹ in einem Protein-Interaktionsexperiment die Unterscheidung von GDP- und GppNHp-gebundenem, d.h. inaktivem und aktivem, Protein mit der YFP-konjugierten RBD von cRaf1 gelang. Die direkte Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Proteinen verlief nur mit K-Ras4BFar erfolgreich, während sowohl mit olefinfunktionalisiertem N-Ras¹⁻¹⁸¹, als auch mit H-RasFar und N-RasFar kaum detektierbare Mikrostrukturen erhalten wurden. Diese Beobachtung führte zur K-Ras-Hypothese, die den polybasischen C-Terminus von K-Ras für den Unterschied zwischen den drei Ras-Isoformen verantwortlich macht. Die Untersuchung der K-Ras-Hypothese wird in den nachfolgenden Teilen dieser Arbeit fortgesetzt. Das S/N-Verhältnis der Mikrostrukturen von K-Ras4BFar konnte durch Zugabe der Reduktionsmittel DTT und TCEP verbessert werden. Ferner zeigte ein Lösungsexperiment, dass der Farnesylrest nur an den beiden terminal gelegenen Doppelbindungen reagiert. Die trotz hoher Konzentration von 1 M langsame Reaktionsgeschwindigkeit wies daraufhin, dass intermolekulare Nebenreaktionen zwischen dem Farnesylrest und Thiolen in Lösung im Fall farnesylierter Proteine, die in einem 10000fach geringeren Konzentrationsbereich eingesetzt werden, vermutlich keine Rolle spielen.

Weitere Experimente zur Immobilisierung farnesylierter Proteine wurden im Mikroarrayformat durchgeführt. Auf diese Weise war der gleichzeitige Vergleich einer Vielzahl von Parametern, wie z.B. der Konzentration, oder die gleichzeitige Verwendung mehrerer Proteine möglich.

3.6 Proteinmikroarrays

3.6.1 Herstellung eines N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin-Mikroarrays durch indirekte Thiol-En-Photoimmobilisierung

Die Herstellung von Proteinmikroarrays mittels indirekter Thiol-En-Photoimmobilisierung wurde analog zu den oben beschriebenen Mikrostrukturierungsexperimenten mit biotinyliertem N-Ras¹⁻¹⁸¹ (siehe Abschnitt 3.5.3) untersucht (Abbildung 40). Die olefinfunktionalisierte Biotinverbindung **19** wurde in vier Konzentrationen (0,1 mM bis 50 mM) auf einen thiol-PAMAM-funktionalisierten Glasobjektträger gespottet und durch zehnmütige UV-Bestrahlung bei 365 nm immobilisiert. Nach Waschen und Blocken der Oberfläche wurde zunächst Streptavidin, dann biotinyliertes N-Ras¹⁻¹⁸¹ immobilisiert, das nachfolgend mit Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper detektiert wurde. Abbildung 40b zeigt die Fluoreszenzaufnahme, die erfolgreiche indirekte Immobilisierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin auf dem Biotinmikroarray demonstriert. Die Herstellung von Proteinmikroarrays über indirekte Thiol-En-Photoimmobilisierung ist somit möglich. Nachteil dieser Strategie ist, dass nicht mehr als ein Protein gleichzeitig immobilisiert werden kann, da die Biotin-Streptavidin-Interaktion nicht selektiv ist. Parallele Immobilisierung verschiedener Proteine wäre z.B. nur durch gezieltes Spotten einzelner biotinylierter Proteine auf Biotin-Streptavidin-Spots möglich. Aus diesem Grund wurde die Herstellung von Proteinmikroarrays mit dieser Strategie nicht weiter verfolgt.

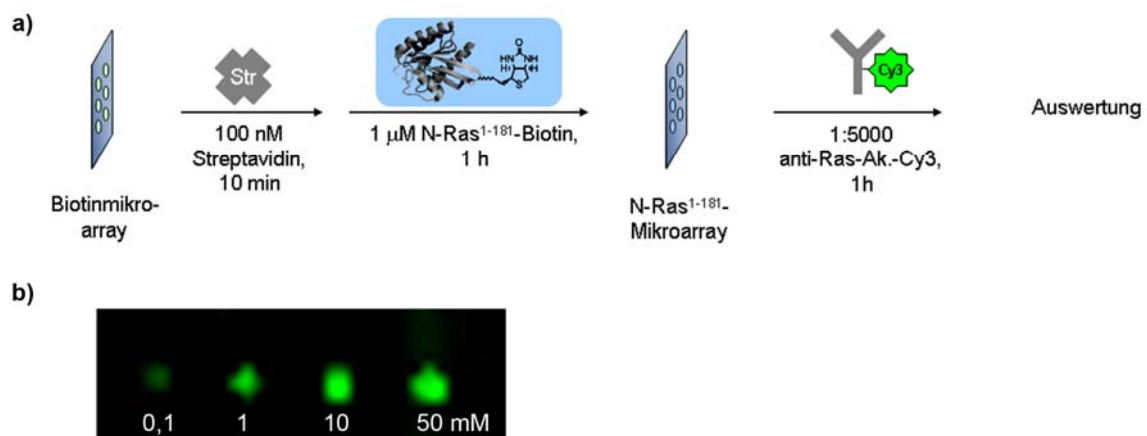


Abbildung 40: Mikroarray von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin, hergestellt durch indirekte Thiol-En-Photoimmobilisierung (Biotin-Streptavidin-System). a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrays. Gezeigt sind die Konzentrationswerte der photoimmobilisierten Biotinverbindung **19**, auf der N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin indirekt immobilisiert wurde.

3.6.2 Der optimale KRT: Herstellung ligierter N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Proteine

Obwohl sich die Kombination aus Farnesylrest und KRT als entscheidend für die direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung von Proteinen herausgestellt hatte (siehe Abschnitt 3.5.6), war nicht bekannt, wieviele Lysinreste für die Immobilisierungsreaktion notwendig bzw. optimal waren. Es wurden daher vier dem K-Ras-C-Terminus ähnliche C-Termini mit unterschiedlich langen Polylysinsequenzen in der Thiol-En-Photoimmobilisierung untersucht.

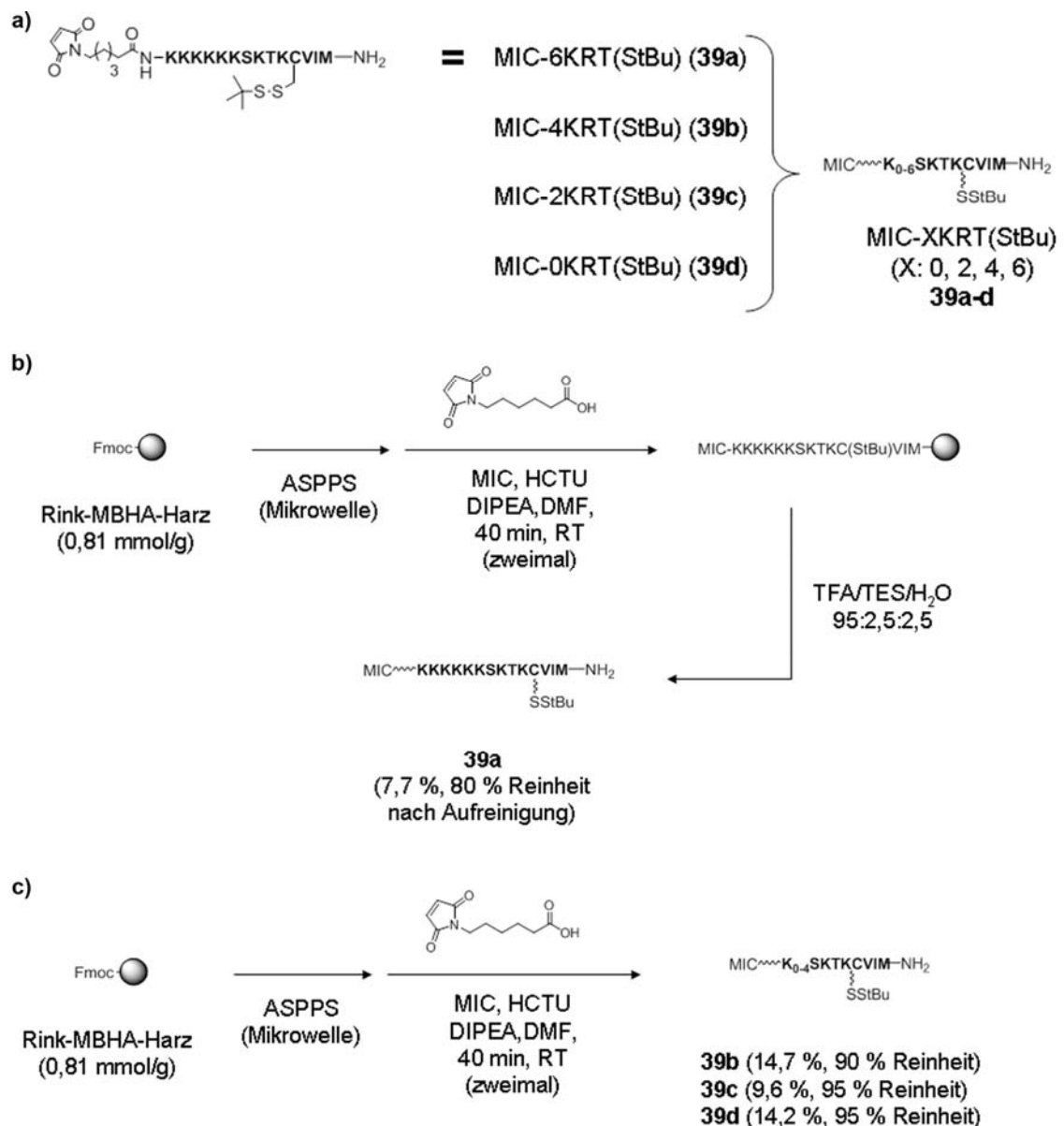


Abbildung 41: Synthese der MIC-XKRT-Peptide a) Verschiedene MIC-XKRT-Peptide **39a-d** (X: 0, 2, 4, 6). b) Erfolgreiche Synthese von **39a** mittels mikrowellengestützter ASPPS. c) Synthese der Peptide **39b-d**.

3. Allgemeiner Teil

Verschiedene KRT-Varianten wurden durch automatisierte Peptidfestphasensynthese (ASPPS) entsprechender Peptide zugänglich (Abbildung 41a). Das Peptid **39a** mit einer zum K-Ras-C-Terminus analogen Hexalysinsequenz wurde mittels mikrowellengestützter ASPPS erfolgreich synthetisiert, während konventionelle ASPPS scheiterte (Abbildungen 41b). Als Grund für diesen Umstand wurde die sterische Hinderung der Boc-Schutzgruppen der geschützten Lysine in der Hexalysinsequenz vermutet, da im Fall der konventionellen ASPPS zahlreiche Abbruchprodukte identifiziert wurden. Das im Peptid enthaltene Cystein wurde mit einer Disulfidschutzgruppe eingeführt, um zum einen eine Nebenreaktion mit der MIC-Gruppe nach der Abspaltung zu verhindern und zum anderen eine möglichst milde Entschützung der Cysteinseitenkette nach Ligation des Peptids an N-Ras¹⁻¹⁸¹ zu ermöglichen (Abbildung 42a). Analog dazu wurden modifizierte K-Ras-C-Termini mit Polylysinsequenzen aus zwei und vier Lysinen sowie ohne Polylysinsequenz synthetisiert (Peptide **39b-d**, Abbildung 41c).

MIC-Ligation an N-Ras¹⁻¹⁸¹ erfolgte mit einem Äquivalent Peptid in reduktionsmittelfreiem Puffer und wurde mittels MALDI-MS kontrolliert (Abbildung 42a). Nach Beendigung der Ligationsreaktion erfolgte die Abspaltung der StBu-Schutzgruppe durch Zugabe von 5 mM DTT. Die *in-vitro*-Farnesylierung folgte etablierten Protokollen.^[86] 0,95 Äquivalente Fpp wurden als Substrat eingesetzt, um vollständigen Verbrauch von Fpp zu garantieren und so eine Aufreinigung des farnesylierten Proteins vermeiden zu können, da diese zu Verlusten führen konnte. Erhalten wurden die vier KRT-modifizierten und farnesylierten Proteine N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar (X: 0, 2, 4, 6, Abbildung 42a).

3.6.3 Direkte Thiol-En-Immobilisierung KRT-modifizierter N-Ras¹⁻¹⁸¹-Varianten im Mikroarray

Drei der N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Varianten (X: 2, 4, 6) wurden mit Hilfe eines Mikroarraysputters in auf thiol- und carbonsäure-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si-Objektträger gespottet. Die negative Carbonsäurefunktionalisierung wurde verwendet, um einen Vergleich zwischen Thiol-En-Photoimmobilisierung und reiner Ladungsinteraktion zu ermöglichen. Nach zehnmütiger UV-Bestrahlung bei 365 nm wurden die immobilisierten Proteine mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten anti-Ras-Antikörpers nachgewiesen. Der gesamte Arbeitsablauf sowie die quantitative Auswertung sind in den Abbildungen 42b und 42c dargestellt.

Auf der thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Oberfläche wurde für hexalysinmodifiziertes und farnesyliertes N-Ras¹⁻¹⁸¹ die höchste Fluoreszenzintensität detektiert, während für das tetra- und bislysinmodifizierte Protein eine um 50 % bzw. um 45 % niedrigere Intensität beobachtet wurde. Die Immobilisierungseffizienz stieg somit mit der Länge der Polylysinsequenz. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die mit der Lysinanzahl wachsende positive Ladung des C-Terminus und damit auf eine stärkere Ladungsinteraktion mit der Oberfläche zurückzuführen.

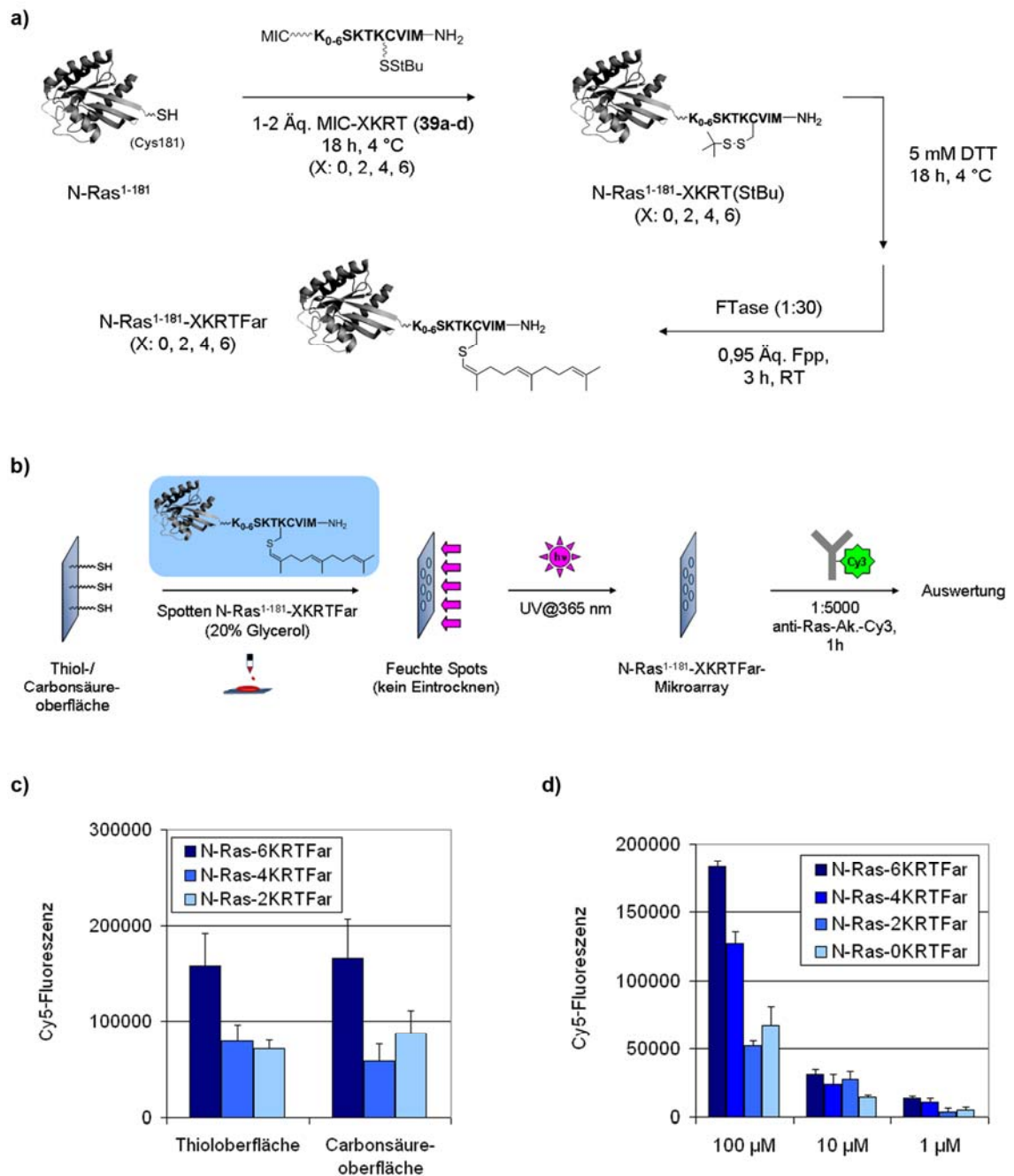


Abbildung 42: Herstellung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Mikroarrays. a) Ligation der MIC-XKRT-Peptide an N-Ras¹⁻¹⁸¹ mittels MIC-Ligation (X: 0, 2, 4, 6). Nach Entschützung und Farnesylierung mit Farnesyltransferase *in vitro* wurden die entsprechenden Varianten von N-Ras¹⁻¹⁸¹ erhalten. b) Arbeitsablauf der Mikroarrayherstellung. c) Quantitative Auswertung der Mikroarrays auf thiol- bzw. carboxylfunktionalisierten Oberflächen (100 µM Protein). d) Quantitative Auswertung eines Mikroarrays mit verschiedenen Konzentrationen von N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar (X: 0, 2, 4, 6).

3. Allgemeiner Teil

Die carbonsäure-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si -Oberfläche zeigte eine vergleichbare Tendenz. Hexalysinmodifiziertes N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar ergab die höchste, mit der thioolfunktionalisierten Oberfläche vergleichbare Fluoreszenzintensität, während die für N-Ras¹⁻¹⁸¹-4KRTFar und N-Ras¹⁻¹⁸¹-2KRTFar beobachteten Fluoreszenzintensitäten um etwa 50 % reduziert waren. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Hexalysinsequenz das Entfernen von über Ladungsinteraktion unspezifisch adsorbiertem Protein nach der Photoimmobilisierung wesentlich stärker erschwert als die Tetra- oder die Bislysinsequenz.

Die im Vergleich zu thioolfunktionalisierten Oberflächen nahezu gleich hohen Fluoreszenzintensitäten sind vermutlich durch die fehlende Thioolfunktionalisierung und die daraus resultierende wesentlich stärker ausgeprägte negative Ladung der Carbonsäureoberfläche zu erklären. Die Ladungsinteraktion zwischen KRT-modifizierten Proteinen und der Carbonsäureoberfläche ist in diesem Fall vermutlich weit stärker als im Fall der thioolfunktionalisierten Oberfläche und erschwert das Entfernen von durch Ladungsinteraktion adsorbierten N-Ras-XKRT-Far-Proteinen mittels Waschen nach der UV-Bestrahlung.

In einem Folgeexperiment wurde mit den vier N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Varianten (X: 0, 2, 4, 6) ein Mikroarray unter Verwendung verschiedener Proteinkonzentrationen generiert, um die Konzentrationsabhängigkeit der KRT-basierten Thiol-En-Immobilisierung zu untersuchen. Das erhaltene Ergebnis ist in Abbildung 42d dargestellt. Verringerung der Proteinkonzentration von 120 μM auf 12 μM führte zu einer drastischen Reduzierung der Fluoreszenzintensität um etwa 80 %, während Verringerung der Konzentration von 12 μM auf 1,2 μM zu einer weiteren Signalreduzierung um nur etwa 50 % führte. Dieses Ergebnis demonstriert, dass Proteinkonzentrationen um 100 μM am günstigsten für effektive Proteinimmobilisierung sind, da die Immobilisierungseffizienz bei geringeren Konzentrationen stark abfällt. Desweiteren wird die Signalverringerng im Fall kürzerer Polylysinsequenzen bestätigt. Der Tetralysin-basierte KRT erzielte auch in diesem Experiment eine ausreichend hohe Immobilisierungsausbeute und wurde daher als bester Kompromiss für eine ausreichend starke Ladungsinteraktion mit der Thioloberfläche bei geringer unspezifischer Adsorption bestätigt. Da die Experimente dieses Abschnitts zeitgleich zu den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen durchgeführt wurden, kamen jedoch nicht in allen nachfolgenden Beispielen die optimierte Tetralysin-, sondern auch Hexalysin-basierte KRT-Modifikationen zum Einsatz.

3.6.4 Das N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar-Mikroarray im Protein-Proteininteraktionsexperiment mit RBD-YFP

Die Bioaktivität eines N-Ras¹⁻¹⁸¹-KRTFar-Mikroarrays wurde, wie in Abschnitt 3.5.3 für biotinyliertes N-Ras¹⁻¹⁸¹ beschrieben, mit der Protein-Protein-Interaktion zwischen immobilisiertem N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar und der RBD von cRaf1 überprüft (RBD-YFP). GppNHp-gebundenes, aktives N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar wurde durch Ligation des 6KRT-Peptids an GppNHp-beladenes N-Ras¹⁻¹⁸¹ gefolgt von Entschützung der StBu-Schutzgruppe des Cysteins mit DTT und Farnesylierung *in vitro* erhalten (für Details siehe Abschnitt 3.6.3). Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 43a dargestellt. GDP- und GppNHp-beladenes N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar wurden auf einen thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger gespottet, durch zehnmütige Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm photoimmobilisiert und nachfolgend mit RBD-YFP inkubiert. Abbildung 43b zeigt die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen, Abbildung 43c deren quantitative Auswertung. Trotz der schlechten Qualität des Mikroarrays aufgrund der niedrigen Signalintensität sind die Punkte von N-Ras-6KRTFar-GppNHp in den Konzentrationen 75 µM und 25 µM deutlich erkennbar, während die Punkte von N-Ras-6KRTFar-GDP bei gleichen Konzentrationen kaum erkennbar sind.

Wie im Fall des biotinylierten N-Ras¹⁻¹⁸¹ ist die Unterscheidung der Aktivierungszustände von N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar im Mikroarray möglich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Aktivität von Proteinen auch nach einer direkten Thiol-En-Photoimmobilisierung erhalten bleibt.

3.6.5 Herstellung KRT-modifizierter Proteine mittels molekularbiologischer

Methoden

Da die Thiol-En-Photoimmobilisierung KRT-modifizierter und farnesylierter Proteine erfolgreich gezeigt worden war, wurde die Möglichkeit einer molekularbiologischen Einführung des KRT in Proteine, d.h. über Klonierung und Expression, untersucht. Diese Strategie würde die Herstellung KRT-modifizierter Proteine stark vereinfachen und beschleunigen. Nach Erstellen eines entsprechenden Expressionsplasmids wäre die Generierung großer Mengen modifizierten Proteins ohne zeitaufwändige chemische Modifizierung möglich. Ferner wäre die Einführung des KRT ausschließlich an den C-Terminus des Zielproteins möglich, während im Fall chemischer Ligungsstrategien das Risiko unselektiver Ligation an weitere reaktive Gruppen außerhalb der für die Ligation vorgesehenen Gruppe bestand (Cysteine im Fall der MIC-Ligation).

Unter Verwendung eines langen, den KRT-kodierenden Primers sollte eine PCR (polymerase

3. Allgemeiner Teil

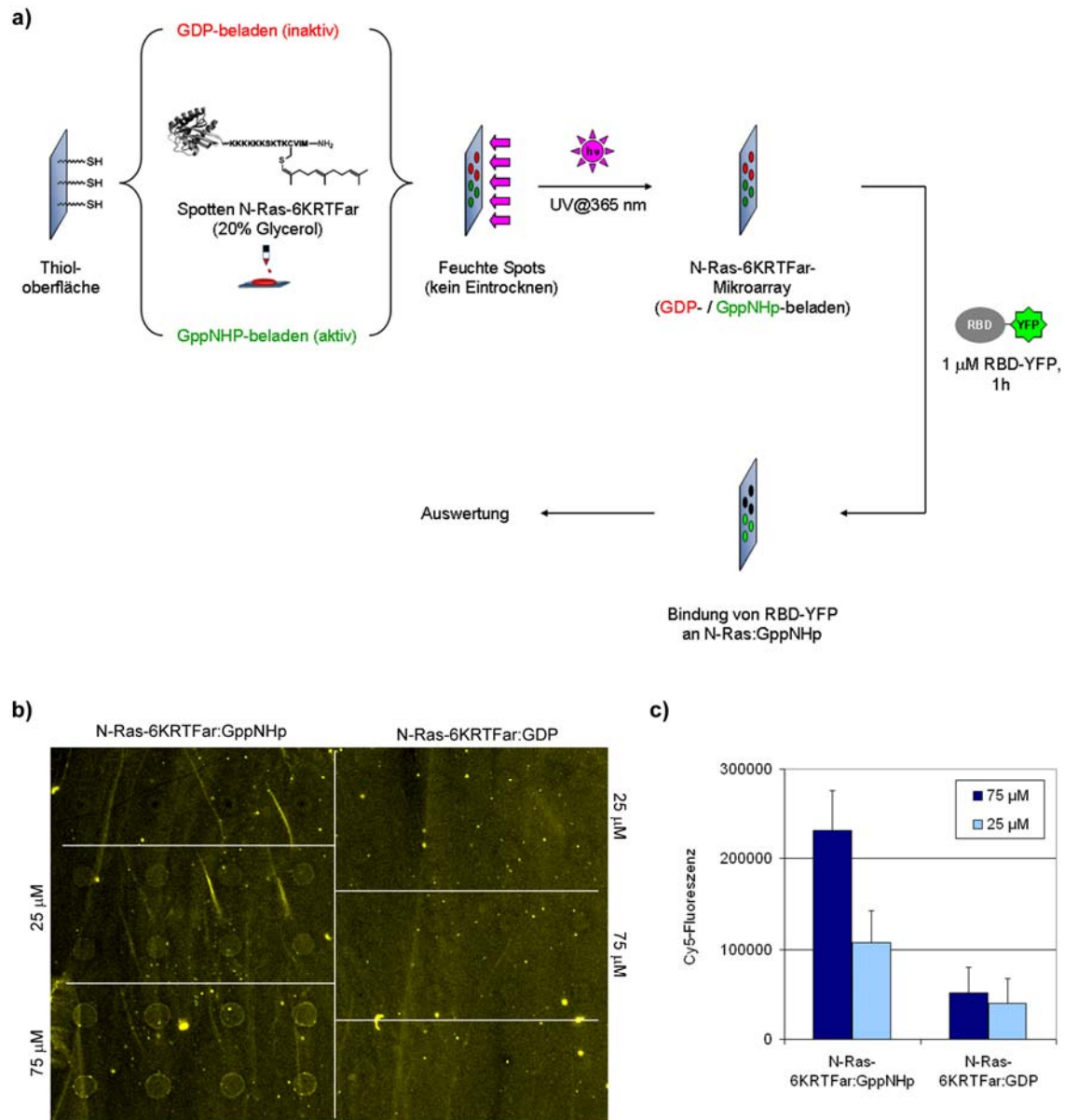


Abbildung 43: Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen einem N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar-Mikroarray (GDP- und GppNHp-beladenes N-Ras¹⁻¹⁸¹) und RBD-YFP. a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Fluoreszenzaufnahme. c) Quantitative Auswertung.

chain reaction, Polymerasekettenreaktion) durchgeführt werden, um Nukleotidsequenzen für Zielproteine zu generieren, die mit einer C-terminalen KRT-Sequenz versehen waren und nachfolgend in Expressionsvektoren kloniert werden konnten. Die DNA-Sequenz des KRT wurde einem pGATEV-Plasmid für die Expression von KRas4B der AG Alexandrov (MPI Dortmund) entnommen^[90] und zur Erstellung C-terminaler Primer verwendet (Abbildung 44). Im Folgenden wird die Klonierung der verschiedenen KRT-modifizierten Zielproteine sowie deren Expression beschrieben, bevor ab Abschnitt 3.6.6 auf die Herstellung der zugehörigen Mikroarrays eingegangen wird.

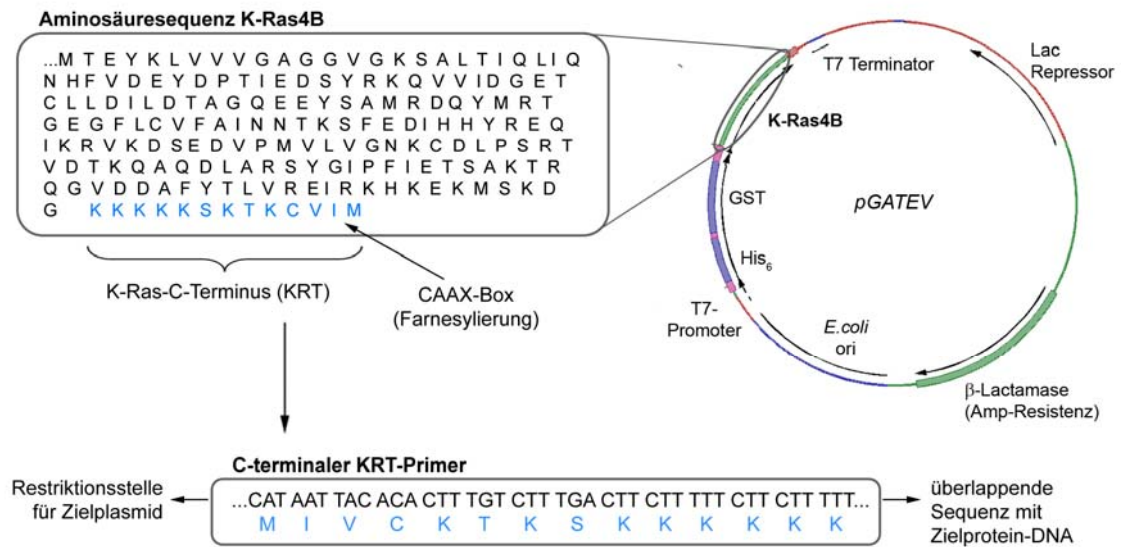


Abbildung 44: Generierung eines, den KRT kodierenden Primers (hier mit Hexapolyslysinssequenz) aus einem K-Ras4B-Expressionsplasmid (pGATEV).

3.6.5.1 Klonierung und Expression von H₆-mCherry-6KRT

Als Testprotein für die molekularbiologische KRT-Modifizierung wurde mCherry^[91] ausgewählt, da mCherry nach Thiol-En-Photoimmobilisierung auf Thioloberflächen leicht mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Nach Erstellen geeigneter, für den KRT kodierenden Primer erfolgte PCR-Vervielfältigung der gewünschten Nukleotidsequenz ausgehend von einem mCherry-enthaltenden Vektor (pGAT, AG Alexandrov, MPI Dortmund, Abbildung 45).^[92] Erhalten wurde eine für mCherry-6KRT, d.h. mCherry mit einem auf der Hexalysinsequenz basierenden KRT, kodierende Oligonukleotidsequenz. Der für die Sequenz vorgesehene Zielvektor pOPINF enthielt einen N-terminalen Hexahistidintag zur Aufreinigung des exprimierten Proteins, sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle zu dessen Entfernung. Nach Ligation, Transformation und Amplifizierung in *E. coli* XL1 blue wurde das gewünschte Plasmid pOPINF-H₆-mCherry-6KRT mittels DNA-Sequenzierung nachgewiesen.

Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem generierten Plasmid pOPINF-H₆-mCherry-6KRT transformiert, bei 37 °C vermehrt und die Expression von H₆-mCherry-6KRT mittels IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Trotz wiederholter Expression bei verschiedenen Expressionsbedingungen konnte mittels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) kein H₆-mCherry-6KRT detektiert werden (Abbildung 46). Ursachen für die fehlgeschlagene

3. Allgemeiner Teil

Expression wurden nicht festgestellt. Da der auf der Tetralysinsequenz basierende KRT als günstigster Kompromiss für die Thiol-En-Photoimmobilisierung identifiziert wurde (Abschnitt 3.6.3), wurden weitere Versuche der Expression von H₆-mCherry-6KRT zugunsten des Tetralysinanalogons H₆-mCherry 4KRT abgebrochen.

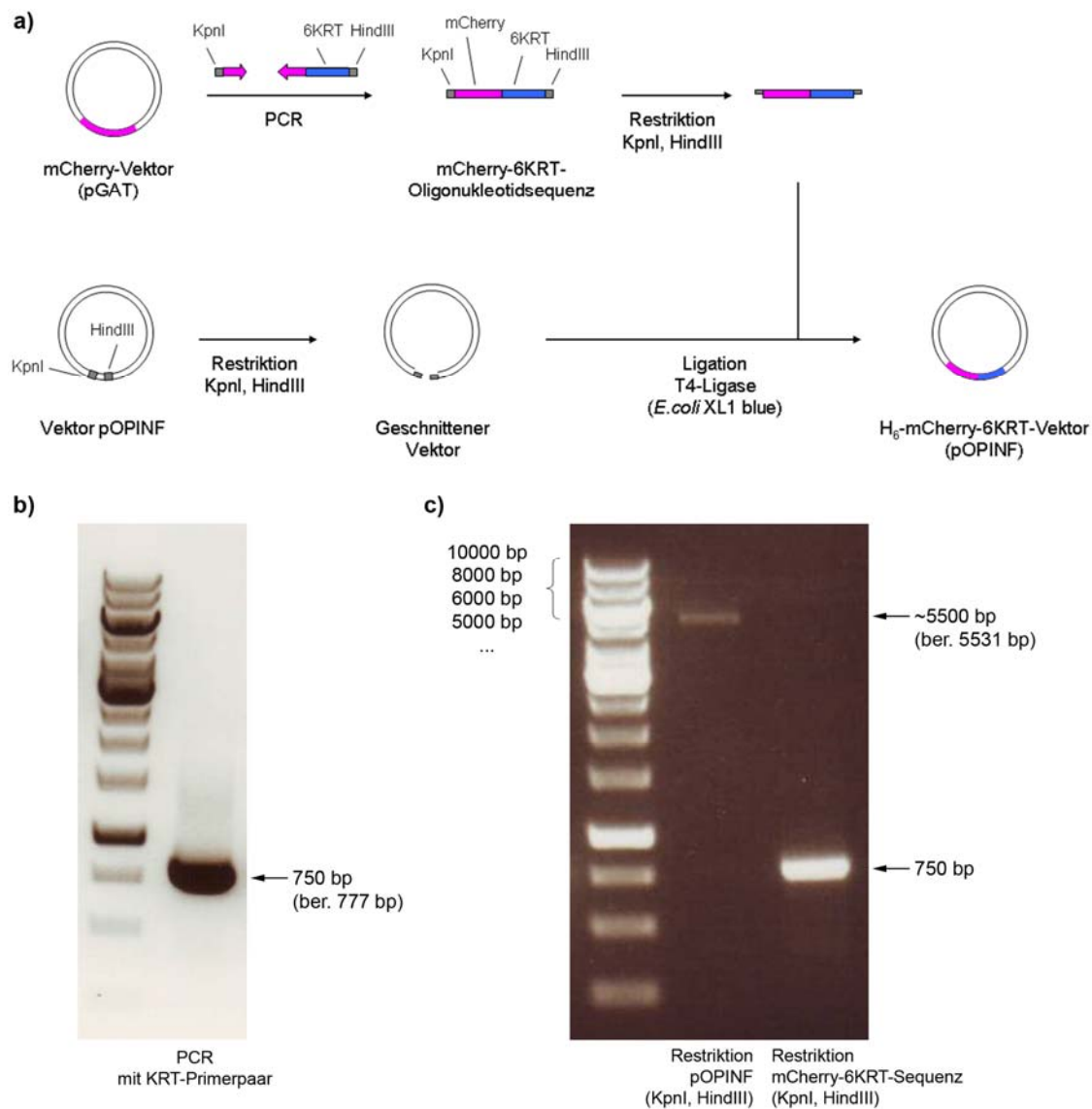


Abbildung 45: Erstellung des Plasmids pOPINF-H₆-mCherry-6KRT. a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Analytische Agarosegelelektrophorese der aus der PCR erhaltenen H₆-mCherry-6KRT-Oligonukleotidsequenz. c) Analytische Agarosegelelektrophorese der Oligonukleotidsequenz und des Plasmids pOPINF, beide mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII geschnitten.

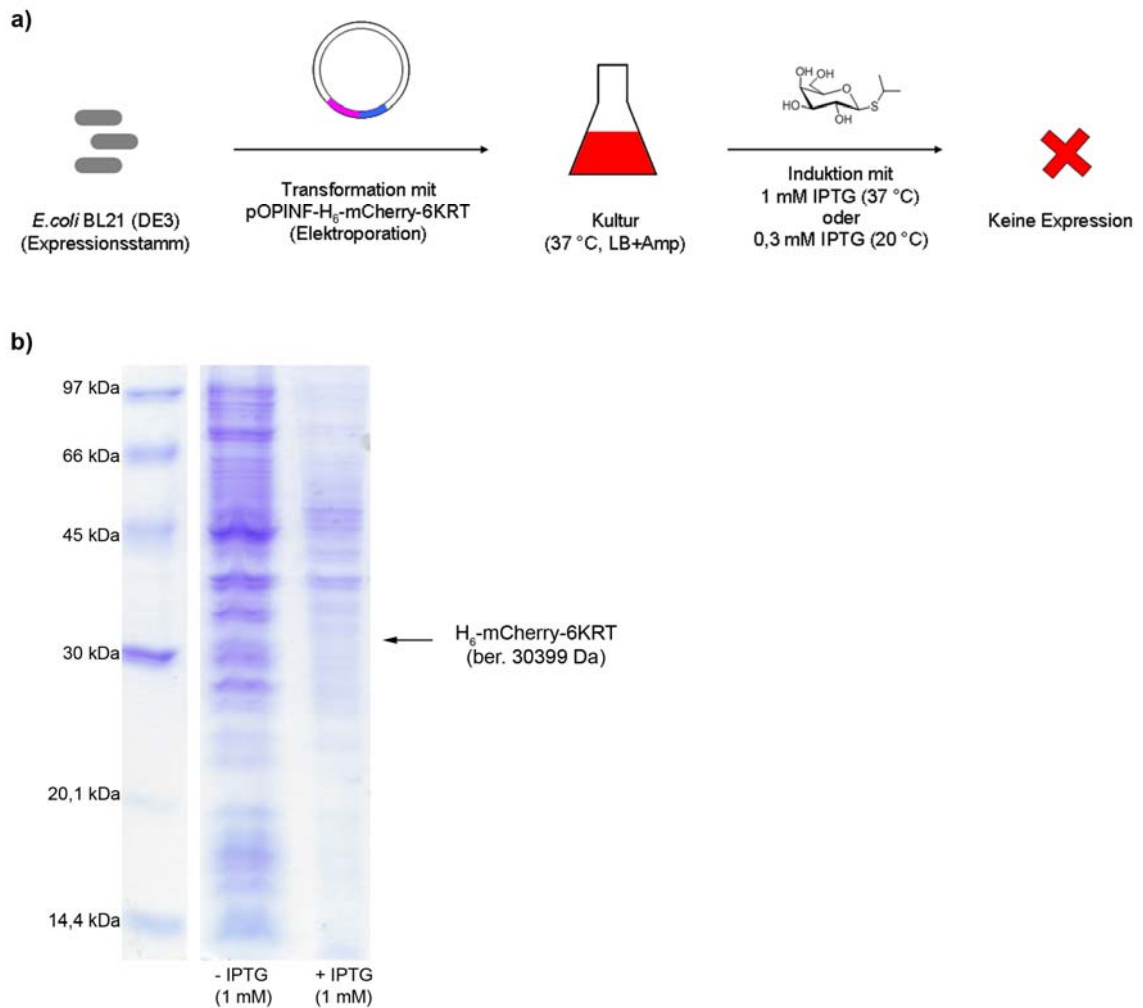


Abbildung 46: Versuch der Expression von pOPINF-H₆-mCherry-6KRT. a) Schematischer Arbeitsablauf der Expression in *E. coli* BL21 (DE3). b) SDS-PAGE von Vor- und Nachinduktionsproben der Überexpression. Im Massenbereich des gewünschten Proteins ist keine Bande detektierbar.

3.6.5.2 Klonierung und Expression von H₆-mCherry-4KRT

Klonierung von H₆-mCherry-4KRT war nicht notwendig, da ein entsprechender Vektor vorlag (pGAT, AG Alexandrov, MPI Dortmund).^[92] Dieses Plasmid enthielt keine TEV-Proteaseschnittstelle, so dass das KRT-modifizierte mCherry nach Expression und Aufreinigung mit einem N-terminalen Hexahistidintag funktionalisiert war.

Expression von pGAT-H₆-mCherry-4KRT erfolgte analog zu H₆-mCherry-6KRT in *E. coli* BL21 (DE3) (Abbildung 47a). Nach erfolgreicher Expressions bei 20 °C für 24 Stunden wurde das erhaltene Zelllysat mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt (Abbildung 47b). 40 mg H₆-mCherry-4KRT konnten erfolgreich isoliert werden.

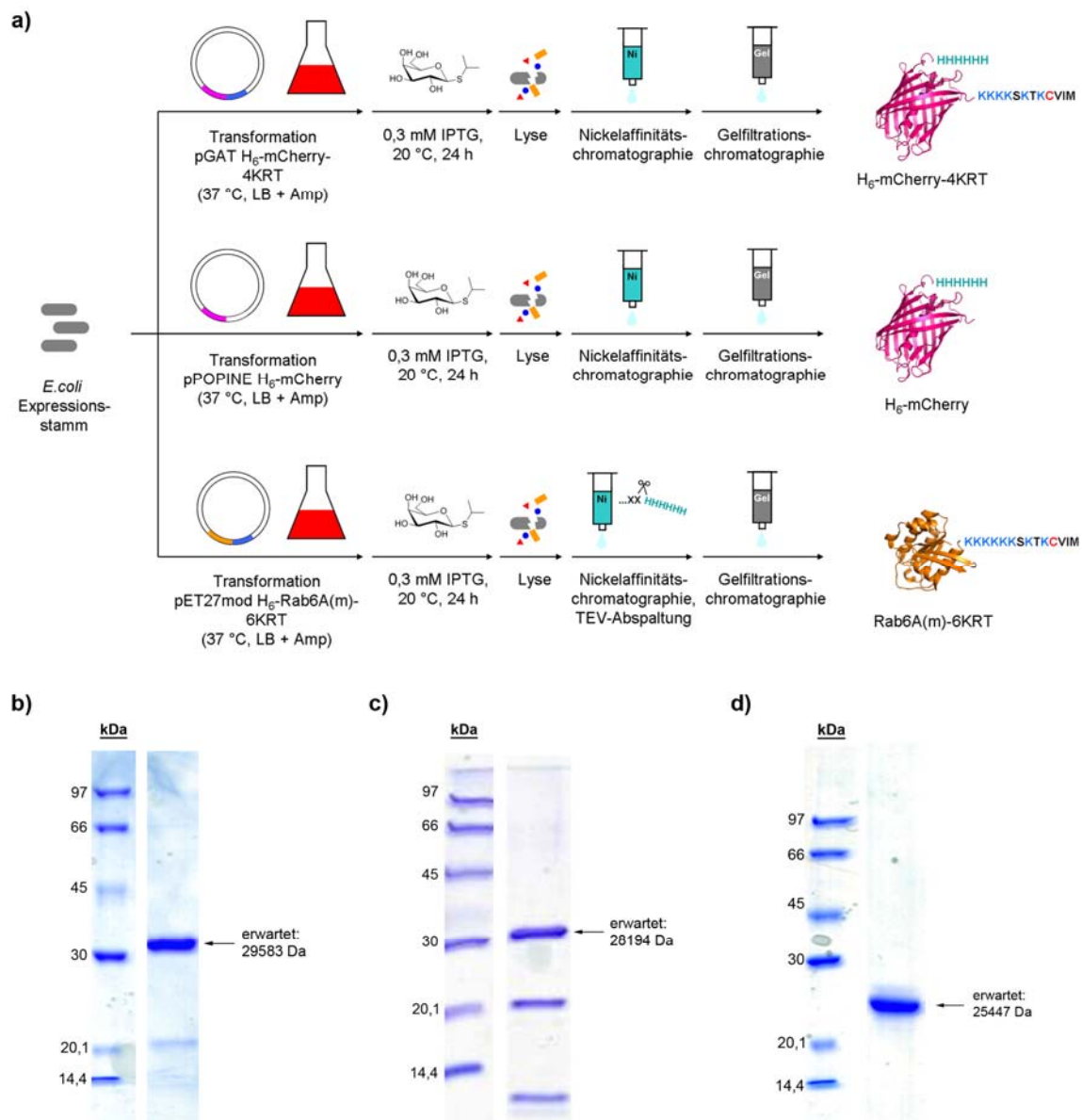


Abbildung 47: Expression der KRT-modifizierten Proteine H₆-mCherry-4KRT und Rab6A-6KRT sowie von H₆-mCherry. a) Schematischer Arbeitsablauf der drei Expression sowie der Aufarbeitung. b) SDS-PAGE von H₆-mCherry-4KRT nach Gelfiltration. c) SDS-PAGE von Rab6A-6KRT nach Gelfiltration. d) SDS-PAGE von H₆-mCherry nach Gelfiltration.

3.6.5.3 Klonierung und Expression von H₆-mCherry

H₆-mCherry ohne KRT-Modifizierung war als Negativkontrolle für die Thiol-En-Immobilisierung von farnesyliertem H₆-mCherry-4KRT vorgesehen. Ein geeignetes Expressionsplasmid lag bereits vor (pOPINE-H₆-mCherry, AG Alexandrov, MPI Dortmund).

Expression in *E. coli* BL21 (DE3) verlief erfolgreich, und 130 mg H₆-mCherry wurden nach Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie und Gelfiltration isoliert (Abbildung 47c).

3.6.5.4 Klonierung und Expression von H₆-Rab6A(m)-6KRT

Neben mCherry sollte die GTPase Rab6A KRT-modifiziert und in der Thiol-En-Photoimmobilisierung getestet werden. Rab-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in vesikulären Transportprozessen in Säugerzellen,^[93, 94] und Rab6A ist in vom Golgi-Apparat ausgehenden vesikulären Transport involviert.^[95] Durch Ausweiten der Methode auf eine bislang nicht verwendete Proteinfamilie sollte in verstärktem Maße ihre Vielseitigkeit untersucht werden, da sich bisherige Immobilisierungsexperimente auf die GTPase Ras beschränkt hatten. Da geeignete Interaktionspartner vorhanden waren, war analog zu Ras auch im Fall von immobilisiertem Rab6A die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen auf der Oberfläche möglich, um die Erhaltung der Proteinaktivität nach der Immobilisierung zu demonstrieren. Für Protein-Protein-Interaktionen mit immobilisiertem Rab6A stand die minimale Rab6A-Bindungsdomäne von BicaudalD2, einem Rab6A-Effektor, als Fusionsprotein mit eGFP zur Verfügung.^[95, 96]

Mit Hilfe eines geeigneten, für den Hexalysin-KRT kodierenden Primerpaares wurde mittels PCR eine für H₆-Rab6A-6KRT kodierende Oligonukleotidsequenz generiert. Durch stille Mutation dreier Nucleobasen am C-Terminus des Inserts (669TTC>CAG) war es zudem möglich, eine PstI-Restriktionsstelle zwischen Rab6A und dem KRT einzufügen, um

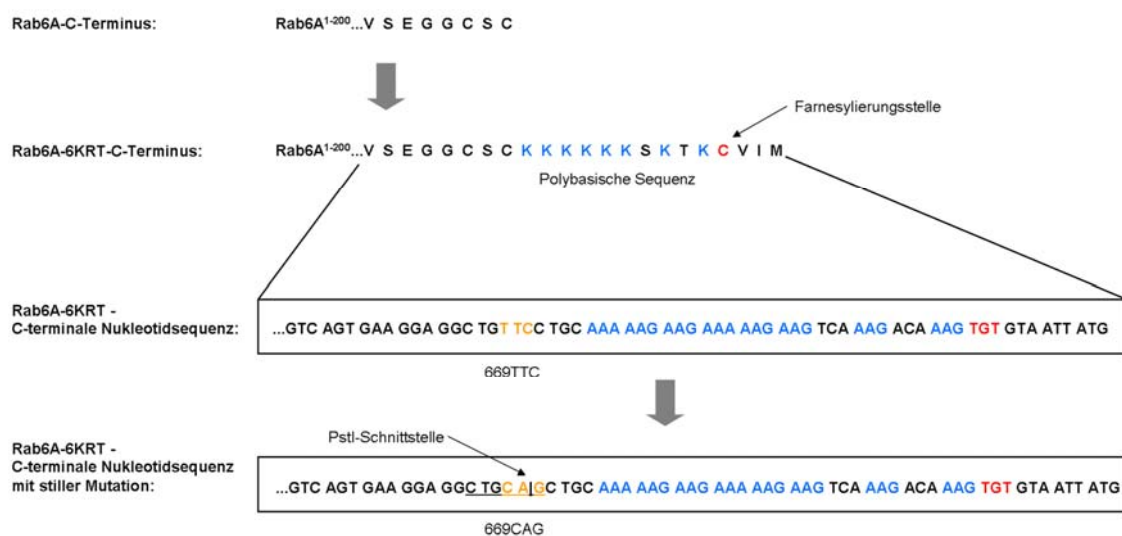


Abbildung 48: Design von Rab6A-6KRT. Zusätzlich zum 6KRT wurde über eine stille Mutation (669TTC>CAG) eine neue Restriktionsstelle (PstI) zwischen Rab6A-C-Terminus und dem 6KRT eingeführt.

3. Allgemeiner Teil

Klonierung anderer Inserts ohne Verwendung des langen KRT-Primers zu ermöglichen (Abbildung 48; still mutiertes H₆-Rab6A(669TTC>CAG)-6KRT wird im Folgenden als H₆-Rab6A(m)-6KRT abgekürzt). Die Oligonukleotidsequenz wurde in ein modifiziertes pET27-Plasmid kloniert und durch Amplifikation in *E.coli* XL1 blue isoliert. Nach Transformation in *E.coli* BL21 (DE3) erfolgte die Expression von H₆-Rab6A(m)-6KRT bei 20 °C für 24 Stunden (Abbildung 47a). Aufarbeitung und Aufreinigung wurden wie für H₆-mCherry-4KRT beschrieben durchgeführt, jedoch wurde zusätzlich der Polyhistidintag mit TEV-Protease abgespalten. Es wurden ca. 12 mg Rab6A(m)-6KRT isoliert (Abbildung 47d).

3.6.6 Mikroarrays KRT-modifizierter Proteine

3.6.6.1 H₆-mCherry-4KRTFar-Mikroarray durch direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung

Farnesyliertes H₆-mCherry-4KRTFar wurde durch *in-vitro*-Farnesylierung mit FTase und Fpp erhalten. Nachfolgend wurden H₆-mCherry-4KRTFar sowie nicht-farnesyliertes H₆-mCherry-4KRT und H₆-mCherry als Negativkontrollen in verschiedenen Konzentrationen auf thiol-PAMAM-funktionalisierte SiO_x/Si-Objektträger gespottet. Die Proteinlösungen wurden aufgrund der in Abschnitt 3.5.8 bei der Thiol-En-Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar gemachten Beobachtungen auf einen DTE-Gehalt von etwa 3 mM eingestellt, um unspezifische Immobilisierung über Disulfidbrücken zu reduzieren. Die Photoimmobilisierung wurde durch zehnmütige UV-Bestrahlung bei 365 nm induziert. Aufgrund der Eigenfluoreszenz von mCherry war nachfolgend kein weiterer Nachweisschritt erforderlich (Abbildung 49a).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 49b und 49c dargestellt. Für H₆-mCherry-4KRTFar und die Kontrolle H₆-mCherry-4KRT wurden deutlich erkennbare Punkte auf der Oberfläche erhalten, während die Kontrolle H₆-mCherry kaum detektierbar war. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zwischen farnesyliertem und nicht-farnesyliertem Protein betrug etwa 5:1 bis 6:1. Nicht-farnesyliertes H₆-mCherry-4KRT zeigte weit geringere unspezifische Immobilisierung, während H₆-mCherry ohne KRT und Farnesylrest nicht an die Oberfläche zu adsorbieren schien.

Dieses Ergebnis demonstrierte die Validität der KRT-Far-basierten Thiol-En-Photoimmobilisierung. Mit Hilfe des KRT konnten somit auch andere Proteine als Ras immobilisiert werden (siehe Abschnitt 3.6.3). Ferner konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des KRT eine gezielte Immobilisierung aus einer Proteinmischung potentiell möglich war, da nur KRT-modifizierte Proteine an der Oberfläche adsorbierten und somit nur diese für die Thiol-En-Immobilisierung zur Verfügung standen. Diese Beobachtung deutete auf die Möglichkeit hin,

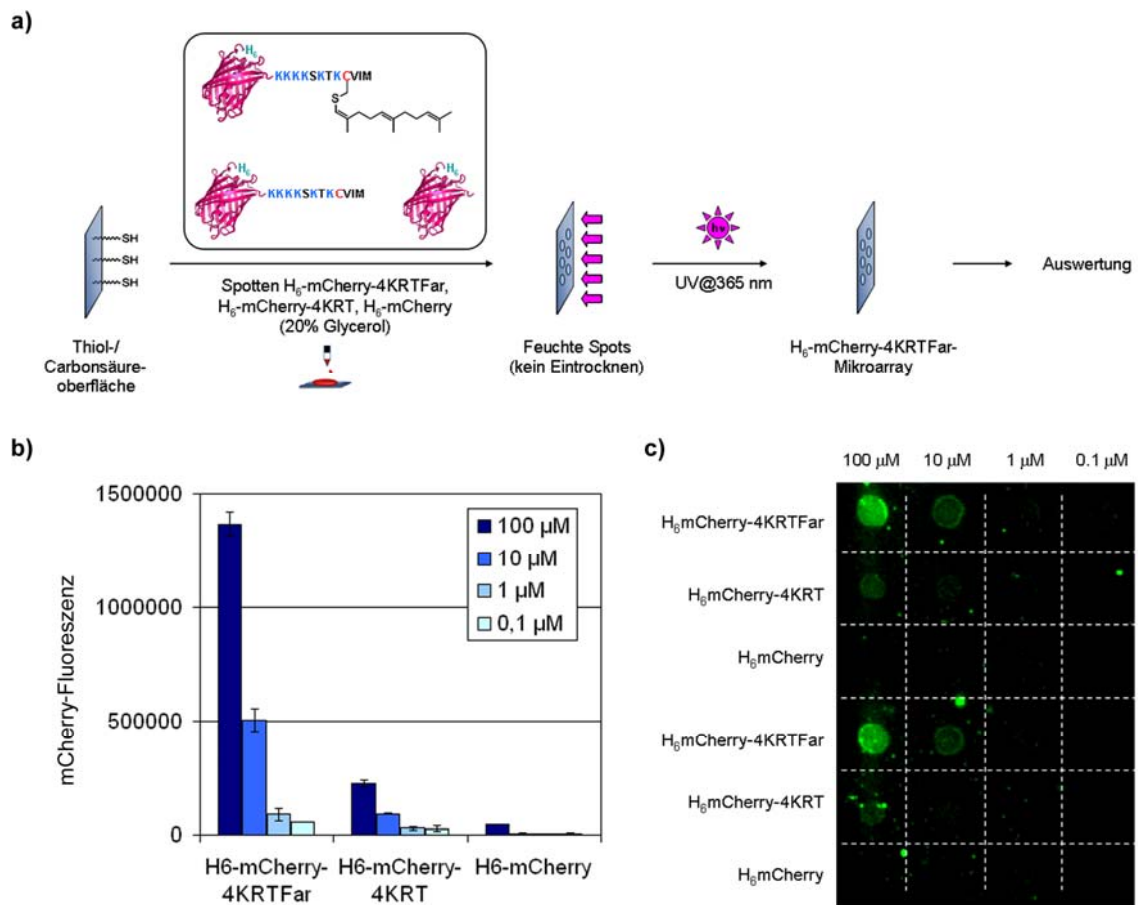


Abbildung 49: H₆-mCherry-4KRTFar-Mikroarray hergestellt mit direkter Thiol-En-Photoimmobilisierung. a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Quantitative Auswertung. c) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrays.

Proteine auch aus komplexen Mischungen, wie z.B. Expressionslysat, immobilisieren zu können, so dass zeitaufwändige Aufreinigungsschritte vermieden werden. Der Polyhistidintag, der in allen verwendeten mCherry-Varianten vorhanden war, beeinflusste die Immobilisierung nicht.

3.6.6.2 Rab6A(m)-6KRTFar-Mikroarray durch direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung

Farnesylierung von Rab6A-6KRTFar wurde, wie im Fall von H₆-mCherry4KRT, mit FTase und Fpp *in vitro* durchgeführt. Spotten erfolgte in verschiedenen Konzentrationen auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger unter Verwendung von Rab6A-6KRT und Rab6A als Negativkontrollen. Nach Photoimmobilisierung durch zehnminütige UV-Bestrahlung bei 365 nm wurden die drei auf dem Objektträger befindlichen, identischen Subarrays mit

3. Allgemeiner Teil

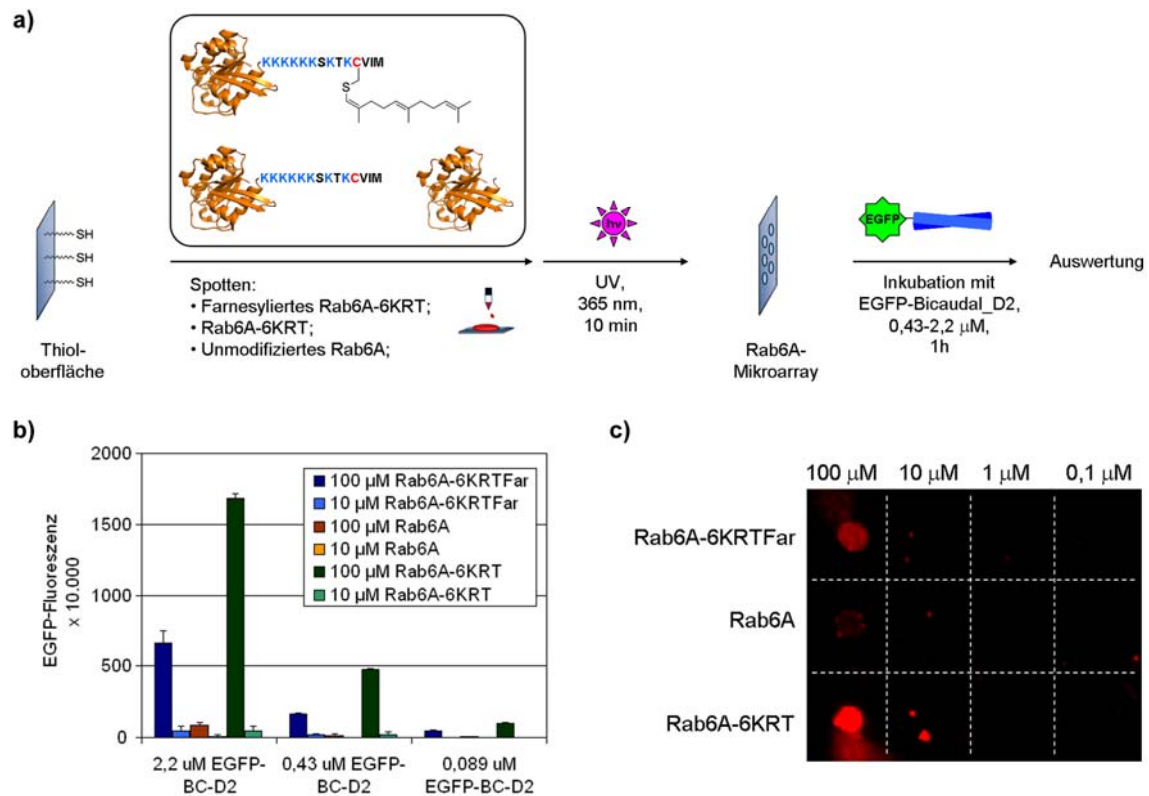


Abbildung 50: Rab6A-6KRT-Far-Mikroarray hergestellt mittels direkter Thiol-En-Photoimmobilisierung. a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Quantitative Auswertung. c) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrayabschnitts.

GeneFrames voneinander abgetrennt und mit dem Rab6A-Effektor eGFP-BicaudalD2 in drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert (Abbildung 50a). Die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen und die quantitative Auswertung zeigen kaum detektierbare Fluoreszenz für Rab6A, während für Rab6A-6KRTFar überraschenderweise Punkte mit einer um den Faktor zwei bis drei niedrigeren Fluoreszenzintensität als für die Kontrolle Rab6A-6KRT erhalten wurden (Abbildungen 50b und 50c). Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte eine zu geringe DTE-Konzentration sein, die nicht ausreichend ist, um unspezifische Immobilisierung über Disulfidbrücken zu vermeiden (hier 3 mM, siehe Abschnitt 3.7.2.3). Dennoch konnte demonstriert werden, dass die KRTFar-basierte Thiol-En-Photoimmobilisierung auf Rab6A anwendbar ist und ferner mit dem erzeugten Rab6A-Mikroarray der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen möglich ist.

3.6.7 Kontrollexperiment zur K-Ras-Hypothese: pH-Wert und Salzgehalt

Zur weiteren Untersuchung der KRT-Hypothese wurde ein Immobilisierungsexperiment mit H₆-mCherry-4KRTFar durchgeführt, bei dem pH-Wert und Salzkonzentration der verwendeten

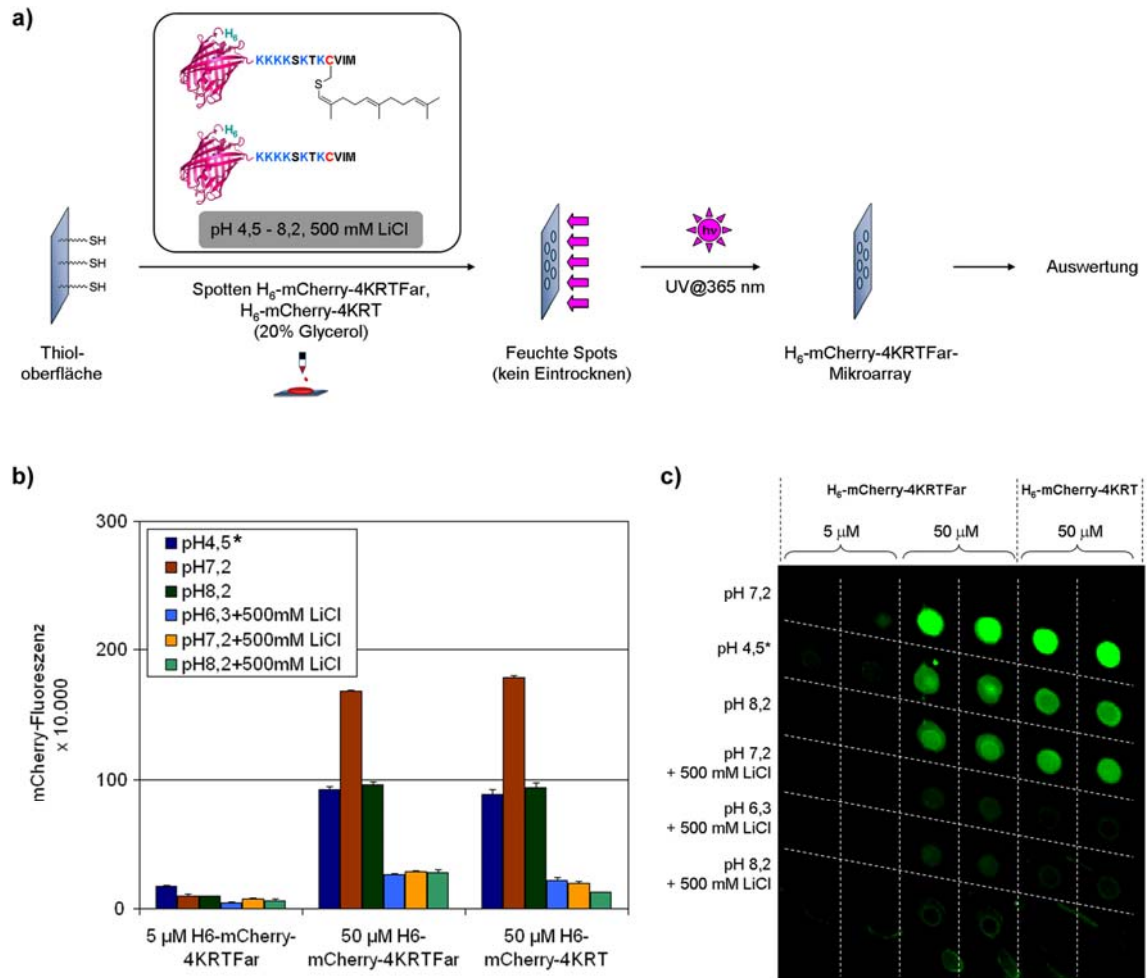


Abbildung 51: Einfluss von pH-Wert und Salzkonzentration auf die direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung von H₆-mCherry-4KRTFar. a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Quantitative Auswertung. c) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrays (* Fluoreszenzintensität der Proteinlösung wurde vermutlich aufgrund von Denaturierung um ~50 % reduziert).

Proteinlösungen variiert wurden. Die Thiol-En-Photoimmobilisierung von Proteinen wurde üblicherweise bei physiologischen pH-Werten um pH 7,4 durchgeführt. Träfe die KRT-Hypothese zu, wäre durch eine Veränderung des pH-Werts eine stärker positive bzw. negativere Ladung des Proteins und damit eine veränderte ladungsbasierte Interaktion zwischen KRT und der Oberfläche zu erwarten, die die Photoimmobilisierungseffizienz beeinflussen würde. Für höhere Salzkonzentrationen wurde ein Abschirmungseffekt durch Salzionen vermutet, der zu einer Reduzierung der Ladungsinteraktion und der Photoimmobilisierungseffizienz führen könnte.

Proteinlösungen von H₆-mCherry-4KRTFar und H₆-mCherry-4KRT wurden auf pH-Werte von 4,5 bzw. 8,2 eingestellt. Ferner wurde einem Teil der Lösungen LiCl in einer Konzentration von 0,5 M zugesetzt. Die Mikroarrayherstellung erfolgte wie zuvor durch Spotten auf einen thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger und Photoimmobilisierung durch zehnmütige UV-Bestrahlung bei 365 nm. Abbildung 51 zeigt eine schematische Darstellung des

3. Allgemeiner Teil

Arbeitsablaufs, die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen sowie deren quantitative Auswertung. Erhöhung des pH-Werts von 7,4 auf 8,2 führte zu einer Reduzierung des Fluoreszenzsignals um ca. 40 %. Verringerung des pH-Werts auf 4,5 führte ebenfalls zu einem Intensitätsverlust um ca. 40 %. Nachträgliche Kontrolle der auf pH 4,5 eingestellten Proteinlösung ergab jedoch einen teilweisen Verlust der Fluoreszenzintensität des Fluorophors, der auf Denaturierung in Folge der Zugabe von HCl zur Verringerung des pH-Werts zurückgeführt wurde. Der Verlust an Fluoreszenzintensität wurde auf etwa 50 % geschätzt. Für die bei pH 4,5 im Mikroarray erzielte Photoimmobilisierungseffizienz wäre also tatsächlich von einem im Vergleich zu pH 7,4 gleichbleibenden oder sogar höheren Niveau auszugehen. Zugabe von 500 mM LiCl führte zu einer starken Reduzierung der Fluoreszenzintensität bei allen pH-Werten auf ein Niveau von 15-30 % im Vergleich zu pH 7,4 und ohne LiCl.

Für H₆-mCherry-4KRT wurde ein theoretischer pI von 6,9 bestimmt (berechnet mit ExPASy ProtParam, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Bei pH 7,4 wäre das Protein somit leicht negativ geladen, während für den polybasischen KRT aufgrund der enthaltenen Lysinseitenketten von positiver Ladung auszugehen ist. Die für den höheren pH-Wert von 8,2 beobachtete Reduzierung der Photoimmobilisierungseffizienz ist möglicherweise durch eine stärkere negative Aufladung des Proteins und den daraus resultierenden Abstoßungseffekten zwischen Protein und negativ geladener Oberfläche zu erklären. Für den niedrigeren pH-Wert von 4,5 ist keine eindeutige Interpretation möglich. Das Ergebnis deutet jedoch darauf hin, dass im Vergleich zu pH 7,4 gleiche oder bessere Photoimmobilisierungseffizienz erzielt wurde. Eine stärkere positive Aufladung des Proteins und eine daraus resultierende stärkere Anziehung zwischen Protein und Oberfläche würde diese Beobachtung erklären. Zugabe hoher Salzkonzentrationen ergab wie erwartet eine Reduzierung der Photoimmobilisierungseffizienz, die auf Abschirmung sowohl positiver als auch negativer Ladungen zurückgeführt werden kann. Der Vergleich der Photoimmobilisierungseffizienz von H₆-mCherry-4KRT^{Far} und H₆-mCherry-4KRT zeigt in allen Fällen nahezu gleiche Fluoreszenzintensität. Dieser Umstand ist vermutlich auf unspezifische Immobilisierung von H₆-mCherry-4KRT über das freie Cystein im KRT zurückzuführen. Die verwendete DTE-Konzentration von 3 mM scheint somit nicht immer ausreichend, um Disulfidbildung zu vermeiden (siehe Abschnitt 3.7.2.3).

Insgesamt konnte die KRT-Hypothese nicht mit absoluter Sicherheit bestätigt werden, jedoch deuten die erhaltenen Ergebnisse auf ihre Validität hin. Weitere Experimente - ggf. mit einer größeren pH-Wert-Bandbreite oder einer Veränderung der Oberflächenchemie - wären für eine eindeutige Bestätigung notwendig. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Veränderung von Parametern wie pH-Wert oder Oberflächenchemie nicht nur die Ladungsinteraktion zwischen Protein und Oberfläche, sondern auch die Ausbeute oder Geschwindigkeit der Thiol-En-Reaktion beeinflussen könnte. Umfangreiche Kontrollexperimente wären daher unerlässlich.

3.6.8 Zusammenfassung

Mit Hilfe der ligierten N-Ras-Variante N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin wurde analog zur indirekten Photomikrostrukturierung und unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems die Herstellung von Proteinmikroarrays mit der indirekten Thiol-En-Photoimmobilisierung gezeigt. Ferner wurden KRT-modifizierte N-Ras Varianten, N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar (X = 0,2,4,6) verwendet, um die optimale Anzahl der im KRT enthaltenen Lysine für die direkte Thiol-En-Photoimmobilisierung farnesylierter und KRT-modifizierter Proteine zu identifizieren. Der mit einer Tetralysinsequenz versehene KRT stellte sich in dieser Untersuchung als bester Kompromiss zwischen Photoimmobilisierungseffizienz und nachträglicher Entfernbarekeit unspezifisch an die Oberfläche adsorbierten Proteins heraus. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurden die KRT-modifizierten Proteine H₆-mCherry-4KRT sowie Rab6A(m)-6KRT erhalten, mit denen nach Farnesylierung *in vitro* mittels direkter Thiol-En-Photoimmobilisierung erfolgreich Mikroarrays generiert wurden. Mit einem Rab6A(m)-6KRTFar-Mikroarray war der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion mit dem Rab6A-Bindungspartner BicaudalD2 möglich. Ferner konnte die KRT-Hypothese durch Variation des pH-Werts und der Salzkonzentration der Proteinlösungen weiter gestützt werden.

3.7 Proteinlysatomikroarrays

3.7.1 Lysatomikroarrays KRT-modifizierter Proteine – H₆-mCherry-4KRTFar

Die zur KRT-unterstützten Thiol-En-Photoimmobilisierung farnesylierter Proteine durchgeführten Experimente deuteten an, dass mit Hilfe des KRT eine selektive Vororientierung und Immobilisierung von Proteinen auch aus komplexen Mischungen möglich sein könnten. Eine mögliche Anwendung wäre die Immobilisierung aus Expressionslysaten eines KRT-modifizierten Proteins, da in diesem Fall aufwändige Reinigungsschritte entfallen könnten und dadurch die Herstellung von Proteinmikroarrays erheblich vereinfacht würde.

Entsprechend dieser Annahme wurde im Folgenden die Herstellung von Proteinmikroarrays aus Expressionslysaten untersucht. KRT-modifizierte Proteine sollten wie oben geschildert exprimiert werden, jedoch sollten Aufreinigungsschritte nach Zelllyse und Ultrazentrifugation entfallen. KRT-modifizierte Proteine würden dann direkt im Lysat *in vitro* farnesyliert und nachfolgend mittels Thiol-En-Photoimmobilisierung auf Thioloberflächen immobilisiert. Eine selektive Farnesylierung direkt in *E.coli*-Expressionslysaten wäre potentiell möglich, da *E.coli* keine Farnesyltransferase exprimiert, die mit der Farnesylierung des überexprimierten Zielproteins interferieren könnte. Nach Transformation von *E.coli*-Expressionskulturen mit für KRT-

3. Allgemeiner Teil

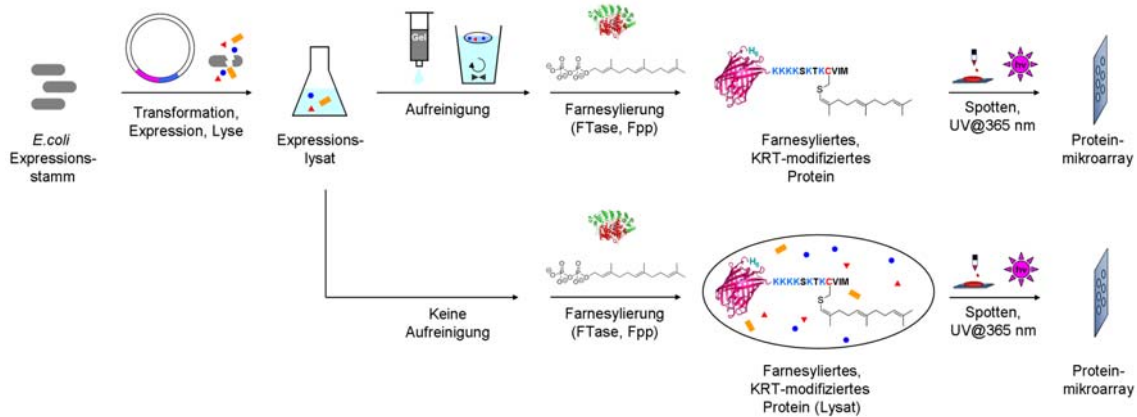


Abbildung 52: Schematischer Vergleich der Mikroarrayherstellung ausgehend von aufgereinigtem Protein oder Expressionslysat.

Proteine kodierenden Vektoren wäre eine Aufbewahrung der Expressionsklone bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ möglich, so dass die Generierung von Proteinlysat in wenigen Schritten und mit einer Vielzahl von Klonen gleichzeitig durchzuführen wäre (Abbildung 52). Konventionelle Proteinexpression inklusive Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie oder Gelfiltration ist zeitaufwändig und benötigt viele Prozessschritte. Ferner ist die parallele Durchführung der Proteinaufreinigung in stärkerem Maße durch die verfügbare Ausrüstung (z.B. Anzahl der Chromatographieanlagen) begrenzt als die Expression von Proteinen, für die nur ein Brutschrank benötigt wird.

H₆-mCherry-4KRT wurde als Testprotein für die Herstellung von Expressionslysatmikroarrays verwendet. *E. coli* BL21 (DE3) wurde wie oben beschrieben mit dem Vektor pGAT-H₆-mCherry-4KRT transformiert und das Protein überexprimiert (siehe Abschnitt 3.6.5.2). Nach Zelllyse und Zentrifugation wurde die Konzentration des im LySAT enthaltenen H₆-mCherry-4KRT mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt, und das Protein mit FTase und Fpp *in vitro* farnesyliert. Da aufgrund der Vielzahl an im Expressionslysat enthaltenen Proteine keine Reaktionskontrolle mittels MALDI-MS möglich war, wurde aufgereinigtes H₆-mCherry-4KRT in einem Vergleichsexperiment zeitgleich farnesyliert und der Erfolg der Farnesylierung mittels MALDI-MS kontrolliert.

Expressionslysat mit H₆-mCherry-4KRTFar sowie aufgereinigtes H₆-mCherry-4KRTFar wurden in verschiedenen Konzentrationen auf einen thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger gespotet und durch zehnmünütige Bestrahlung bei 365 nm photoimmobilisiert. Abbildung 53 zeigt den schematischen Arbeitsablauf sowie die erhaltenen Ergebnisse. Für H₆-mCherry4KRTFar-enthaltendes Expressionslysat wurden Fluoreszenzintensitäten beobachtet, die im Vergleich zu aufgereinigtem H₆-mCherry-4KRTFar um etwa 50 % reduziert waren. Die reduzierte Fluoreszenzintensität ist nicht eindeutig zu erklären, jedoch könnten LySATbestandteile die ladungsgesteuerte Vororientierung bzw. die Photoreaktion

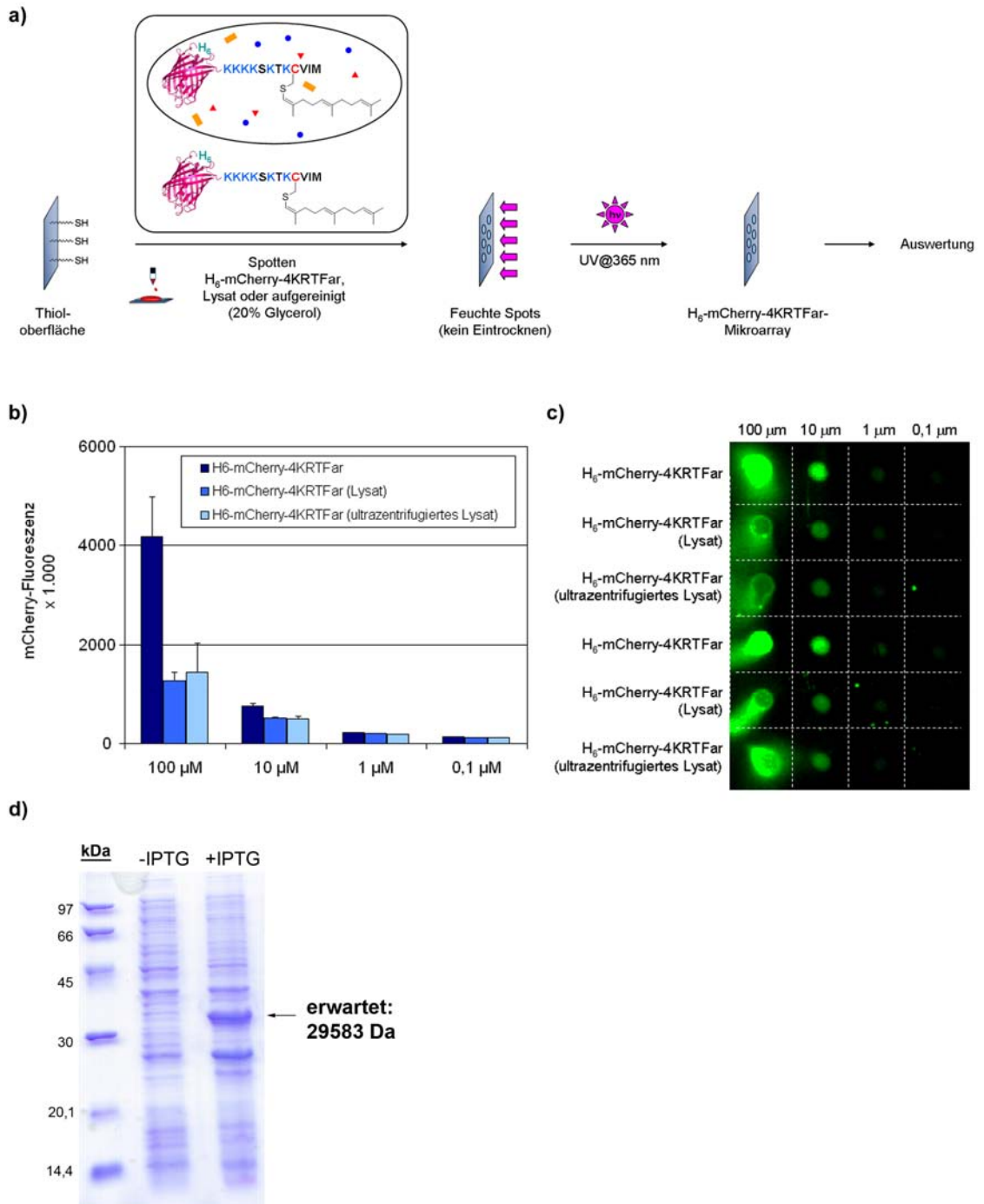


Abbildung 53: H₆-mCherry-4KRTFar-Mikroarray hergestellt ausgehend von H₆-mCherry-4KRTFar-Expressionslysats. a) Schematischer Arbeitsablauf. b) Quantitative Auswertung. c) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrays. d) SDS-PAGE des verwendeten Lysats. Die für H₆-mCherry-4KRT erwartete Bande ist deutlich zu erkennen.

beeinflussen. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass die Immobilisierung KRT-modifizierter und farnesylierter Proteine aus Expressionslysats möglich ist und dass bei Verwendung dieser Strategie zur Herstellung von Proteinbiochips auf zeitaufwändige Proteinaufreinigung verzichtet werden kann. Zudem war eine konventionelle Laborzentrifuge ausreichend, um unlösliche Bestandteile zu entfernen, so dass Ultrazentrifugation nicht notwendig ist.

3. Allgemeiner Teil

Kovalente und gerichtete Proteinimmobilisierung aus Expressionslysate wurde zuvor mit Hilfe von Protein-Trans-Splicing^[43, 44] oder unter Ausnutzung der Enzyme Phosphopantetheinyltransferase^[21] bzw. O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT, SNAP tag)^[40, 41] durchgeführt. Protein-Trans-Splicing ermöglicht eine Proteinimmobilisierung allein unter Verwendung von Proteinen und Polypeptiden, jedoch verläuft die Selbstpleißreaktion zwischen Protein und Oberfläche mit 16 Stunden Reaktionszeit sehr langsam. Phosphopantetheinyltransferase-katalysierte Proteinimmobilisierung erfolgt mit fünf Stunden Reaktionszeit (bei Raumtemperatur) wesentlich schneller, benötigt jedoch Oberflächen mit vergleichsweise exotischer Coenzym-A-Funktionalisierung.^[43, 44] Mit dem SNAP-Tag wurde die Herstellung von Proteinmikroarrays in nur 15 Minuten erreicht. Die eingesetzten AGT-Mutanten haben jedoch eine Größe von 182 Aminosäuren. Dagegen ist die kovalente und selektive Thiol-En-Photoimmobilisierung farnesylierter und KRT-modifizierter Proteine in zehn Minuten durchzuführen und verwendet einen mit einer Länge von nur zwölf Aminosäuren relativ kleinen Polypeptidtag.

3.7.2 Kolysatmikroarrays KRT-modifizierter Proteine mit FTase

Außer der Thiol-En-Photoimmobilisierung KRT-modifizierter, farnesylierter Proteine aus Expressionslysaten wurde auch die Möglichkeit der Koexpression KRT-modifizierter Proteine mit FTase untersucht, da mit dieser Strategie die Nutzung von endogenem *E.coli*-Fpp zur Farnesylierung des KRT-Proteins *in vivo* denkbar war. Auf diese Weise wäre kovalente und selektive Proteinimmobilisierung rein molekularbiologisch, nach Expression und Zellyse in einem einzigen Arbeitsschritt und in nur zehn Minuten möglich (UV-Bestrahlung). Nach Transformation von *E.coli*-Expressionskulturen mit den entsprechenden Vektoren, Koexpression beider Proteine und Zellyse könnte das Koexpressionslysate direkt zur Herstellung von Mikroarrays verwendet werden (Abbildung 54).

Unklar war, ob die Menge an endogenem *E.coli*-Fpp ausreichen würde, um überexprimiertes, KRT-modifiziertes Protein vollständig zu farnesylieren. Ferner waren die Auswirkungen großer Mengen farnesylierten Proteins in Cytosol oder Zellmembran auf das Bakterium unklar. Beeinträchtigung der Überexpression oder Zelltod wären denkbar.

3.7.2.1 Vektorsystem zur Koexpression

FTase besteht aus zwei Untereinheiten, die zur Gewinnung des aktiven Enzyms üblicherweise getrennt exprimiert, isoliert und nachfolgend rekombiniert werden.^[90] Die Koexpression von FTase mit KRT-modifizierten Proteinen hätte somit eine *E.coli*-Transformation mit drei

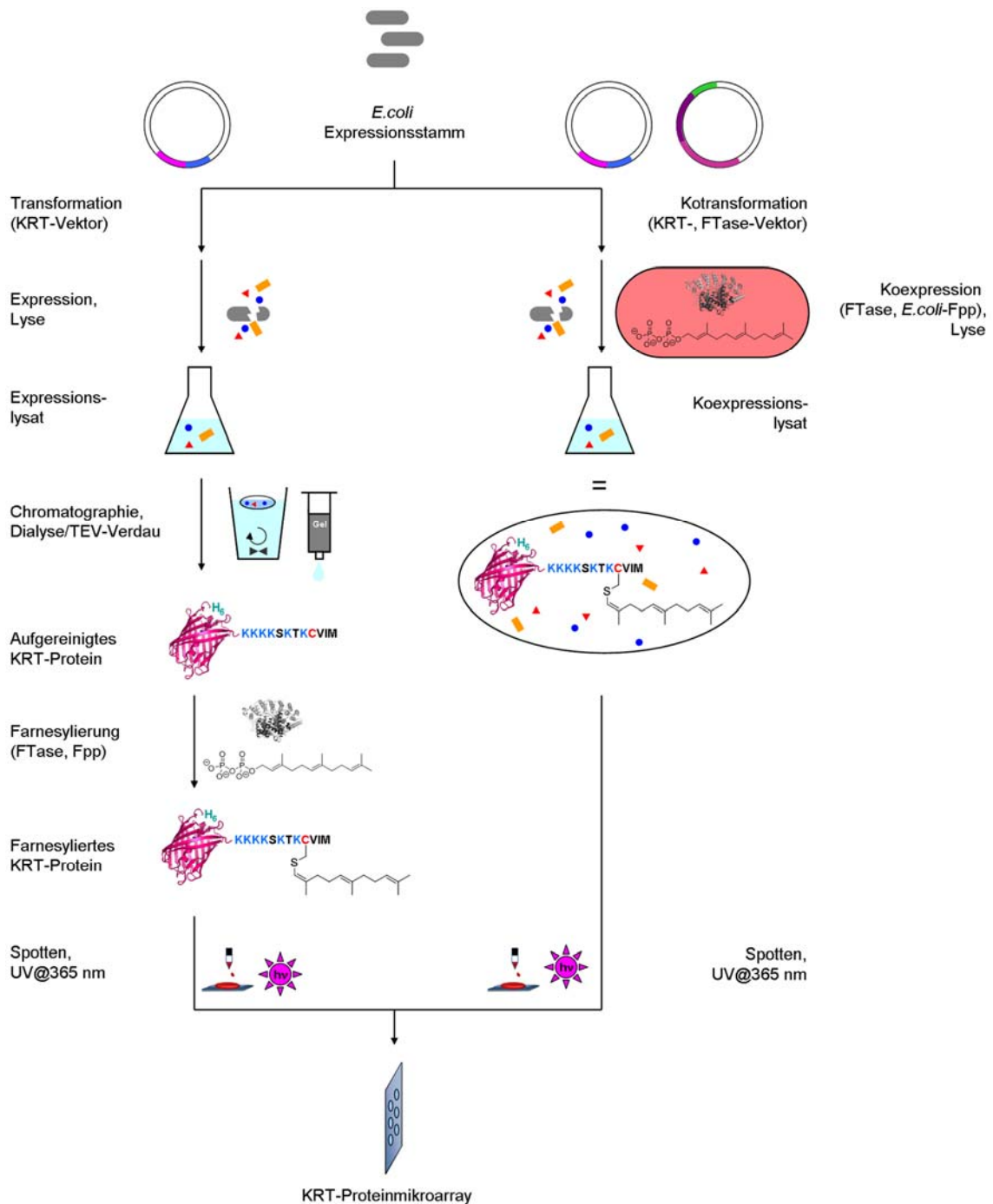


Abbildung 54: Schematischer Vergleich der Mikroarrayherstellung ausgehend von aufgereinigtem KRT-Protein oder Koexpressionslysat von KRT-Protein und FTase und unter Ausnutzung von endogenem *E. coli*-Fpp.

Vektoren, zwei für die FTase-Untereinheiten sowie ein Vektor für das KRT-modifizierte Zielprotein, vorausgesetzt. Diese Herangehensweise wurde jedoch als zu schwierig und daher als nicht generell anwendbar bewertet. Stattdessen wurde ein Plasmid verwendet, das für beide FTase-Untereinheiten gleichzeitig kodierte. Diese Strategie hatte den Vorteil, dass in der Koexpression nur zwei Plasmide mit zwei verschiedenen Antibiotikaresistenzen verwendet werden mussten. Ein Nachteil war die schlecht kontrollierbare Expression der beiden FTase-

Untereinheiten, da der T7-Promoter des FTase-Plasmids nur der α -Untereinheit vorangeschaltet war.

3.7.2.2 Kolysatmikroarray von H₆-mCherry-4KRTFar und FTase - Vorversuche

Da das für die gleichzeitige Expression beider FTase-Untereinheiten vorliegende Plasmid (pGATEV-H₆-GST-FTase- α /FTase- β , AG Alexandrov, MPI Dortmund) für eine Ampicillin-resistenz kodierte, war es notwendig, ein H₆-mCherry-4KRT-Plasmid mit einer orthogonalen Resistenz zu generieren (Kanamycin). Wie zuvor wurde mittels PCR und mit Hilfe eines geeigneten Primerpaares eine Oligonukleotidsequenz für H₆-mCherry-4KRT generiert und in ein Plasmid mit Kanamycinresistenz kloniert (pET27b). Nachfolgend wurden *E.coli*-Expressionskulturen mit den Plasmiden für H₆-mCherry-4KRT und FTase kotransformiert und 24 Stunden bei 20 °C überexprimiert. Während die Koexpression von H₆-GST-FTase- α und H₆-mCherry-4KRT erfolgreich verlief, wurde nur wenig FTase- β nachgewiesen (Abbildung 55e). Die Menge an vorhandener FTase- β wurde jedoch als ausreichend bewertet, da vermutlich nur katalytische Mengen rekonstituierter FTase zur Farnesylierung des KRT-modifizierten Proteins in der Zelle benötigt werden. Die Konzentration des enthaltenen H₆-mCherry-4K konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie und Vergleich mit aufgereinigtem Protein bestimmt werden.

Zur Generierung eines Mikroarrays wurde das Kolysat in verschiedenen Konzentrationen auf einen thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger gespottet (Abbildung 55a). Zu einigen Lösungen wurden zuvor Fpp und FTase gegeben, um durch einen Vergleich mit dem ursprünglichen Kolysat die Vollständigkeit der Farnesylierung in *E.coli* überprüfen zu können. Als Kontrollen wurden aufgereinigtes H₆-mCherry-4KRTFar sowie H₆-mCherry-4KRT verwendet. Photoimmobilisierung erfolgte durch zehnmündige UV-Bestrahlung bei 365 nm. Wie in Abbildungen 55b und 55d gezeigt, konnten für das Koexpressionslysate Punkte auf der Oberfläche detektiert werden, so dass die Validität der Herangehensweise demonstriert wurde. Die Zugabe von Fpp und FTase zu Koexpressionslysateproben führte zu keinem eindeutigen Ergebnis (Abbildung 55c). Ferner lag die für die Kolysatepunkte beobachtete Fluoreszenzintensität nur bei ca. 10-15 % des Intensitätsbereichs der aufgereinigten Proteine, so dass weitere Optimierung notwendig war.

Problematisch war ein schlechtes Intensitätsverhältnis zwischen aufgereinigtem H₆-mCherry-4KRTFar und H₆-mCherry-4KRT von nahezu 1:1 (Abbildung 55b), das auf zu niedrige Reduktionsmittelkonzentration und daraus resultierende Disulfidbildung zwischen H₆-mCherry-4KRT und der Oberfläche zurückgeführt wurde (siehe nachfolgender Abschnitt).

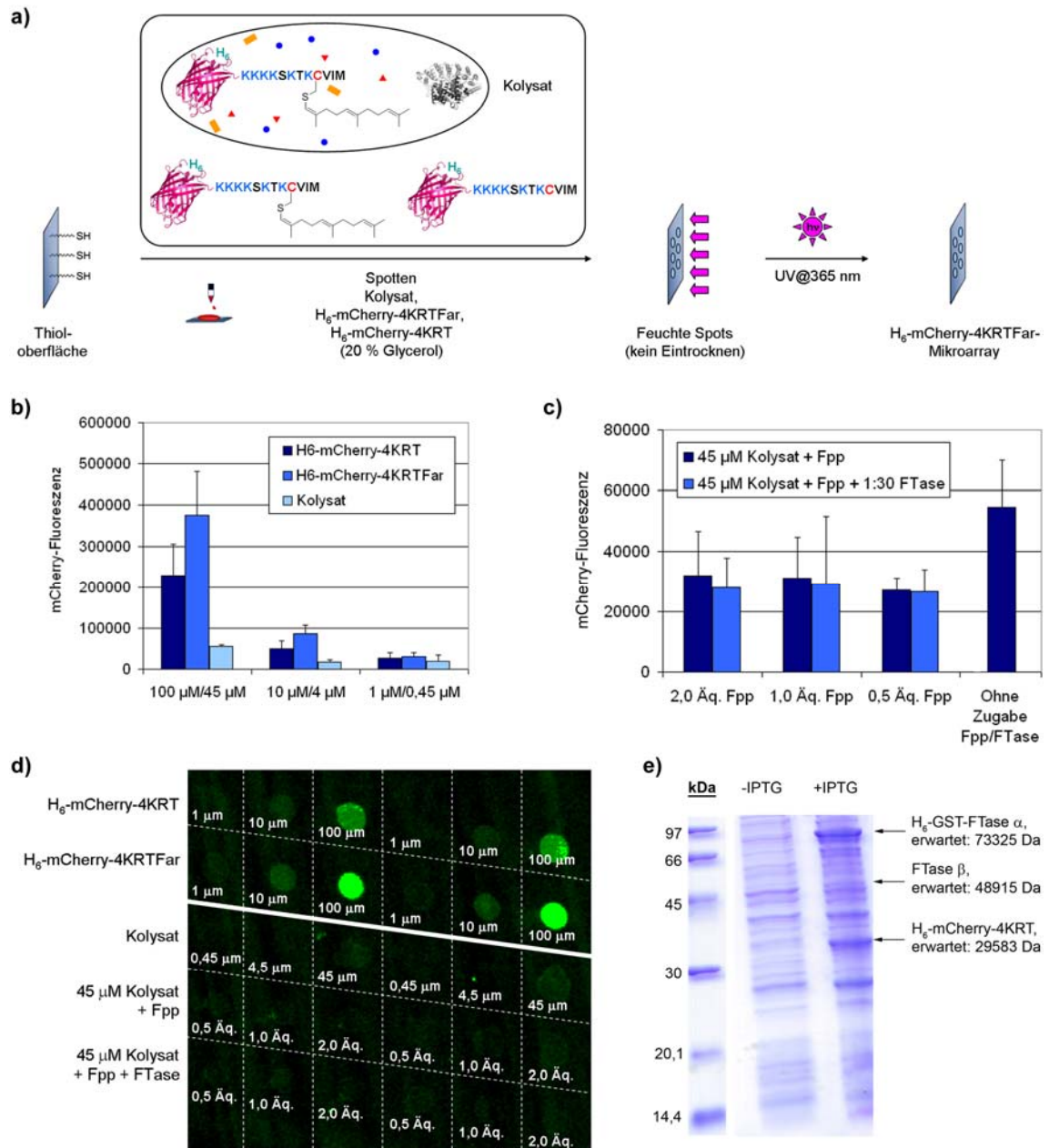


Abbildung 55: H₆-mCherry-4KRTFar-Mikroarray, hergestellt ausgehend von Koexpressionslysat von H₆-mCherry-4KRT und FTase sowie unter Ausnutzung von endogenem *E.coli*-Fpp. a) Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs. b) Quantitative Auswertung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (100-1 μM: aufgereinigte Proteine, 0,45-45 μM: Kolysat). c) Quantitative Auswertung in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenem Fpp und FTase. d) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrays. e) SDS-PAGE des verwendeten Kolysats.

3.7.2.3 Kolysatmikroarray von H₆-mCherry-4KRTFar und FTase – optimierte Bedingungen

Zur Verbesserung der Kolysatmikroarrayherstellung wurde zunächst eine Optimierung der Koexpressionsbedingungen durchgeführt, um die Expression von H₆-GST-FTase- α und FTase- β zu steigern. Für diese Optimierung wurde Rab6A-4KRT, eine Tetralysin-KRT-modifizierte Variante von Rab6A verwendet, die in den Vektor pET30a mit Kanamycinresistenz kloniert worden war. Die Vektoren für Rab6A-4KRT und FTase wurden in *E.coli* kotransformiert und unter Variation der IPTG-Konzentration, der Expressionstemperatur sowie der Expressionszeit überexprimiert. Abbildung 56 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Kolysate. Erkennbar ist eine erhöhte Expression von H₆-GST-FTase- α und FTase- β bei steigender Expressionstemperatur und IPTG-Konzentration bis zu einem Maximum bei 30-37 °C und 1 mM IPTG. Verlängerung der Expressionszeit von vier bis sechs Stunden auf 20 Stunden hatte bei diesen Bedingungen hingegen keinen sichtbaren Effekt. Die Expression von Rab6A-4KRT war durchgehend schwach, erreichte jedoch nach 20 Stunden bei dieser Temperatur und IPTG-Konzentration ebenfalls die höchste Überexpression.

Diese Bedingungen wurden nachfolgend auf die Koexpression von H₆-mCherry-4KRT und FTase angewandt. Nach Kotransformation in *E.coli*, Induktion mit 1 mM IPTG sowie Überexpression bei 37 °C für 20 Stunden wurde für alle Proteine ausreichend hohe Expression detektiert, jedoch war die mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Konzentration von H₆-mCherry-4KRT mit 0,25 μ M stark reduziert. Eine Untersuchung der abgetrennten, unlöslichen Bestandteile zeigte hohe Anteile an H₆-mCherry-4KRT und FTase (Abbildung 57 links). Es wurde daher angenommen, dass die Kombination aus langer Expressionszeit von 20 Stunden und hoher Temperatur von 37 °C zur vermehrten Denaturierung der Proteine führte. Durch Absenken der Temperatur auf 30 °C konnte dieses Problem gelöst werden. Nach Induktion mit 0,3 mM IPTG führte Koexpression bei 30 °C für 20 Stunden zu einer ausreichend hohen H₆-mCherry-4KRT-Konzentration von 78 μ M bei ausreichend hoher Expression beider FTase-Untereinheiten (Abbildung 57 rechts).

Eine Optimierung der schlechten Photoimmobilisierung aus Kolysat (siehe voriger Abschnitt) sollte durch Funktionalisierung der Oberfläche mit dem längeren Thiolankers **40** anstelle von Cystamin erreicht werden (Abbildung 58a, siehe außerdem Abbildung 14b). Es wurde vermutet, dass auf diese Weise sterische Hinderung an der Thioloberfläche reduziert und damit die Photoimmobilisierungseffizienz gesteigert werden könnte.

Ein weiteres Problem bei der Immobilisierung KRT-modifizierter Proteine bestand in häufig hoher, unspezifischer Immobilisierung der nicht-farnesylierten Kontrollproteine (siehe Abschnitte 3.6.6.2, 3.6.7 und 3.7.7.2). Diese Beobachtung wurde auf Disulfidbildung als Nebenreaktion zwischen dem freien Cysteinrest am KRT des nicht-farnesylierten Proteins und

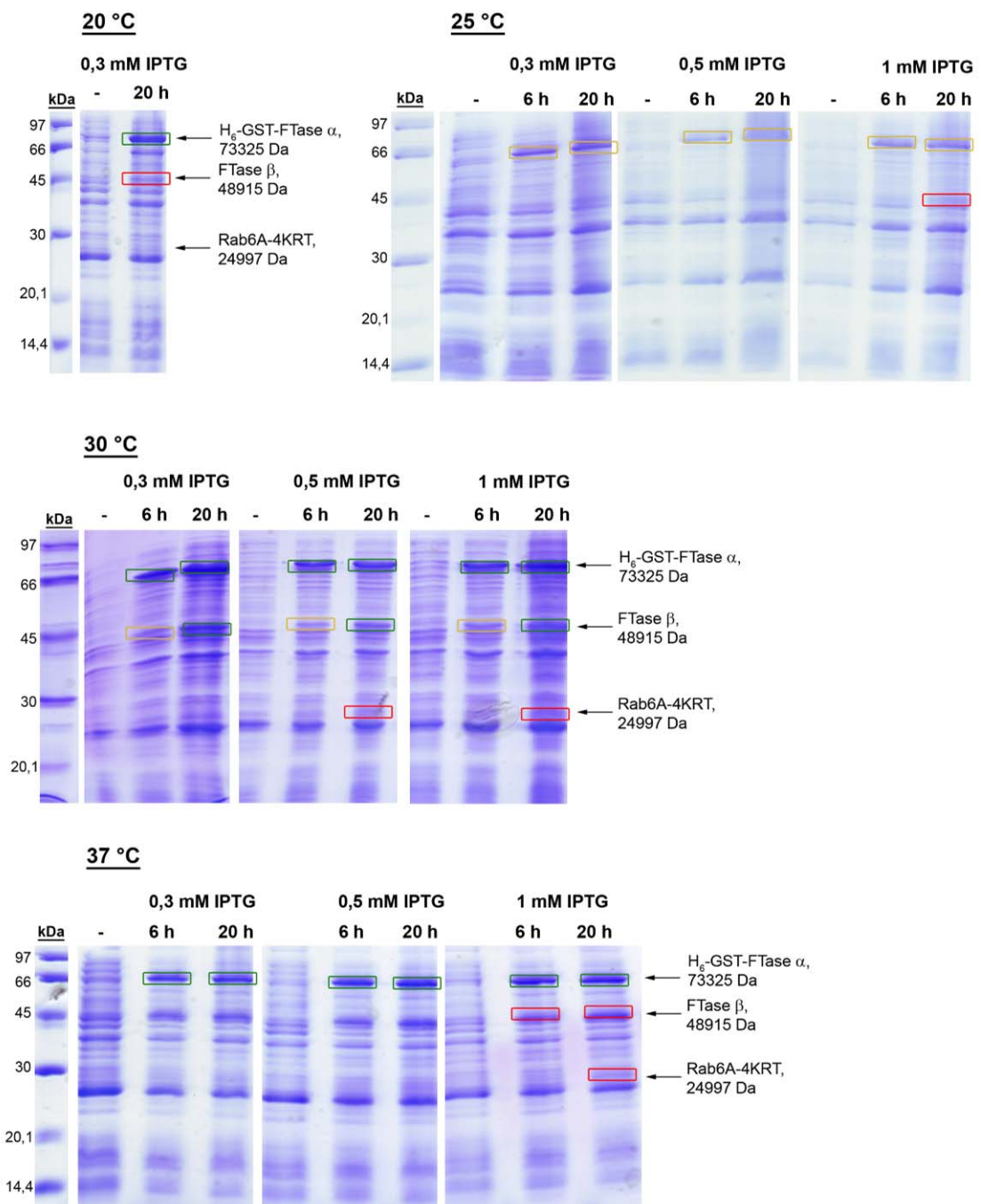


Abbildung 56: Optimierung der Koexpression von FTase und Rab6A-4KRT. Gezeigt sind SDS-PAGE-Analysen von Koexpressionen bei verschiedenen Temperaturen, IPTG-Konzentrationen und Expressionszeiten. Relevante Banden sind farblich markiert (grün: intensiv, gelb: mittel, rot: schwach).

3. Allgemeiner Teil

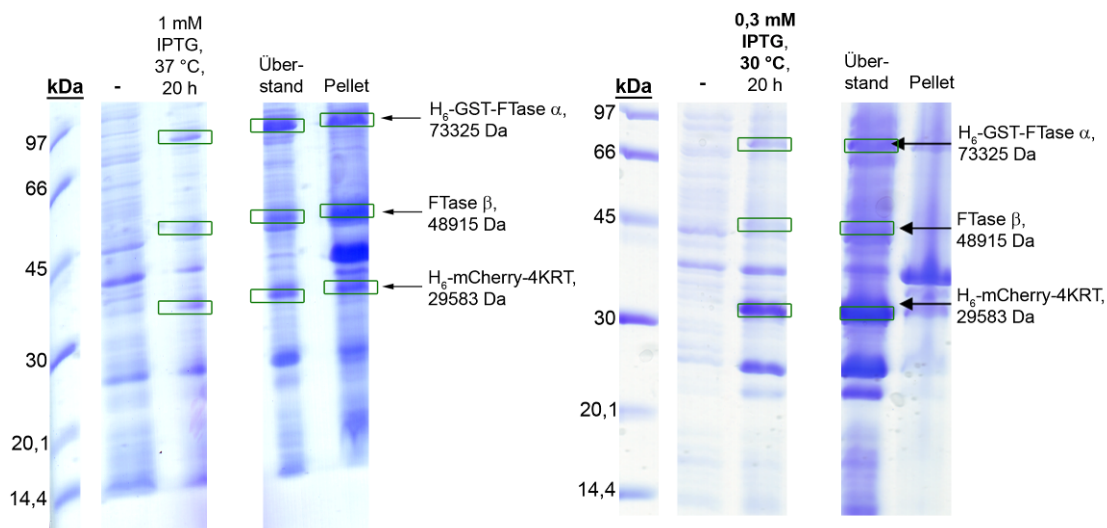


Abbildung 57: Koexpression von FTase und H₆-mCherry-4KRT. Links: Koexpression bei 37 °C, 20 Stunden und 1 mM IPTG. Relevante Proteinbanden werden nach Lyse und Ultrazentrifugation sowohl im Überstand als auch im Pellet gefunden. Rechts: Koexpression bei 30 °C, 20 Stunden und 0,3 mM IPTG. Relevante Proteinbanden werden fast nur im Überstand gefunden.

der Thioloberfläche zurückgeführt. Disulfidbildung war eine bekannte Nebenreaktion der Thiol-En-Reaktion.^[56] Die durch den KRT induzierte Anlagerung des KRT-modifizierten Proteins an die Oberfläche könnte die Nebenreaktion, in diesem Fall zwischen der Cysteinseitenkette und Thiolgruppen an der Oberfläche, verstärken. Bislang verwendete Reduktionsmittelkonzentrationen schienen nicht ausreichend hoch zu sein und sollten daher erhöht werden.

Unter Einsatz der neuen Oberfläche mit langem Thiolanker wurde ein Mikroarray des Kolysats von H₆-mCherry-4KRT und FTase sowie des Lysats von H₆-mCherry-4KRT als Kontrolle hergestellt. Verschiedene Konzentrationen der Reduktionsmittel DTT und TCEP wurden dabei zugesetzt (Abbildung 58b, thiol-PAMAM-funktionalisierter SiO_x/Si-Objektträger und zehninminütige Bestrahlung bei 365 nm). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 58c und 58d dargestellt. Zusatz von 10 mM DTT führte zu einem Intensitätsverhältnis zwischen Kolysat mit farnesyliertem Protein und Lysat von nicht-farnesyliertem H₆-mCherry-4KRT von 6:1. Die unspezifische Immobilisierung des nicht-farnesylierten Proteins konnte somit reduziert werden. Ferner wurde das S/N-Verhältnis durch insgesamt höhere Fluoreszenzintensitäten verbessert. Diese Beobachtung wurde auf die Verwendung des langen Thiolankers **40** zurückgeführt.

In einem weiteren Experiment wurden Kolysat und H₆-mCherry-4KRT-Lysat unter Zusatz von externem Fpp und FTase gespottet, um die Vollständigkeit der Farnesylierung im Kolysat zu überprüfen. Abbildungen 58e und 58f zeigen die Ergebnisse. Zusatz von FTase und Fpp führte zu keiner weiteren Steigerung der Intensität, so dass vollständige Farnesylierung von

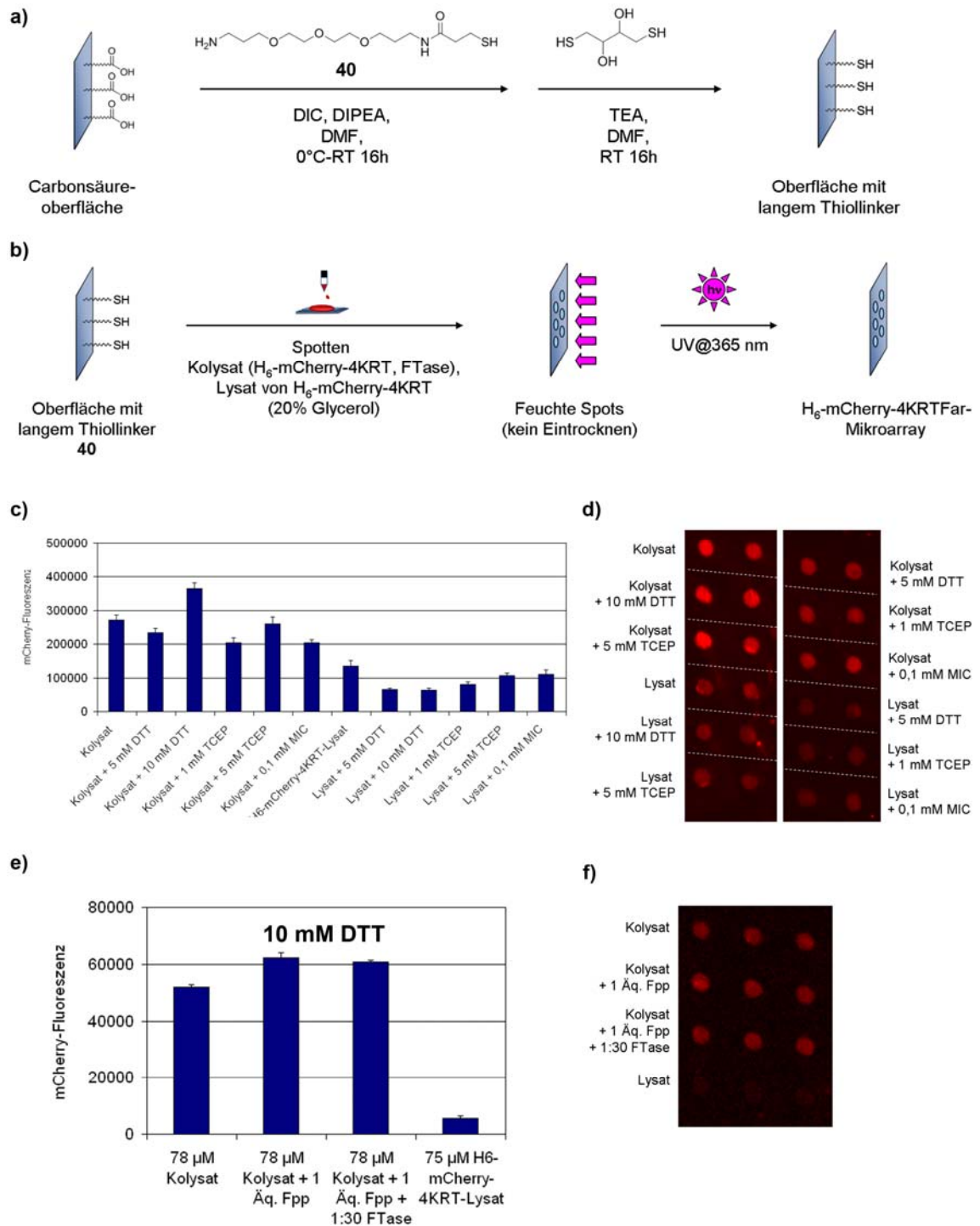


Abbildung 58: Optimierung der Herstellung von Koexpressionslysatmikroarrays mit der Thiol-En-Photoimmobilisierung. a) Funktionalisierung von Carbonsäure-PAMAM-Oberflächen mit dem langem Thiollinker **40** anstelle von Cystamin. b) Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs der Kolysatmikroarrayherstellung (Farnesylierung von H_6 -mCherry-4KRT durch coexprimierte FTase und endogenes *E.coli*-Fpp). c) Quantitative Auswertung des Kolysatmikroarrays von H_6 -mCherry-4KRT und FTase unter Verwendung verschiedener Reduktionsmittel und MIC. d) Fluoreszenzaufnahme zu c). e) Quantitative Auswertung des Kolysatmikroarrays von H_6 -mCherry-4KRT und FTase unter Zusatz von externem Fpp und aufgereinigter FTase.

3. Allgemeiner Teil

H₆-mCherry-4KRT durch die koexprimierte FTase unter Ausnutzung von endogenem *E.coli*-Fpp vermutet werden kann. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Hypothese eindeutig zu beweisen, da kein direkter Nachweis der Farnesylierung erfolgte. Denkbar wäre z.B. Radiomarkierung von Fpp in *E.coli*. Versuche zur Isolation von farnesyliertem Protein aus Kolysat mit Hilfe chromatographischer Methoden resultierten in Denaturierung und Verlust des Proteins.

3.7.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass mit der Thiol-En-Reaktion die Photoimmobilisierung KRT-modifizierter und farnesylierter Proteine direkt aus *E.coli*-Expressionslysate möglich ist. Mit dieser Strategie können zeitaufwändige Proteinaufreinigungsschritte umgangen werden, so dass die Herstellung von Proteinbiochips beschleunigt wird. Koexpression KRT-modifizierter Proteine mit FTase scheint Farnesylierung mit endogenem *E.coli*-Fpp zu ermöglichen. Diese Strategie erlaubt die Generierung des KRT-modifizierten und farnesylierten Proteins durch Koexpression mit FTase in *E.coli* sowie dessen Immobilisierung direkt aus dem Koexpressionslysate, d.h. ohne weitere Aufreinigung oder chemische Modifikation. Es wurde ferner demonstriert, dass eine Reduktionsmittelkonzentration von 10 mM notwendig ist, um die nichtspezifische Immobilisierung des nicht-farnesylierten, KRT-modifizierten Proteins zu reduzieren, die auf Bildung von Disulfidbrücken zwischen KRT-Cystein und Thioloberfläche zurückzuführen ist. Verwendung des längeren Thiolankers **40** statt Cystamin in der Thiolfunktionalisierung der für die Photoimmobilisierung verwendeten Oberflächen führte darüber hinaus zu einer Verbesserung der Photoimmobilisierungseffizienz.

3.8 Thiol-En-Nanostrukturierung

3.8.1 Nanostrukturierung unter Verwendung von Spin-Coating

Die Erzeugung von Oberflächenstrukturen im Nanometerbereich zur Herstellung von Nanobiochips ist in den vergangenen Jahren intensiv erforscht worden, da sie einen höheren Miniaturisierungsgrad, d.h. eine im Fall von Nanoarrays größere Dichte verschiedener Biomoleküle auf der Oberfläche oder auch eine Verkleinerung von Biochips ermöglicht. Während auf derzeit kommerziell verfügbaren Mikroarrays Tausende von Biomolekülen parallel analysiert werden, könnten Biomolekülnanoarrays diese Zahl vervielfachen und auf diese Weise z.B. detailliertere und umfassendere Untersuchungen komplexer biologischer Netzwerke ermöglichen. Alternativ wären miniaturisierte, nanobiotechnologische

Analyseplattformen denkbar. Obwohl sich die Thiol-En-Mikrostrukturierung für die Erzeugung von Mikrostrukturen einer Größe von weniger als ca. $10\ \mu\text{m}$ eignet (siehe Abbildung 15), war nicht bekannt, ob eine weitere Verringerung der Strukturgröße in Bereiche unterhalb eines Mikrometers möglich war. Da dieser Längenbereich mit der bislang für die Thiol-En-Photomikrostrukturierung verwendeten Photolithographieausrüstung nicht zugänglich war, wurde konfokale Lasermikroskopie eingesetzt, um die Erzeugung sub-mikrometergroßer Strukturen voranzutreiben. Apparativer Aufbau und schematischer Arbeitsablauf der Untersuchung sind in den Abbildungen 59a und 59b dargestellt. Mittels Spin-Coating wurde auf

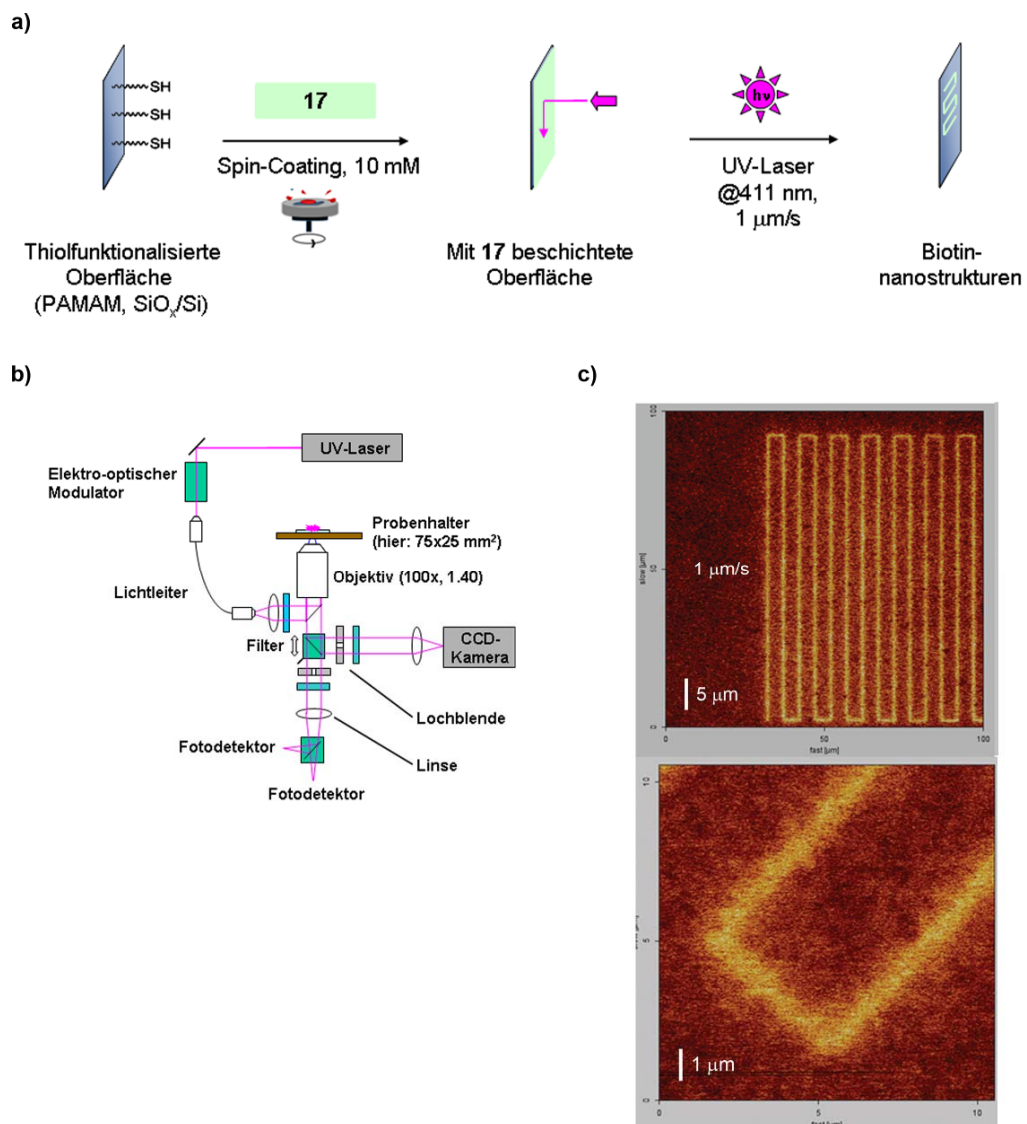


Abbildung 59: a) Thiol-En-Nanostrukturierung von **17** mittels Spin-Coating. Nanostrukturen wurden mit Hilfe eines an einen UV-Laser gekoppelten, konfokalen Lasermikroskops auf die beschichtete Oberfläche geschrieben. Nachweis erfolgte mit Streptavidin-Cy5 (10 mM **17** in DMF/Toluol 3:1). b) Schematischer Aufbau des verwendeten Lasermikroskops. c) Erhaltene, mit Streptavidin-Cy5 visualisierte Biotin-nanostrukturen in zwei Vergrößerungsstufen. Die Linienbreite beträgt weniger als $1\ \mu\text{m}$.

3. Allgemeiner Teil

einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Objektträger ein Film der olefin-funktionalisierten Biotinverbindung **17** erzeugt. Nachfolgend wurden mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops, das an einen Laser mit einer Emissionswellenlänge von 411 nm gekoppelt war, softwaregesteuert Linienstrukturen auf die Objektträgeroberfläche geschrieben. Nach Waschen der Oberfläche und Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin wurden mit Hilfe des Mikroskops Biotinstrukturen in einer Größe von 650 nm auf der Oberfläche nachgewiesen (Abbildung 59c). Dieses Ergebnis lässt die Voraussage zu, dass die Erzeugung und Detektion von noch kleineren Strukturen mit Hilfe von Thiol-En-Nanostrukturierung grundsätzlich möglich sein sollte. Da es sich bei der Thiol-En-Photoimmobilisierung um eine optische Methode handelt, verhindert das Beugungslimit den Einsatz konventioneller optischer Methoden zur Erzeugung von Strukturen in Nanometergröße. Das Beugungslimit könnte jedoch mit Hilfe von optischen Nahfeldmethoden (SNOM, scanning near-field microscopy) umgangen werden,^[14, 15] um Thiol-En-Photonanostrukturierung im unteren Nanometerbereich zu ermöglichen

3.8.2 Nanostrukturierung unter Verwendung von Drop-Casting

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Experimente zur Thiol-En-Photonanostrukturierung basierten auf mittels Spin-Coating beschichteten Oberflächen. Diese Verfahren ist für Proteine nicht einsetzbar, da durch das Eintrocknen des Lösungsfilms auf der Oberfläche die Gefahr der Denaturierung besteht. Es war daher sinnvoll, die Erzeugung von Strukturen im Submikrometerbereich in Lösung, d.h. mittels Drop-Casting als Applizierungsmethode zu untersuchen, um eine proteinkompatible Photonanostrukturierungsmethode entwickeln zu können.

Als UV-Lichtquelle wurde ein konfokales Lasermikroskop verwendet, das an einen Laser mit der Wellenlänge 405 nm gekoppelt war. Da der Mikroskopaufbau kein Objektträgerformat zuließ ($75 \times 25 \text{ mm}^2$), wurden Glasdeckgläschen mit dem Durchmesser 25 mm mit der Thiol-PAMAM-Funktionalisierung versehen. Den Arbeitsablauf der Nanostrukturierung zeigt Abbildung 60a. Ein funktionalisiertes Glasdeckgläschen wurde im Probenhalter fixiert, eine geringe Menge einer Lösung von **18** in Wasser/Ethylenglykol 3:1 aufgebracht, und durch Aufbringen eines zweiten Glasdeckgläschens im Abstand von einigen Millimetern zwei parallele Glas-Flüssigkeitsgrenzflächen erzeugt. Die der Lösung zugewandte, funktionalisierte Glasoberfläche wurde mit Hilfe des UV-Lasers beschrieben, und immobilisiertes Biotin nachfolgend mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin detektiert. Analyse der Oberfläche erfolgte wiederum mit dem konfokalen Lasermikroskop. Ergebnisse der Photonanostrukturierung sind in Abbildung 60b gezeigt. 20 Sekunden Bestrahlungszeit führten zu schwach sichtbaren Strukturen, die nach 5 Minuten Bestrahlungszeit deutlich sichtbar wurden (S/N-Verhältnis etwa

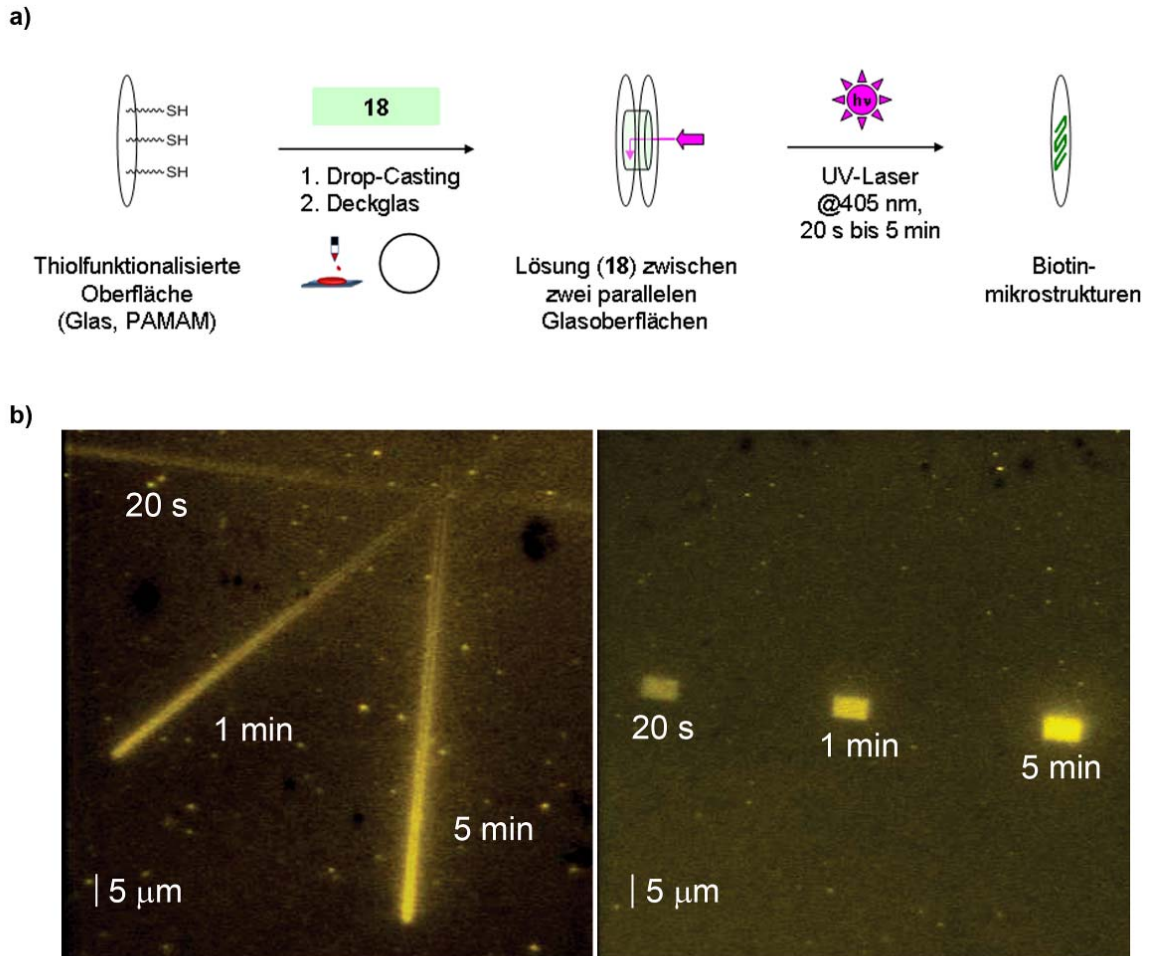


Abbildung 60: a) Photonanostrukturierung mittels Drop-Casting von **18**. Ein Tropfen einer Lösung von **18** wurde auf ein thiol- und dendrimerfunktionalisiertes Deckglas aufgebracht und mit einem zweiten Deckglas im Abstand von einigen Millimetern abgedeckt, um zwei parallele Grenzflächen zu erhalten. Mit Hilfe eines Lasermikroskops wurden mit einem UV-Laser Strukturen auf die beschichtete Oberfläche geschrieben (10 mM **18** in Wasser/Ethylenglykol 3:1). b) Fluoreszenzaufnahmen der erhaltenen Biotinstrukturen, die mit Streptavidin-Cy5 nachgewiesen wurden.

2:1 im Fall der Linien bzw. etwa 4:1 im Fall der Rechtecke). Die Breite der erzeugten Linien beträgt etwa 1,5 µm. Minimierung der Strukturgröße ist somit auch in Lösung grundsätzlich möglich und könnte Photonanostrukturierung von Proteinen ermöglichen. Eine zusätzliche Reduktion der Strukturgröße in den niedrigen Nanometerbereich könnte mit Nahfeldmethoden erreicht werden.^[14, 15]

3.8.3 Nanostrukturierung unter Verwendung von Mikrofluidik

Ein mikrofluidisches System (siehe Abschnitt 3.3.2) wurde ebenfalls genutzt, um die Thiol-En-Nanostrukturierung von Biotinverbindung **17** in Lösung zu untersuchen. Eine Übersicht gibt

3. Allgemeiner Teil

Abbildung 61. Nach Fixierung eines mikrofluidischen PDMS-Chips auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Objektträger wurde der mikrofluidische Kanal, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, zunächst mit einer Lösung von **17** befüllt. Mit Hilfe eines an ein konfokales Lasermikroskop gekoppelten UV-Lasers (411 nm) wurden Nanostrukturen auf die mit dem befüllten Kanal in Kontakt stehende, funktionalisierte Oberfläche geschrieben. Der Nachweis immobilisierten Biotins erfolgte mit Streptavidin-Cy5, das mit dem konfokalen Lasermikroskop detektiert wurde. Es konnten keine Nanostrukturen detektiert werden. Eine mögliche Erklärung ist die kontinuierliche Schreibbewegung des UV-Lasers, die die Dauer der UV-Bestrahlung im jeweils bestrahlten Punkt auf der Oberfläche so sehr reduziert haben könnte, dass keine Photoreaktion erfolgte. Im Fall der in Abschnitt 3.8.1 mittels Spin-Coating beschichteten Oberfläche befanden sich die Reaktionspartner bereits in unmittelbarer Nähe zueinander, so dass die Photoreaktion trotz der nur kurzen Laserbestrahlung ablaufen konnte ($1 \mu\text{m/s}$ Schreibgeschwindigkeit). Die in Abschnitt 3.8.2 gezeigte Photonanostrukturierung, in der Nanostrukturen erhalten wurden, nutzte hingegen eine kontinuierliche Bestrahlung mit UV-Laserlicht.

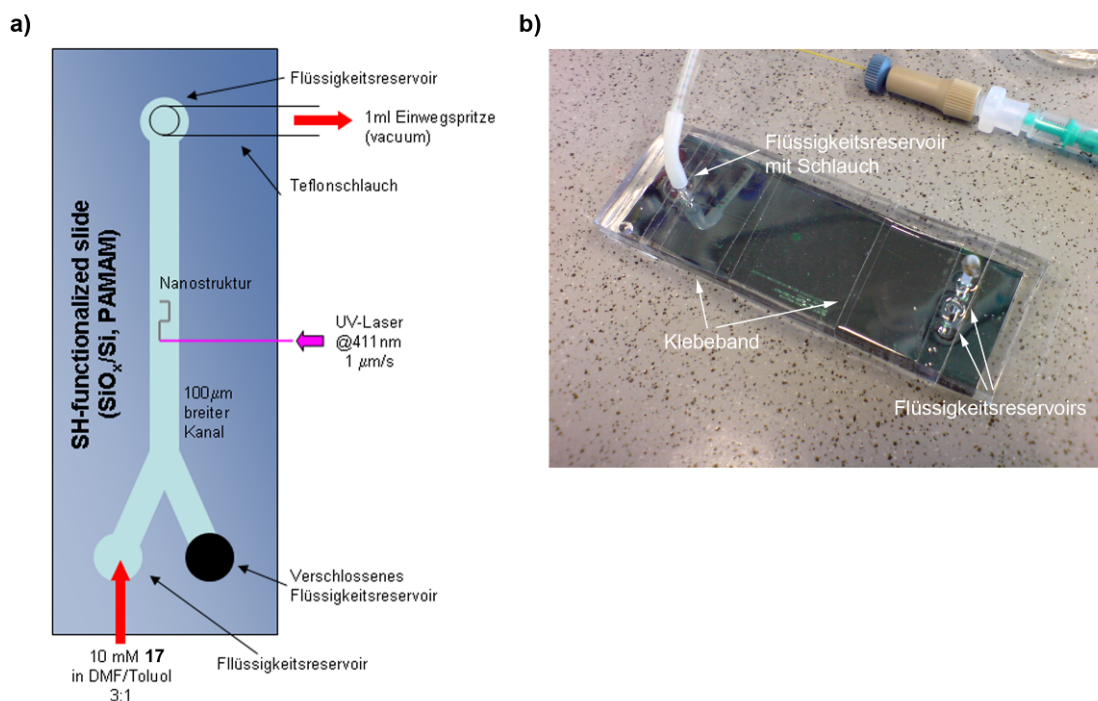


Abbildung 61: Thiol-En-Nanostrukturierung mit Hilfe eines mikrofluidischen Systems. a) Schematische Darstellung des verwendeten mikrofluidischen Systems. b) Aufnahme des verwendeten mikrofluidischen Systems.

3.8.4 Zusammenfassung

Die Thiol-En-Nanostrukturierung gelang mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie sowohl in Lösung als auch an mit Spin-Coating hergestellten Filmen olefinfunktionalisierter Biotinverbindungen. Im ersten Fall konnten Strukturen einer Größe von 1,5 μm erzeugt werden, während im zweiten Fall eine minimale Größe von 650 nm erreicht wurde. Obwohl eine weitere Reduzierung der Strukturgröße aufgrund des Beugungslimits Grenzen gesetzt sind, wäre der Einsatz von Nahfeldmethoden zur Umgehung des Beugungslimits denkbar. ^[14, 15]

4. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung und Anwendung der Thiol-En-Reaktion zur Herstellung von mikrostrukturierten Biochips und Biomolekülmikroarrays (Abbildung 62a). Der Etablierung einer Photoimmobilisierungsmethode ging eine Untersuchung der Thiol-En-Reaktion in Lösung voraus, um geeignete Reaktanden und Reaktionsbedingungen zu identifizieren. Im Rahmen dieser Vorversuche kristallisierten sich terminale und sterisch ungehinderte Thiol- und Olefinverbindungen als günstigste Reaktanden heraus, so dass diese als Grundlage für alle nachfolgend verwendeten Anker-moleküle genutzt wurden. Ferner zeigte die Thiol-En-Reaktion Kompatibilität zu verschiedensten Lösungsmitteln, aber auch zu physiologischen Reaktionsbedingungen, d.h. wässrigen Medien bei pH-Werten um 7 und Raumtemperatur. Zudem war Initiierung der Reaktion mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm möglich, die kompatibel zu komplexen Biomolekülen, wie z.B. Proteinen, ist.

Die Entwicklung und Optimierung eines Photomikrostrukturierungsprozesses wurde mit Biotin vorgenommen. Verschiedene Oberflächentypen und -funktionalisierungen sowie verschiedene Reaktandenkonzentrationen, Ankersysteme und Reaktionsparameter wurden getestet. Als günstigste Oberfläche wurde mit Siliziumoxid beschichtetes Silizium identifiziert, da dieses bei einer Siliziumoxidschichtdicke von 500 nm verglichen mit dem Standardträgermaterial Glas zu einer zehnfach höheren Photoimmobilisierungseffizienz führte. Mit einer PAMAM-Dendrimerschicht konnte die Photoimmobilisierungseffizienz zusätzlich um den Faktor fünf erhöht werden. Eine Reaktandenkonzentration von 10 mM und eine Bestrahlungszeit von zehn Minuten wurden als bester Kompromiss für Photoimmobilisierungseffizienz, Biomolekülverbrauch und Schnelligkeit bestimmt (Abbildung 62b). Zudem wurden zwei Oberflächenbeschichtungsverfahren etabliert, die entweder milde Mikrostrukturierung mit geringem Biomolekülverbrauch oder höhereffiziente, aber materialaufwändigere Mikrostrukturierung ermöglichten. Mit der Photomikrostrukturierung eines Phosphopeptids wurde nachfolgend die Anwendbarkeit auf andere niedermolekulare Biomolekülklassen als Biotin gezeigt (Abbildung 62c). Mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops gelang zudem die Verkleinerung von Biotinstrukturen in den Nanometerbereich (Abbildung 62b, unten). Nanostrukturierte Biochips sind somit mit der Thiol-En-Photoimmobilisierung zugänglich.

In parallelen Experimenten wurde die Anwendung der Thiol-En-Reaktion zur Herstellung von Mikroarrays niedermolekularer Biomoleküle untersucht. Als Trägermaterial kam hier Glas zum Einsatz, da dieses als Standardträgermaterial für Biomolekülmikroarrays dient. Nach einer Optimierung mit Biotin wurde die Methode auf die Herstellung von Oligonukleotid-, Peptid- oder Glykopeptidmikroarrays ausgeweitet. In einem Anwendungsbeispiel konnten Glykopeptidmikroarrays nachfolgend erfolgreich zur immunologischen Analyse von Mausextrakten eingesetzt werden (Abbildung 62d).

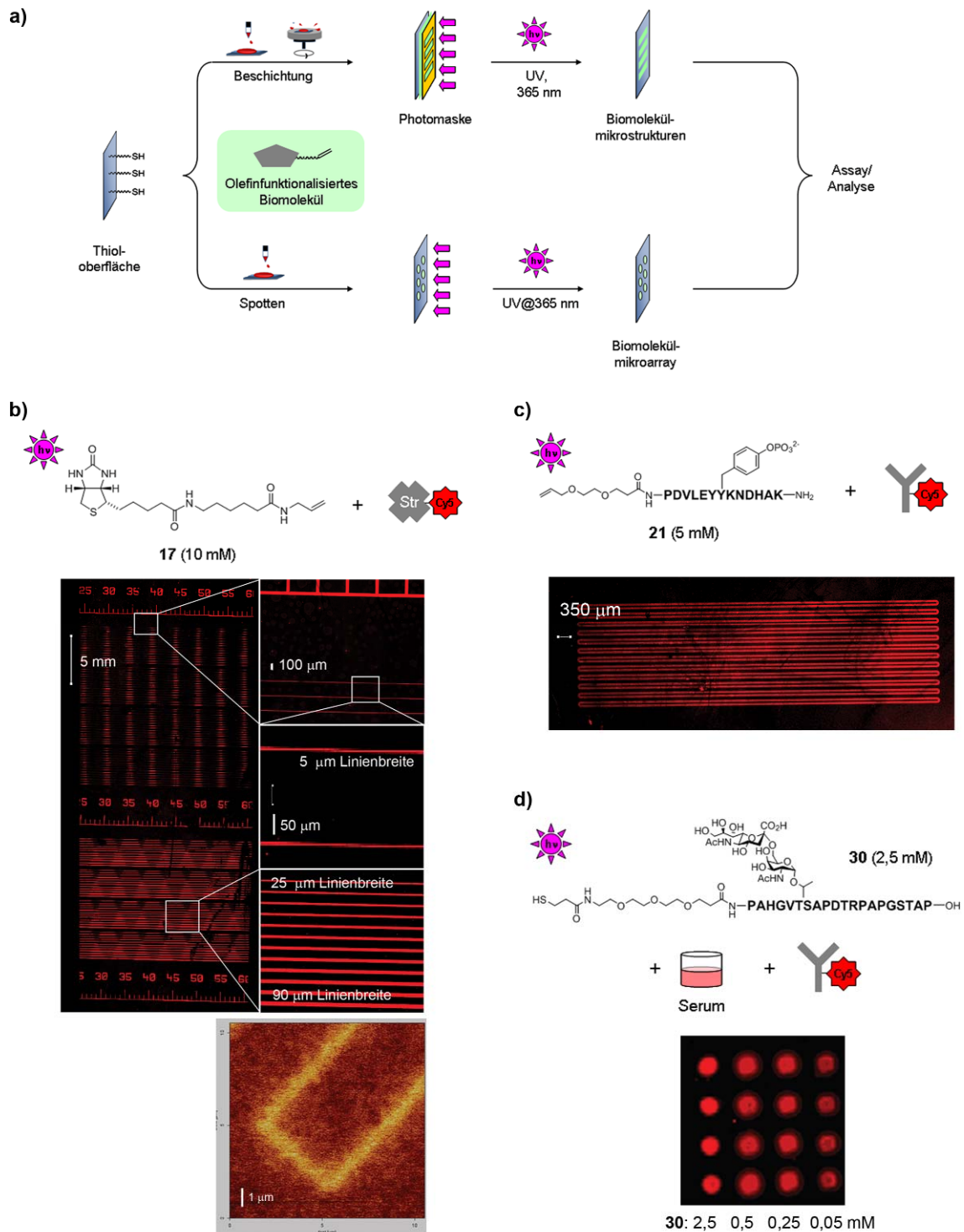


Abbildung 62: Thiol-En-Photoimmobilisierung niedermolekularer Biomoleküle. a) Schematischer Arbeitsablauf der Thiol-En-Photoimmobilisierung. Analog können Olefinoberflächen und thiole-funktionalisierte Biomoleküle verwendet werden. b) Fluoreszenzaufnahmen von Mikro- und Nanostrukturen der Biotinverbindung **17** auf SiO_x/Si -Objekträgern (500 nm SiO_x -Schichtdicke, Thiol-PAMAM-Funktionalisierung, Nachweis mit Streptavidin-Cy5). c) Fluoreszenzaufnahme von Mikrostrukturen des Phosphopeptids **21** (Nachweis mit Cy5-markiertem Antikörper). d) Fluoreszenzaufnahme eines Mikroarrays des MUC1-Glykopeptids **30**. Nach Inkubation mit Maus-Serum erfolgte ein Nachweis gebundener Antikörper durch einen markierten anti-Maus-Antikörper.

4. Zusammenfassung

Es folgten Experimente zur Photomikrostrukturierung von Oberflächen mit den komplexen und empfindlichen Proteinen. Unter Ausnutzung der Biotin-Streptavidin-Interaktion^[35] gelang die nicht-kovalente, gerichtete Immobilisierung biotinylierter CIAP (calf-intestine alkaline phosphatase, alkalische Phosphatase aus dem Kalbsdarm), ein in biologischen Analysemethoden etabliertes Enzym, auf Biotin-Streptavidin-Mikrostrukturen. Die enzymatische Aktivität der erhaltenen CIAP-Mikrostrukturen wurde erfolgreich nachgewiesen. Diese indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung wurde zudem auf die kleine GTPase N-Ras, einer Isoform von Ras, ausgeweitet. Bei gleichzeitiger Verwendung der aktiven, mit einem GTP-Analogon beladenen, und der inaktiven, GDP-beladenen Isoform konnte mit einem Interaktionspartner von Ras, der RBD (Ras-binding domain) von cRaf1, der Aktivierungszustand von biotinyliertem N-Ras auf der Biochipoberfläche unterschieden und somit die Aktivität des Proteins auf der Oberfläche nachgewiesen werden (Abbildungen 63a und 63b). Da mikrostrukturierte Biotinbiochips mit der Thiol-En-Photomikrostrukturierung schnell und einfach erzeugt werden können, sind mikrostrukturierte Proteinbiochips unter Einsatz dieser Strategie leicht zugänglich.

Die kovalent-gerichtete Thiol-En-Photomikrostrukturierung olefinfunktionalisierter Proteine konnte mit farnesyliertem K-Ras4B demonstriert werden (Abbildung 63d). Da diese jedoch im Fall von farnesyliertem H-Ras oder N-Ras scheiterte, H- N- und K-Ras4B aber bis auf ihre C-Termini, die den ungesättigten Farnesylrest tragen, stark ähnlich sind, wurde die hohe Immobilisierungseffizienz von K-Ras4B auf dessen polybasischen C-Terminus zurückgeführt. Die Funktionalisierungsstrategie zur Herstellung der verwendeten Thioloberflächen könnte zu negativ geladenen Oberflächen führen, die ladungsinduzierte Oberflächenanlagerung des positiv geladenen C-Terminus von K-Ras4B induzieren und so die Reaktion zwischen Farnesylrest und Thioloberfläche begünstigen könnte (K-Ras-C-Terminus-Hypothese oder KRT-Hypothese, Abbildung 63e).

Durch vier, den C-Terminus von K-Ras4B repräsentierende Peptide mit unterschiedlich langen Polylysinsequenzen wurde die KRT-Hypothese überprüft. Nach MIC-Ligation der Polylysinsequenzen an eine verkürzte N-Ras-Mutante mit C-terminalem Cystein (N-Ras¹⁻¹⁸¹), anschließender Farnesylierung *in vitro* und einem Vergleich der Immobilisierungsausbeuten wurde die Tetralysin-KRT-Sequenz KKKKSKTKCVIM als günstigstes Substrat für die Thiol-En-Photoimmobilisierung farnesylierter Proteine identifiziert.

Kovalent-gerichtete Thiol-En-Photoimmobilisierung zur Herstellung von Proteinmikroarrays wurde mit KRT-modifizierten und farnesylierten Proteinen untersucht. KRT-modifizierte Varianten der Proteine mCherry und Rab6A wurden durch Erstellung geeigneter Plasmide und Expression in *E.coli* erhalten. Nach Farnesylierung *in vitro* gelang die Herstellung von Mikroarrays mittels Thiol-En-Photoimmobilisierung mit nur zehn Minuten Bestrahlungszeit (Abbildungen 64a und 64b). Mit einem Rab6A-Mikroarray konnte ferner die Protein-Protein-

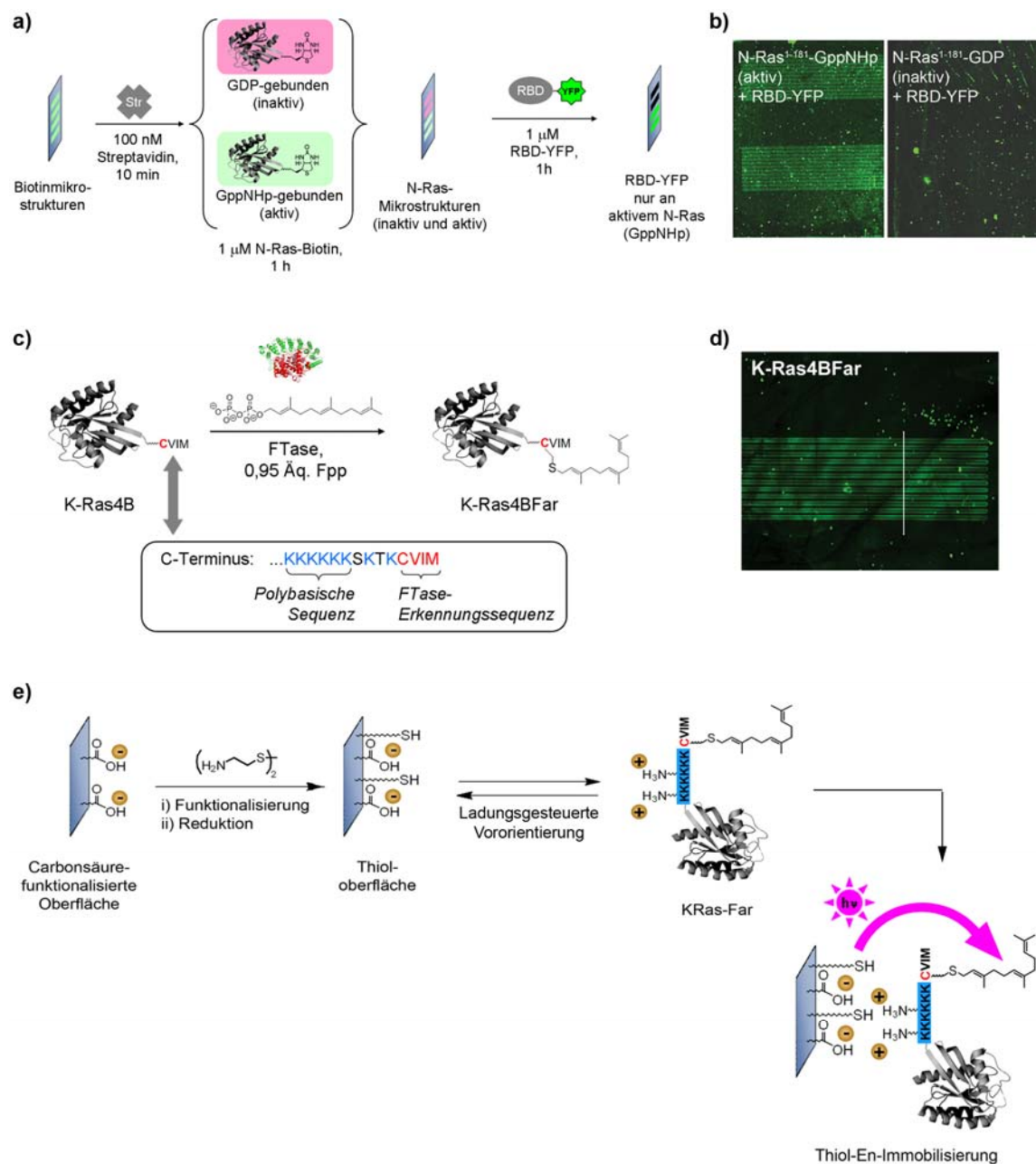


Abbildung 63: Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Proteinen. a) Indirekte Photoimmobilisierung von N-Ras-Biotin auf Biotinmikrostrukturen über eine intermediäre Streptavidinschicht. Aktives, GppNHP-beladenes und inaktives, GDP-beladenes N-Ras werden durch einen Bindungspartner von aktivem Ras, die Ras-binding-domain (RBD) von cRaf1, auf der Biochipoberfläche unterschieden. b) Fluoreszenzaufnahme von aktiven und inaktiven N-Ras-Mikrostrukturen nach Inkubation mit RBD-YFP (YFP-Fluoreszenz). c) Oben: *In-vitro*-Farnesylierung von Proteinen, hier K-Ras4B. Hervorgehoben ist die C-terminale Farnesyltransferase-Erkennungssequenz mit der Aminosäuresequenz CVIM (CAAX-Box). Unten: C-Terminus von K-Ras4B mit polybasischer Sequenz. d) Fluoreszenzaufnahme von Mikrostrukturen von K-Ras4Bfar (auf Thiol-PAMAM-SiO_x/Si-Oberfläche; Nachweis mit Cy3-markiertem Antikörper). e) KRT-Hypothese (K-Ras-C-Terminus). Der polybasische C-Terminus von K-Ras4Bfar induziert Vororientierung an die negativ geladene Oberfläche und erleichtert die Thiol-En-Photoimmobilisierung.

4. Zusammenfassung

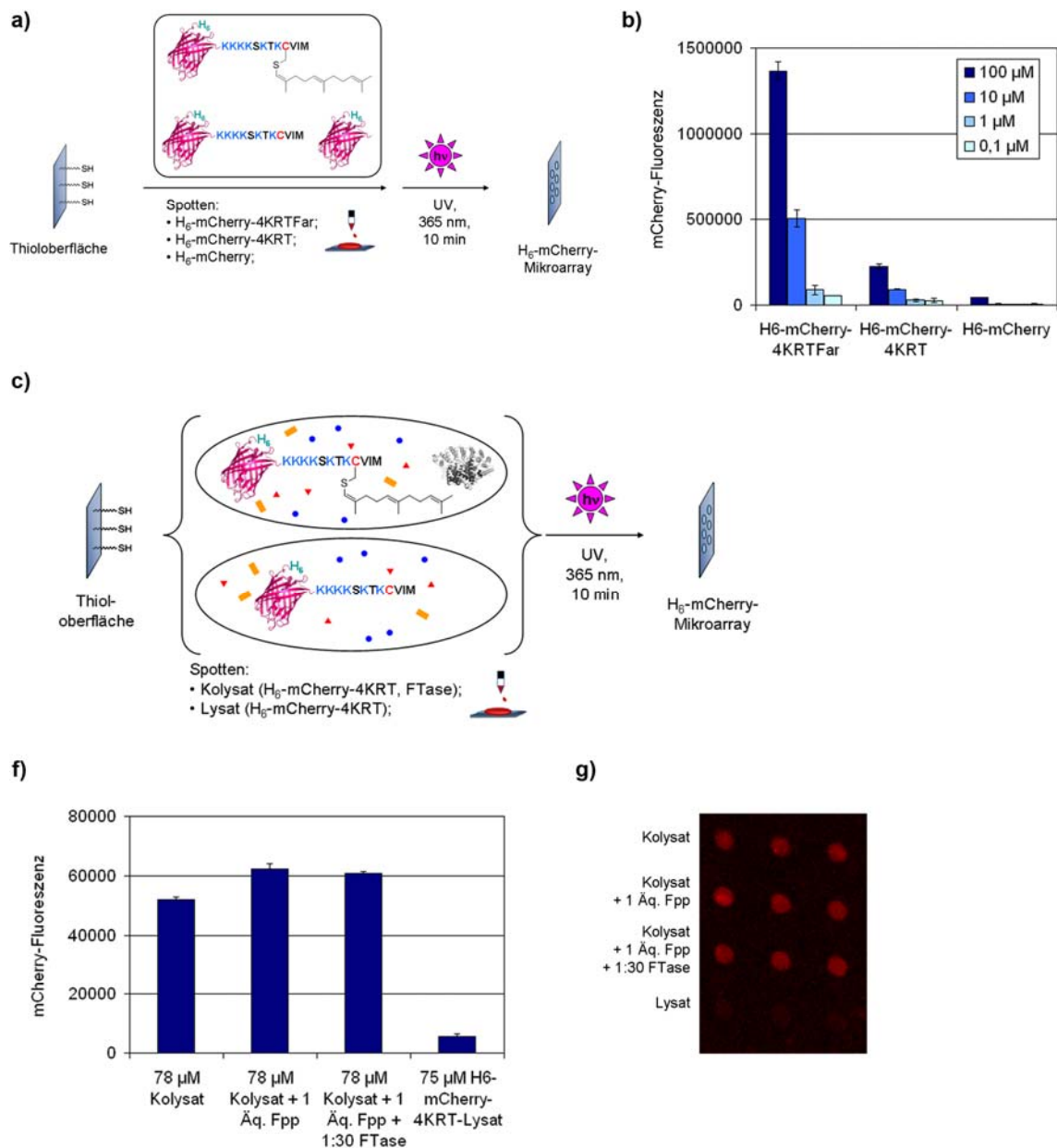


Abbildung 64: Thiol-En-Photoimmobilisierung KRT-modifizierter Proteine. a) Herstellung eines Mikroarrays von KRT-modifiziertem, farnesyliertem H₆-mCherry-4KRTFar (4KRT: KRT mit Tetralysinsequenz, nicht-farnesylierte H₆-mCherry-4KRT und H₆-mCherry als Kontrollen). b) Auswertung des Mikroarrays aus a). Nur farnesyliertes, KRT-modifiziertes H₆-mCherry-4KRTFar zeigt hohe Immobilisierungseffizienz. c) Herstellung eines Mikroarrays mit Lysat aus der Koexpression von H₆-mCherry-4KRT und FTase (Lysat mit H₆-mCherry-4KRT als Kontrolle). d) Auswertung des Mikroarrays aus c). Nur das Kolysat zeigt hohe Immobilisierungseffizienz. Zugabe von Fpp oder FTase steigern die Immobilisierungseffizienz nicht und deuten auf vollständige Farnesylierung im Kolysat hin. e) Fluoreszenzaufnahme des Mikroarrays aus c).

Interaktion zum Rab6A-Bindungspartner Bicaudal gezeigt werden. Proteinmikroarrays waren somit durch kovalent-gerichtete Thiol-En-Photoimmobilisierung farnesylierter, KRT-modifizierter Proteine schnell zugänglich. Ein großer Vorteil der Strategie bestand in der Tatsache, dass die KRT-Sequenz mittels molekularbiologischer Methoden in Proteine eingeführt wurde, so dass chemische Modifizierung entfiel.

Die Methode wurde ferner auf die Photoimmobilisierung von Proteinen aus Expressionslysaten ausgeweitet. KRT-modifiziertes mCherry wurde in *E.coli* exprimiert und ohne weitere Aufreinigung einer *in-vitro*-Farnesylierung unterzogen. Durch Thiol-En-Photoimmobilisierung gelang die Herstellung eines mCherry-Mikroarrays nach zehn Minuten Bestrahlungszeit. Thiol-En-Photoimmobilisierung von Proteinen war somit auch aus Expressionslysaten, d.h. ohne zeitaufwändige Aufreinigungsschritte, und in nur zehn Minuten Reaktionszeit möglich.

Eine nach der Expression vollständig eingriffsfreie Photoimmobilisierung gelang auf der Basis der Koexpression KRT-modifizierter Proteine und FTase in *E.coli* (Abbildung 64c und e). Diese Strategie nutzte von *E.coli* endogen synthetisiertes Fpp als Substrat für die Farnesylierung des KRT-modifizierten Proteins. Das Risiko unspezifischer Farnesylierung bestand nicht, da *E.coli* keine FTase besaß. Mit Kolysat von KRT-modifiziertem H₆-mCherry-4KRT und FTase konnte die Herstellung eines Mikroarrays in zehn Minuten Bestrahlungszeit erfolgreich durchgeführt werden (Abbildungen 64f und g). Mit dieser Strategie sind Proteinbiochips schnell und ohne Modifikations- oder Aufreinigungsschritte nach der Koexpression zugänglich.

5. Experimenteller Teil

5.1 Messgeräte und Materialien

Lösungsmittel in Labor- und HPLC-Qualität stammten von Fisher Scientific, DMF für die Peptidsynthese von Biosolve und wurden direkt verwendet. Alle trockenen Lösungsmittel außer DCM wurden von Acros erhalten und direkt eingesetzt. Trockenes DCM wurde durch Destillation über Calciumhydrid gewonnen. Als Wasser kam hochreines Wasser des Systems milliQ Advantage (Millipore) zum Einsatz. **Analytische Dünnschichtchromatographie** wurde auf Platten mit Kieselgel 60 sowie dem Indikator F254 der Firma Merck durchgeführt. **Präparative Kieselgelchromatographie** erfolgte auf Kieselgel der Firma Acros (37–70 μm , 60 Angström). $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, sowie zweidimensionale **NMR-Spektren** (gCOSY, gHSQC, gHMBC) wurden auf einem NMR-Spektrometer Varian Mercury bei 400 Mhz vermessen. Chemische Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) angegeben und wurden gegen Signale des nicht-deutierten Anteils des jeweils verwendeten deuterierten Lösungsmittels als internen Standard kalibriert. Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett sowie deren Kombination, ferner m = Multiplett und br = breites Signal. **GC-MS-Chromatogramme** wurden mit einem Gaschromatograph 5890 Serie II (Hewlett Packard) mit einer Kapillarsäule Optima 1 (25 m x 0,2 mm ID, Macherey Nagel) gekoppelt an ein Massenspektrometer 5972 (Hewlett Packard) erstellt. Als Trägergas kam Helium zum Einsatz (Standardgradient: 1 min 100 °C, 2-6 min von 100 °C auf 280 °C, 7-11 min 280 °C). **FAB-MS-Spektren** wurden, sofern nicht anders angegeben, unter Verwendung von 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix mit einem Massenspektrometer MAT MS 70 (Finnegan) aufgenommen. Die Vermessung von **HR-MS-Spektren** erfolgte auf einem LTQ Orbitrap (Thermo) oder einem Q-TOF Ultima (Micromass). **MALDI-TOF-Spektren** wurden auf einem Voyager DETM Biospectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems) gemessen. **UV/VIS-Spektren** wurden auf einem Cary 50 UV/VIS Spektrometer (Varian) aufgenommen. **Analytische HPLC-ESI-MS-Chromatogramme** wurden mit einem HPLC-System 1100 (Agilent) gekoppelt an ein Massenspektrometer LCQ Advantage Max (Finnegan) bei einer Flußrate von 1,0 ml/min vermessen. Über einen Säulenwechsler kamen C4 und C18 RP-Säulen der Firma Macherey Nagel mit einem Durchmesser von 4 mm zum Einsatz (CC 125/4 C4 gravity, 3 μM ; CC 125/4 C18 gravity, 3 μM). **Präparative HPLC-ESI-MS** erfolgte ebenfalls auf dem HPLC-System 1100 (Agilent), das über einen Splitter (Verhältnis 1:1000, Agilent G1968D) mit einem Massenspektrometer LC/MSD VL (Agilent) verbunden war. Als Make-Up-Lösungsmittel kam Wasser/Acetonitril 1:1 oder Wasser/Methanol/5 % THF 1:1 mit 0,1 % HCOOH bei einer Flußrate von 0,5 ml/min zum

Einsatz. Verwendet wurden ferner C4 und C18 RP-Säulen der Firma Macherey Nagel mit einem Durchmesser von 25 mm bei einer Flußrate von 25 ml/min (VP 125/21 Nucleodur C4 gravity 5 μ M; VP 125/21 Nucleodur C18 gravity 5 μ M). Lineare HPLC-Gradienten setzten sich aus der polaren mobilen Phase A (Wasser mit 0,1 % TFA) sowie der unpolaren mobilen Phase B (Acetonitril oder Methanol/5 % THF mit 0,1 % TFA) in Verhältnissen von 95/5 bis 0/100 zusammen und sind jeweils angegeben. **ASPPS** wurde entweder auf einem Peptidsyntheseroboter Syro II (Multisyntech) oder mikrowellengestützt auf einem Peptidsyntheseroboter Liberty (CEM) durchgeführt. Siliziumoxidbeschichtung von Oberflächen mittels **PECVD** nutzte ein PECVD-System Plasmalab 100 (Oxford Plasma Technology). Wafer wurden mit einer halbautomatischen Wafersäge (ESEC 8004) mit Diamanttrennscheibe (2.187-10-45H, Minitron) in objekträgergroße Stücke geschnitten (75,25 mm²). **Spin-Coating** erfolgte mit einer Spin-Coating-Apparatur WS-400B (Laurell Technologies). **Mikroarrays** wurden mit einem Nanoplotter NP 1.2 (Gesim) im kontaktlosen Verfahren hergestellt, sofern nicht anders angegeben. Zur UV-Bestrahlung für die **Photoimmobilisierung** wurde ein Photolithographiegerät MA56 (Süss) mit einer HBO Quecksilberkurzbogenlampe und einer Bestrahlungswellenlänge von 365 nm genutzt (Flächenleistung 10 mW/cm²). **Photoreaktionen** wurden in einem UV-Karussellreaktor (RPR-100, Rayonet, 365 nm bei 0,2 mW/cm²), mit UV-Stablampen (Penray, UVP, 365 nm bei 0,1 mW/cm² oder 256 nm bei 0,6 mW/cm²) oder im Photolithographiegerät MA56 durchgeführt (siehe Photoimmobilisierung) durchgeführt. Zur Auswertung von mikrostrukturierten Oberflächen und Mikroarrays mittels Fluoreszenz wurden die **Fluoreszenzmikroarrayscanner** GenePix 4000B (Molecular Devices) in Verbindung mit der Software GenePix Pro 6.0 sowie Typhoon Trio+ (General Electric) in Verbindung mit der Software ImageQuant genutzt. **Transformation** durch Elektroporation wurde mit einem Elektroporationsapparat Micropulser (Bio-Rad) durchgeführt. **Optische Dichte** sowie **UV-Absorption** zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford-Verfahren wurden mit einem UV/VIS-Spektrometer DU 640 (Beckman) gemessen. **Nickel-Affinitätschromatographie** wurde auf Säulen des Typs HisTrap HP (General Electric) in einem Chromatographiesystem der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt (Pumpe P-50, Fraktionssammler GradiFrac, Detektor UV-1, Schreiber REC 112 der Firma Amersham Biosciences). **Gelfiltrationschromatographie** erfolgte auf Säulen des Typs Superdex 75 (16/60 oder 26/60, General Electric) und der gleichen technischen Ausrüstung wie die Nickel-Affinitätschromatographie. Für **Pufferaustausch** über Größenausschlusschromatographie wurden illustra NAP5-Säulen (General Electric) eingesetzt. Folgende **Zentrifugen** wurden verwendet: Benchtop 5415D (Eppendorf), Tabletop 5810R (Eppendorf), für Zellsuspensionen (1 l) Avanti J-28XP mit dem Rotor JLA 8.1000 sowie zur Ultrazentrifugation von Zelllysat Optima L-70K mit dem Rotor Ti 45. **Zellyse** wurde mit dem Fluidizer 110S (Microfluidics) durchgeführt. Für **PCR** kam das PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

5. Experimenteller Teil

zum Einsatz. DNA-Konzentration wurde mit dem Kleinstvolumen-UV-Spektrometer **Nanodrop** ND-1000 (Peqlab) bestimmt. **DNA-Sequenzierung** wird mit einem Sequenziersystem Model 373 (PE Biosystems, ABI) durchgeführt. Für die Auftrennung von DNA mit **Agarosegelen** sowie von Proteinen mittels **SDS-PAGE** standen ein LKB ECPS 3000/150 (Pharmacia) sowie ein PowerPac Basic (Bio-Rad) zur Verfügung. Analyse von mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegelen wurde mit einem **Gelscanner** GelDoc XR (Bio-Rad) durchgeführt.

Chemikalien stammten von Sigma-Aldrich, Acros, Fluka, Novabiochem oder ABCR, wurden in der höchsten Reinheitsstufe bezogen und ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

Materialien wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Siliziumwafer (6 Zoll bzw. 150 mm Durchmesser, Dicke 675 μm , Dotierung P/Bor, Vorderseite poliert, Rückseite geätzt; mit oder ohne Schicht von 1000 nm thermisch oxidiertem Siliziumoxid) von Si-Mat, Photolithographiemasken von ML&C (Glas, einseitig chrombeschichtet), aminreaktive NHS-aktivierte Hydrogelslides von Xantec Bioanalytics, GeneFrames von ABGene.

Molekularbiologische Reagenzien stammten von folgenden Herstellern: Streptavidin, Streptavidin-Cy5 von Anova oder Invitrogen, Heringssperma-DNA für Molekularbiologie von Roche, Milchpulver von Oxoid, biotinylierte alkalische Phosphatase (calf-intestine alkaline phosphatase, CIAP) von New England Biolabs, monoklonaler primärer Maus-anti-CIAP-Antikörper, sekundärer, Cy5-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper von Abcam oder Zymed, VectorRed-Kit von Vector Laboratories, biotinylierter anti-Phosphotyrosin-Antikörper von Biotrend Chemicals, Phosphatase PTP1B von Biomol Research Laboratories, Bradfordreagenzlösung Coomassie Protein Assay von Thermo, Restriktionsenzyme von New England Biolabs oder Fermentas sowie FastDigest-Restriktionsenzyme von Fermentas, BigDye DNA-Sequenzierungsmix von Applied Biosystems.

Ferner wurden folgende großzügige **Spenden** erhalten: Cy3-markierter anti-Ras-Antikörper Y13-259-F5^[24, 25] von Dr. Jürgen Kuhlmann (MPI Dortmund), N-Ras¹⁻¹⁸¹-GDP und N-Ras¹⁻¹⁸¹-GppNHp^[80, 83] von Christine Nowak (MPI Dortmund), H-Cys(Far)-OMe (**36**) von Kristina Görmer (MPI Dortmund), MIC- und olefinfunktionalisiertes Peptid **35**, MIC-funktionalisiertes, biotinyliertes Peptid **34** von Dr. Pascal Jonkheijm (MPI Dortmund), die Plasmide pGAT H₆-mCherry-4KRT, pOPINE H₆-mCherry, pOPINF, pET27, pGATEV-H₆-GST-FTase- α /FTase- β sowie die Proteine eGFP-Bicaudal_D2 (gekürzte Version) und K-Ras4B von Dr. Kirill Alexandrov (MPI Dortmund).

Folgende **Puffer** kamen in der Photoimmobilisierung bzw. nachfolgenden Assays zum Einsatz:

TETBS: 20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween-20, pH 7,5;

MESTBS zur Blockierung von Oberflächen gegen unspezifische Protein- oder DNA-Adsorption: 20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 4,5 % Milchpulver (Oxoid), 5 mM EDTA, 0,2 % Natriumazid, 1 g/l DNA MB grade (Roche);

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, pH 7,4;

PBS-T: PBS + 0,05 % Tween-20.

Als **Medien** und **Antibiotika** kamen zum Einsatz:

LB-Medium („lysogeny“ broth oder „Luria-Bertani“): 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bactotrypton, 10 g/l NaCl, pH 7,5;

Agarplatten mit LB-Medium: wie LB-Medium, dazu 15 g/l Agar;

Ampicillin: 125 µg/ml;

Kanamycin: 40 µg/ml;

Chloramphenicol: 35 µg/ml.

Allgemeine Hinweise zur Handhabung von Proteinen

Proteine, Expressionslysate und Koexpressionslysate wurden zur Lagerung in Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden Aliquots schnell aufgetaut (aber nicht über 4 °C erwärmt) und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 15 min entfernt. Während eines Experiments wurden Proteinlösungen immer bei 4 °C aufbewahrt. Bei Pipettiervorgängen wurde Einbringen von Luft in die Proteinlösung vermieden. Proteinlösungen wurden ferner nicht länger als einen Tag verwendet.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.2.1 AAV zur Peptidsynthese

AAV 1: Beladung von 2-Chlortritylharz mit Fmoc-Aminosäuren

Zu 2,0 g trockenem 2-Chlortritylharz (1,3 mmol/g, 2,6 mmol) in einem Festphasenreaktor mit Fritte (ausgeheizt, Argonatmosphäre) wurden im Argongegenstrom 20 ml DCM zugegeben, und die Suspension 20 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Im Argongegenstrom wurden 1,2 Äquivalente Fmoc-Aminosäure (3,12 mmol) sowie 2,12 ml DIPEA (12,5 mmol) zugegeben und die Suspension weitere zwei Stunden geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgetrennt und das Harz nach folgender Abfolge gewaschen (3 min Schütteln pro Schritt, je ~20 ml):

3 x DCM/MeOH/DIPEA 17:2:1;

3 x DCM;

2 x DMF;

2 x DCM.

Das Harz wurde unter reduziertem Druck getrocknet und unter Argonatmosphäre aufbewahrt.

AAV 2: Fmoc-Beladungsbestimmung

Für die Bestimmung der Beladung von 2-Chlortritylharz mit Fmoc-Aminosäuren wurde standardmäßig folgende Prozedur verwendet: 8-10 mg beladenes Harz wurden in ein 15 ml Falcongefäß gegeben, mit 5 ml DBU/Piperidin/DMF 2:2:96 bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. 100 µl dieser Lösung wurden zu 2,4 ml MeCN in einer UV-Küvette gegeben und die Absorption bei 301 nm gegen eine entsprechende Blindprobe gemessen. Die Beladung ergab sich aus der Absorption nach folgender Formel (B: Harzbeladung in mol g⁻¹, A_{301nm}: Absorption bei 301 nm, ε: Extinktionskoeffizient der Fluorenylgruppe, 7800 l mol⁻¹ cm⁻¹, d: Lichtweg, 1 cm, m: Menge an Harz in g):

$$B = \frac{A_{301nm}}{\varepsilon \cdot d \cdot m} \cdot \frac{5ml \cdot 2,5ml}{100\mu l} = \frac{A_{301nm}}{m} \cdot 1,60 \cdot 10^{-5} mol$$

AAV 3: Peptidsynthese mit dem Peptidsyntheseroboter Syro II

Für die Synthese unter Einsatz des Peptidsyntheseroboters Syro II kamen folgende Lösungen zum Einsatz:

Aktivator: 0,5 M HBTU oder HCTU in DMF;

Base: 2 M DIPEA in NMP;
 Fmoc-Aminosäure: 0,6 M in DMF;
 Fmoc-Abspaltung: DBU/Piperidin/DMF 2:2:96;
 Lösungsmittel: DMF.

Folgende Prozessschritte wurden verwendet:

Quellen: Zweimal 7 min in DMF (vor Synthesebeginn);
 Einfachkupplung: 4 Äq. Fmoc-Aminosäure, 4 Äq. Aktivator, 8 Äq. Base, 60 min;
 Doppelkupplung: 4 Äq. Fmoc-Aminosäure, 4 Äq. Aktivator, 8 Äq. base, zweimal
 40 min mit intermediärem Waschschrift;
 Fmoc-Abspaltung: Zwei Schritte, 3 min, 12 min;
 Waschen: Dreimal 3 min.

Bei einer Standardharzmenge von 0,1 mmol ergaben sich folgende Volumina:

Aktivator: 800 µl;
 Base: 400 µl ;
 Fmoc-Aminosäure: 667 µl
 (Gesamtvolumen: 1867 µl);
 Fmoc-Abspaltung: 1,5 ml;
 Waschen: 2,0 ml DMF im ersten Waschschrift nach Peptidkupplung, sonst 1,6 ml.

AAV 4: Peptidsynthese mit dem Peptidsyntheseroboter Liberty (mikrowellenbasiert)

Für die Synthese unter Verwendung des Liberty-Systems wurden folgende Lösungen verwendet:

Aktivator: 0,5 M HCTU in DMF;
 Base: 2 M DIPEA in NMP;
 Fmoc-Aminosäure: 0,2 M in DMF;
 Fmoc-Abspaltung: Piperidin/DMF 20:80;
 Lösungsmittel: DMF.

Prozessschritte folgten weitestgehend entsprechend den Fabrikeinstellungen des Liberty. Hier seien als Übersicht die Kupplungs- und Fmoc-Abspaltungsbedingungen angegeben:

Einfachkupplung: 5 Äq. Fmoc-Aminosäure, 5 Äq. Aktivator, 5 Äq. Base, 18 W
 Leistung, max. 75 °C, 300 s;
 für Cystein: 120 s: ohne Mikrowelle,
 240 s: 18 W Leistung, max. 50 °C;
 für Arginin: 1500 s: ohne Mikrowelle,
 300 s: 18 W Leistung, max. 75 °C;
 Doppelkupplung: wie zwei Einfachkupplungen mit intermediärem Waschschrift

5. Experimenteller Teil

Fmoc-Abspaltung: erster Schritt: 33 W Leistung, max. 75 °C, 30 s;
 zweiter Schritt: 33 W Leistung, max. 75 °C, 180 s.

AAV 5: Harzabspaltung und Aufarbeitung

Sequentielle Abspaltung der Schutzgruppen und des Produkts sowie kombinierte Abspaltung wurde mit Lösungen auf TFA-Basis durchgeführt, deren Zusammensetzung jeweils angegeben ist (Spritzenreaktoren mit Teflonfritte, Lösungsvolumen 3 ml). Nach erfolgter Abspaltung wurden die Abspaltphasen kombiniert und unter reduziertem Druck bis auf wenige Milliliter Volumen eingengt. Die aufkonzentrierte Abspalllösung wurde unter Ausbildung eines meist weißen Niederschlags in etwa die zwanzigfache Menge eiskalten Diethylethers (50 ml Falcongefäß) eingetropft und die erhaltene Suspension bei 4 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands und erneuter Zugabe von Diethylether wurde das Pellet zur Entfernung etherlöslicher Bestandteile resuspendiert und die daraus resultierende Suspension erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das Peptidpellet wurde in wenig Wasser, ggf. unter Zugabe geringer Mengen TFA oder Ammoniumhydroxid, aufgenommen und die erhaltene Lösung lyophilisiert. Zur Isolierung des Peptids wurde der erhaltene Feststoff nachfolgend mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

5.2.2 AAV zur Thiol-En-Photoimmobilisierung

AAV 6: Herstellung von SiO_x/Si-Oberflächen mittels PECVD

Siliziumwafer (Durchmesser 150 mm, Dicke 675 µm, Dotierung P/Bor, Vorderseite poliert, Rückseite geätzt; mit oder ohne Schicht von 1000 nm thermisch oxidiertem Siliziumoxid) wurden im Reinraum (Institut für Hochfrequenztechnologie, TU Dortmund) auf der polierten Seite mittels PECVD mit Siliziumoxid beschichtet. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- 1.) Erhitzen auf 390 °C:
 500 sccm N₂, 1000 mTorr, 390 °C, 2 min;
- 2.) Reinigung der Oberfläche mit N₂-Plasma:
 500 sccm N₂, 1000 mTorr, 100 W HF, 390 °C, 1 min;
- 3.) Spülen der Gaskammer:
 400 sccm N₂O, 60 sccm SiH₄ 5 % Ar, 1400 mTorr, 390 °C, 1 min;
- 4.) Pause:
 390 °C, 8 s, 0 mTorr (Vakuum);
- 5.) PECVD:
 400 sccm N₂O, 60 sccm SiH₄ 5 % Ar, 1400 mTorr, 70 W HF, 390 °C,

Zeit je nach Schichtdicke (kalibriert auf 1 min = 50 nm);

6.) Leeren der Gaskammer:

390 °C, 30 s, 0 mTorr (Vakuum).

Beschichtete Wafer wurden im Reinraum gelagert. Schneiden in Objektträgergröße (75x25 mm²) erfolgte mit einer halbautomatischen Wafersäge (ESEC 8084, Institut für Hochfrequenztechnologie, TU Dortmund) mit Diamanttrennscheibe (2.187-10-45H, Minitron) und unter Verwendung folgender Parameter:

Index step 1: 12500 (µm);

Index step 2: 0;

Blade rate: 25000 (rpm);

Feed rate: 1 (mm/s);

Blade to chuck: 50;

Wafer size 1: 6 (Zoll);

Wafer size 2: 6 (Zoll);

Wafer thickness: 5000.

Geschnittene Objektträger wurden vor der Funktionalisierung maximal einen Tag gelagert (für Funktionalisierung siehe AAV 7).

AAV 7: Funktionalisierung von Oberflächen für die Thiol-En-Photoimmobilisierung

Funktionalisierung von objektträgergroßen Oberflächen (75x25 mm²) mit terminalen Aminen oder Carbonsäuren sowie einer optionalen PAMAM-Dendrimererschicht erfolgte außer im Fall der Oberflächen für die Thiol-En-Nanostrukturierung in Lösung (Abschnitt 3.8.2) durch Dr. Hendrik Schröder (Chimera Biotec, Dortmund) nach veröffentlichten Prozeduren.^[70] Bis zur weiteren Thiol- bzw. Olefinfunktionalisierung wurden Objektträger bis zu einem Jahr bei -20 °C gelagert. Carbonsäureterminierte Oberflächen dienten als Ausgangsmaterial für thiol-funktionalisierte Oberflächen, während Aminoberflächen für die Olefinfunktionalisierung genutzt wurden.

Thiofunktionalisierung

Fünf carbonsäureterminierte Objektträger mit optionaler PAMAM-Dendrimererschicht wurden auf einem Teflonhalter montiert und in einen Glasreaktor mit Magnetührstab und Gashahn gebracht. Alle Reaktions- und Waschschrte verliefen unter Argonatmosphäre bzw. im Argongegenstrom. 60 ml DMF (Objektträger gerade vollständig mit Lösungsmittel bedeckt) wurden in den Glasreaktor gegeben und unter Rühren im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 18.8 µl DIC (0,120 mmol) hinzugefügt und 15 min bei 0 °C gerührt. 32,4 mg

5. Experimenteller Teil

Cystamindihydrochlorid (0,144 mmol) wurden in 40 µl Wasser gelöst, 49,0 µl DIPEA (0,288 mmol) und 1 ml DMF zugegeben und die erhaltene Lösung bei 0 °C in den Glasreaktor transferiert. Unter Erwärmen auf Raumtemperatur wurde 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde dekantiert, die Innenseiten des Reaktors sowie die Objektträger mit ~15 ml DMF aus einer Pasteurpipette gespült, 60 ml DMF/Wasser 3:1 zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Waschlösung wurde dekantiert, die Innenseiten des Reaktors sowie die Objektträger erneut mit ~15 ml DMF aus einer Pasteurpipette gespült und direkt für den folgenden Reduktionsschritt verwendet.

Zu fünf Objektträgern auf Teflonhalter im Glasreaktor (Argonatmosphäre) wurden 60 ml DMF gegeben und durch dreimaliges, sequentielles Hochvakuum und Belüften mit Argon grob entgast. 185 mg DTT (1,20 mmol) und 83,0 µl (0,60 mmol) TEA wurden hinzugefügt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde dekantiert, Objektträger sowie Innenseiten des Glasreaktors mit ~15 ml DMF aus einer Pasteurpipette gespült und die Objektträger 15 min bei Raumtemperatur in 60 ml DMF gerührt. Die Waschlösung wurde entfernt, es wurde erneut mit ~15 ml DMF gespült, und 15 min mit 60 ml DCM bei Raumtemperatur gerührt. Nach Dekantieren des DCM erfolgte Trocknung der Objektträger im Glasreaktor im Hochvakuum für eine Stunde. Thiofunktionalisierte Objektträger wurden unter Argonatmosphäre, im Dunkeln und bei Raumtemperatur gelagert (bis etwa vier Wochen; erneute Reduktion möglich).

Thiofunktionalisierung mit langem Thiolanker 40

Die Thiofunktionalisierung mit dem langen Thiolanker **40** erfolgte analog zur Thiofunktionalisierung mit Cystamindihydrochlorid, jedoch wurden statt Cystamindihydrochlorid 44,4 mg **40** (0,144 mmol) eingesetzt.

Olefinfunktionalisierung

Fünf terminal aminfunktionalisierte Objektträger mit optionaler PAMAM-Dendrimerschicht wurden auf einem Teflonhalter montiert und in einen Glasreaktor mit Magnetrührstab und Gashahn gegeben. Alle Reaktionsschritte verliefen unter Argonatmosphäre bzw. im Argongegenstrom. Der Reaktor wurde mit 60 ml DMF (Objektträger gerade vollständig mit Lösungsmittel bedeckt) befüllt und das Lösungsmittel unter Rühren im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Gleichzeitig wurden 25,1 mg (0,144 mmol) Olefinanker **20** in 1 ml DMF gelöst und im Eisbad unter gelegentlichem Schütteln auf 0 °C abgekühlt (Lösung A). Nach Zugabe von 22,5 µl (0,143 mmol) DIC zu Lösung A, wurde das Gemisch 15 min bei 0 °C inkubiert. Zur Lösung im Glasreaktor wurden bei 0 °C und unter Rühren 49,0 µl DIPEA (0,288 mmol) sowie

Lösung A gegeben und unter Erwärmen auf Raumtemperatur 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde dekantiert, die Innenwände des Glasreaktors sowie die Objektträger mit ~15 ml DMF aus einer Glaspipette gespült, und nach Zugabe von 60 ml DMF/Wasser 3:1 15 min gerührt. Nach Entfernen der Waschlösung wurde erneut mit ~15 ml DMF gespült und 15 min mit 60 ml DCM gerührt. Das DCM wurde entfernt und die Objektträger im Glasreaktor im Hochvakuum eine Stunde getrocknet. Olefinfunktionalisierte Objektträger wurden unter Argonatmosphäre im Dunkeln und bei Raumtemperatur gelagert.

Thiofunktionalisierung von Deckgläschen für die Thiol-En-Photonanostukturierung

Die Funktionalisierungsprozedur folgte ^[70]. Sieben kreisförmige Deckgläschen (Durchmesser 15 mm) wurden auf einem Halter in einem Becherglas montiert. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Reaktions- und Waschschrte im Becherglas und bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die Deckgläschen nach folgender Abfolge im Ultraschallbad gereinigt:

- 3 x 20 ml Wasser, je 5 min (Deckgläschen vollständig bedeckt);
- 3 x 20 ml EtOH, je 5 min.

Die Deckgläschen wurden auf einem Horizontalschüttler 18 Stunden mit 20 ml einer Lösung von APTES/Wasser/EtOH 2:3:95 geschüttelt, und zweimal 15 min mit je 20 ml Wasser/EtOH 1:1 im Ultraschallbad gereinigt. Es folgte Waschen nach folgender Abfolge:

- 3 x 20 ml Aceton;
- 3 x 20 ml DCM.

Die Deckgläschen wurden zwei Stunden mit 20 ml 10 mM PDITC in DCM 1 % Pyridin geschüttelt, mit 3 x 20 ml DCM gewaschen und unter einem Argonstrom getrocknet. 30 µl einer Lösung von PAMAM-Dendrimeren der dritten Generation in DCM (Sigma) wurden auf je eine Seite eines Deckgläschens gegeben und die Deckgläschen gestapelt, um dünne Flüssigkeitsfilme zwischen den Deckgläschenoberflächen zu erhalten. Für die beiden äußeren Seiten wurden unfunktionalisierte Deckgläschen verwendet, um einheitlich beidseitige Funktionalisierung mit PAMAM-Dendrimeren zu erzielen. Der Deckgläschenstapel wurde in eine Feuchtekammer mit MeOH gegeben und 18 h inkubiert. Die Deckgläschen wurden in MeOH getrennt, wiederum auf einem Halter in einem Becherglas montiert und nach folgender Abfolge gewaschen:

- 3 x 20 ml MeOH;
- 1 x 20 ml Aceton;
- 3 x 20 ml DCM.

Es folgte Schütteln mit 20 ml 10 mM PDITC in DCM 1 % Pyridin sowie Waschen nach folgender Prozedur:

- 3 x 20 ml DCM;
- 3 x 20 ml MeOH.

5. Experimenteller Teil

Es folgte Schütteln in einer 10 mM Lösung von 6-Aminocapronsäure (gelöst im kleinstmöglichen Volumen Wasser) in MeOH für 18 h und Waschen:

3 x 20 ml MeOH;

3 x 20 ml DMF.

Die Deckgläschen wurden 10 min mit 20 ml DMF und 12,3 μ l (0,079 mmol) DIC geschüttelt, eine Lösung von 21,6 mg (0,096 mmol) Cystamindihydrochlorid gelöst in 30 μ l Wasser, 32,7 μ l (0,192 mmol) DIPEA und 500 μ l DMF zugegeben und 18 h geschüttelt. Nach Waschen mit 3 x 20 ml DMF folgte Zugabe von 61,7 mg (0,40 mmol) DTT und 27,7 ml (0,20 mmol) TEA sowie Schütteln für 18 Stunden. Die finalen Waschschritte wurden nach folgender Abfolge durchgeführt:

3 x 20 ml DMF;

3 x 20 ml DCM.

Die Deckgläschen wurden mit Hilfe eines Argonstroms getrocknet und im Dunkeln bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gelagert.

AAV 8: Oberflächenbeschichtung mittels Spin-Coating und Thiol-En-Photomikrostrukturierung

Eine funktionalisierte Oberfläche im Objektträgerformat (75x25 mm²) wurde horizontal in einen speziell angefertigten Probenhalter eingespannt (Aluminium, Schraubenhalterung), der waagrecht auf der Drehachse einer Spin-Coating-Apparatur befestigt war. Ca. 750 μ l Lösung des zu immobilisierenden Biomoleküls wurden mit einer Eppendorfpipette auf den Objektträger gegeben und dieser direkt nach folgendem Programm zentrifugiert:

für DMF/Toluol 3:1:

500 rpm, 5 s, ACL 12;

1000 rpm, 80 s, ACL 003;

0 rpm, 20 s, ACL 001;

für EtOH:

1250 rpm, 1s, ACL 12;

1250 rpm, 40 s, ACL 003;

0 rpm, 20 s, ACL 001.

Der getrocknete Objektträger wurde unter Gelblicht auf dem Probenhalter der Photolithographieapparatur plaziert, und eine Photolithographiemaske im Maskenhalter fixiert. Mit Hilfe des Belichtungsprogramms der Apparatur wurde der Objektträger mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Nach erfolgter Bestrahlung wurde der Objektträger wiederum in der Spin-Coating-Apparatur fixiert und unter zweimaliger Durchführung des lösungsmittelspezifischen Zentrifugationsprogramms senkrecht von oben mit einem Lösungsmittelstrahl aus einer

Lösungsmittelflasche gewaschen (DMF/Toluol: DMF und MeOH, EtOH: 2xMeOH). Der Objektträger wurde nachfolgend für zweimal 10 min im Ultraschallbad in Wasser gereinigt.

AAV 9: Oberflächenbeschichtung mittels Drop-Casting und Thiol-En-Photomikrostrukturierung

Funktionalisierte Oberflächen in Objektträgergröße (75x25 mm²) wurden entweder im Ganzen verwendet oder mit Hilfe eines Diamantschneiders in zwei, gleich große Hälften geschnitten. 20 µl einer Lösung des zu immobilisierenden Biomoleküls wurden auf den Objektträger bzw. 10 µl auf eine Objektträgerhälfte pipettiert und unter Ausbildung eines dünnen, flüssigen Films mit einer Photolithographiemaske bedeckt. Photolithographiemaske und Objektträger wurden auf dem Probenteller der Photolithographiemaschine plaziert und mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Nach erfolgter Bestrahlung wurde der Objektträger in einem Lösungsmittelbad (Lösungsmittel bzw. Puffer der Biomoleküllösung) abgelöst, um Eintrocknen des dünnen Flüssigkeitsfilms zwischen Maske und Objektträger zu verhindern. Außer im Fall der Immobilisierung von Proteinen und Oligonukleotiden folgte eine Reinigung im Ultraschallbad in Wasser für zweimal 10 min.

AAV 10: Generierung von Mikroarrays mittels Thiol-En-Photoimmobilisierung

Mikroarrays wurden mit Hilfe eines Nanoplotters (GeSim NP1.2) im kontaktlosen Verfahren auf objektträgergroßen, funktionalisierten Oberflächen (75x25 mm²) hergestellt. Pro Objektträger erfolgte Spotten in drei identischen, quadratischen Subarrays à maximal 12x12 Punkte, die optional durch GeneFrames (75 µl) abgetrennt werden konnten. Der Objektträger wurde auf dem Probenteller der Photolithographiemaschine plaziert und mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt.

AAV 11: Prozessierung von Oberflächen nach der Thiol-En-Photoimmobilisierung

Sofern in den AV nicht anders angegeben, erfolgte „**Waschen**“, „**Inkubation**“ oder „**Schütteln**“ von objektträgergroßen Oberflächen mit Reagenzien durch Bedecken der Objektträgeroberfläche mit ~1 ml Puffer bzw. Lösung (Ausbildung eines Meniskus) und kreisförmiger, horizontaler Bewegung auf einem Kreisschüttler bei ~120 rpm über die angegebene Zeitangabe. Alternativ wurde „**Waschen**“ durch Platzieren eines Objektträgers in einer Petrischale, Bedecken mit Puffer und Schütteln auf einem Kreisschüttler durchgeführt. „**Spülen**“ bestand in dreimaligem, druckvollem Abspülen der Oberfläche mit Puffer aus einer Pasteurpipette mit Pipettierhilfe aus Gummi oder aus einer Spritzflasche. Alle Schritte wurden

5. Experimenteller Teil

bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Oberflächen mit immobilisierten Proteinen wurden Puffer verwendet, die auf 4 °C gekühlt waren.

AAV 12: Oberflächenanalyse unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroarrayscanners

Analyse von Oberflächen mit immobilisierten, fluoreszenzmarkierten Biomolekülen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner. Fluoreszenzaufnahmen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

Auflösung: 10 µm;
Photomultiplier (pmt): 600 (Typhoon Trio+), 500 (Genepix 4000B);
Laserleistung: 100 %; bei Sättigung 33 %.

Analyse der Aufnahmen erfolgte mit der Software GenePix Pro 6.0 (Genepix 4000B) bzw. Imagequant (Typhoon Trio+).

Im Fall mikrostrukturierter Oberflächen wurden Querschnitte eines oder mehrerer Linienpakete (für ein Beispiel siehe Abbildung 18) erzeugt und die erhaltenen maximalen Fluoreszenzintensitäten der Mikrostrukturlinien des Linienpakets gemittelt („**Signal**“). In gleicher Weise wurden die Fluoreszenzintensitäten der Flächen zwischen den Mikrostrukturlinien gemittelt („**Hintergrund**“).

Im Fall von Mikroarrays wurde die Fluoreszenzintensität von Mikroarraypunkten mit Hilfe der Software über ihre Gesamtfläche integriert und automatisch durch die Fluoreszenzintensität des umliegenden Hintergrunds korrigiert („Spot Edge Average“, SAE). Alternativ wurde die integrierte Fluoreszenzintensität einer frei wählbaren, rechteckigen Fläche nahe des auszuwertenden Subarrays abgezogen („Rectangular Area“). Mit beiden Methoden wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

Während mit Objektträgern einer Funktionalisierungscharge und gleichen Alters erzielte Ergebnisse reproduzierbar waren, wurde beobachtet, dass Ergebnisse von Objektträgern unterschiedlichen Alters oder unterschiedlicher Chargen abweichen konnten. Daher wurden bei Intensitätsvergleichen innerhalb zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführter Experimente Kontrollversuche vorgenommen, um Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Typischerweise wurden jedoch nur Werte eines Experiments, d.h. von Objektträgern einer Charge und eines Alters, miteinander verglichen.

AAV 13: Nachweis von immobilisiertem Biotin mit Streptavidin-Cy5

Eine biotinfunktionalisierte Oberfläche (Mikrostrukturen oder Mikroarray) nach folgender Abfolge mit je 1 ml Flüssigkeitsvolumen auf einem Horizontalschüttler geschüttelt (siehe AAV 11):

- 2 x 10 min TETBS;
- 30 min MESTBS (Blocken gegen unspezifische Proteinadsorption) ;
- 5 min TETBS;
- 10 min 100 nM Streptavidin-Cy5 in TETBS
- 2 x 5 min TETBS.

Die Oberfläche wurde mit Wasser gespült und mit Hilfe eines Argonstroms getrocknet. Immobilisiertes Streptavidin-Cy5 wurde mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 detektiert.

AAV 14: Indirekte Thiol-En-Photomikrostrukturierung biotinylierter Proteine

Nach AAV 8 wurde Biotinverbindungen **17** (10 mM, DMF/Toluol) oder **18** (10 mM, EtOH) mittels Spin-Coating auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (1000 nm) mikrostrukturiert (10 min Bestrahlungszeit). Der Objektträger wurde zweimal 10 min mit TETBS-Puffer gewaschen und 30 min mit MESTBS-Puffer geblockt, gefolgt von Spülen mit TETBS-Puffer und Waschen mit TETBS-Puffer für 5 min. Es folgte Inkubation mit 100 nM Streptavidin in TETBS, Spülen mit TETBS-Puffer und Waschen mit TETBS-Puffer für zweimal 10 min. Nachfolgend wurde die Oberfläche eine Stunde mit 1 µM Protein in proteinspezifischem Puffer inkubiert.

5.2.3 AAV zu molekularbiologischen Verfahren

AAV 15: Proteinkonzentrationsbestimmung nach dem Bradfordverfahren

Je nach erwarteter Proteinkonzentration wurden bis zu 100 µl Proteinlösung (typischerweise 0,5 µl bei einer Konzentration von etwa 5-10 g/l) in eine 1 ml UV-Küvette gegeben und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. 900 µl Bradfordlösung wurden hinzugefügt, und die Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Eine Blindprobe wurde in gleicher Weise angefertigt. Es folgte Messung der UV-Absorption bei 595 nm (OD₅₉₅). Der Wert für OD₅₉₅ wurde nachfolgend mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden gegen BSA in die Proteinkonzentration umgerechnet (g/l).

AAV 16: Transformation von elektrokompenten *E.coli*

Es wurde steril gearbeitet. Zu einem Aliquot einer Suspension elektrokompenter *E.coli* (80 µl XL1 blue für die Klonierung, 50 µl BL21 (DE3) oder BL21 (DE3) Codon Plus RIL, siehe AAV

5. Experimenteller Teil

28) wurden 20-50 ng Plasmid bzw. ~10 ng eines Ligationsansatzes gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in eine Elektroporationskuvette gefüllt (ohne Blasen) und die Zellen in einer Elektroporationsapparatur elektroporiert (1,8 kV). Es wurden 400 µl LB-Medium zugegeben, und die gesamte Suspension eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde fünf min bei 2000 rpm (Benchtopzentrifuge) zentrifugiert, ~350 µl des Überstands wurden abgenommen, das Zellpellet mit einer Eppendorfpipette im verbleibenden Medium resuspendiert und mit Hilfe steriler Glaskugeln oder eines Drygalskispatels auf einer Agarplatte plattiert (LB-Medium, Antibiotika). Die feuchte Zellsuspension wurde 10 min bei 37 °C auf der Agarplatte getrocknet, die Platte umgedreht und bei 37 °C für 12-18 Stunden inkubiert. Entstandene Kolonien wurden der Platte durch Aufnahme mit einer sterilen Eppendorfspitze entnommen und zur Vermehrung in LB-Medium (Antibiotika) bei 37 °C für 12-18 h inkubiert (3 ml für Plasmidpräparation nach AAV 17, 25 ml für Expression nach AAV 30).

AAV 17: Plasmidpräparation

Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) durchgeführt.

AAV 18: PCR

Die Amplifikation eines Inserts mittels PCR wurde mit RedTaq-Polymerase oder Pfu-Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Beispiel sei folgender Reaktionsansatz für Pfu-Polymerase gegeben:

- 1-20 ng Plasmid;
- 50 pmol Primer 1 (0,5 µl bei 100 pmol/µl);
- 50 pmol Primer 2 (0,5 µl bei 100 pmol/µl);
- 1 µl 10 mM dNTP;
- 5 µl 10x Pfu buffer;
- 41,5 µl Wasser (für Gesamtvolumen 50 µl);
- 0,5 µl Pfu (0,5 u).

Die PCR folgte typischerweise folgendem Programm:

- 94 °C 5';
- für 25 Zyklen:
 - 94 °C 1';
 - A °C 30";
 - 72 °C B";
- 72 °C 7';

4 °C bis zur Entnahme.

Hierbei ist A die niedrigere, theoretische Schmelztemperatur T_M der mit dem Templat überlappenden Doppelstrangsequenz beider Primer minus 2 °C. Die theoretischen Schmelztemperaturen sollten sich nicht um mehr als 5 °C unterscheiden. B ist die Elongationszeit t_E , die je nach Insertlänge und Polymerase gewählt wurde (z.B. 2 min/kb für Pfu).

AAV 19: Restriktion von Inserts oder Plasmiden

Die Restriktion von Plasmiden oder PCR-Produkten (Inserts) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz sei als Beispiel gegeben:

- 1 µg Plasmid oder 0,2 µg PCR-Produkt;
- 2 µl 10x Puffer für Plasmide, 3 µl für PCR-Produkte;
- Wasser (Gesamtvolumen von 20 µl für Plasmide und 30 µl für PCR-Produkte);
- 1 µl Restriktionsenzym (1 u);
- ggf. 1 µl eines zweiten, kompatiblen Restriktionsenzym (1 u).

Das Reaktionsgemisch wurde nachfolgend bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsdauer war enzymespezifisch und richtete sich nach Herstellerangaben. Bei Verwendung von FastDigest-Restriktionsenzymen (Fermentas) betrug diese üblicherweise 5 min, sonst eine Stunde. Es folgte Aufreinigung mittels Präzipitierung der DNA nach AAV 20, mittels präparativer Agarosegelelektrophorese nach AAV 26 oder mit dem PCR Purification Kit (Qiagen).

AAV 20: Präzipitierung von DNA zur Aufreinigung

Folgende Prozedur wurde verwendet (alle Lösungen wurden auf 4 °C temperiert):

- Zugabe 0,1 v/v 3 M NaOAc;
- Zugabe 2,5 v/v EtOH;
- Vermischen (Vortexer) und fünf min auf Eis inkubieren;
- Zentrifugation für 10 min bei 13500 rpm und 4 °C;
- Entfernung des Überstands;
- Zugabe von 2,5 v/v 70 % EtOH;
- Zentrifugation für 10 min bei 13500 rpm und 4 °C;
- Entfernung des Überstands;
- Trocknen des DNA-Pellets im offenen Eppendorfgefäß bei 42 °C.

AAV 21: Ligation von Inserts und geschnittenen Plasmiden

Folgender Reaktionsansatz kam zum Einsatz:

- 50 ng Plasmid;
- drei- bis fünffache Menge Insert (nach Stoffmenge);
- 1 μl 10x Puffer für T4 Ligase;
- Wasser (Gesamtvolumen 10 μl);
- 1 μl T4 Ligase (1 u).

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und zur Inaktivierung der Ligase 10 min auf 65 °C erhitzt. Es folgte Transformation in *E.coli* XL1 blue nach AAV 16 sowie Plasmidpräparation aus typischerweise sechs Kolonien nach AAV 17. Zur Überprüfung auf erfolgreiche Ligation wurden Restriktionsanalyse (AAV 22) auf spezifische Restriktionsstellen, Kolonie-PCR (AAV 23) oder DNA-Sequenzierung (AAV 24) durchgeführt.

AAV 22: Restriktionsanalyse von Ligationsprodukten

Für die Restriktionsanalyse wurden Plasmide von typischerweise sechs aus Ligationsansätzen erhaltene Kolonien (AAV 21) auf das Vorhandensein neuer oder das Verschwinden zuvor vorhandener, spezifischer Restriktionsstellen untersucht. Zur Vereinfachung wurden alle Restriktionen in 64-Wellplatten und unter Verwendung eines Mastermixes durchgeführt:

- 2 μl 10x Puffer;
- 0,3 μl Enzym;
- 14,7 μl Wasser;
- multipliziert mit der Anzahl an Restriktionsproben plus zwei.

17 μl Mastermix wurden zu 3 μl Plasmid in einem Gefäß der 64-Wellplatte gegeben, die Wells luftdicht mit Klebeband verschlossen und bei 37 °C inkubiert (Inkubationszeit je nach Restriktionsenzym). Nach Zugabe von 4 μl 5x Agarosegelladepuffer erfolgte Analyse der Restriktionsprodukte über ein Agarosegel (AAV 25).

AAV 23: Kolonie-PCR zur Analyse von Ligationsprodukten

Zur Vermeidung der Isolation einer Vielzahl von Plasmiden aus Ligationen konnte an durch Transformation von Ligationsprodukten auf einer Agarplatte erhaltenen Kolonien Kolonie-PCR durchgeführt werden, um die korrekte Länge des in Folge der Ligation erwarteten PCR-Produkts zu überprüfen. Hierzu wurde je eine Kolonie mit einer sterilen Eppendorfspitze von der entsprechenden Agarplatte entnommen, in 50 μl Wasser gegeben und die erhaltene Suspension sorgfältig vermischt (Vortexer). Um die nachträgliche Verwendung der

untersuchten Kolonie zu ermöglichen, wurde die Spitze direkt im Anschluss auf einer Agarplatte ausgestrichen. Folgender PCR-Mastermix wurde angesetzt:

- 1 μl Primer 1 (100 pmol/ μl);
- 1 μl Primer 2 (100 pmol/ μl);
- 2 μl 10 mM dNTP;
- 10 μl 10x RedTaq-Puffer;
- 5 μl RedTaq-Polymerase;
- 81 μl Wasser (Gesamtvolumen 100 μl , 10 PCR-Reaktionen).

Nachfolgend wurde je 1 μl Zellsuspension zu 10 μl Mastermix gegeben und PCR nach AAV 18 durchgeführt. Analyse der PCR-Produkte erfolgte über ein Agarosegel (AAV 25).

AAV 24: DNA-Sequenzierung zur Analyse von Ligationsprodukten

Proben für die DNA-Sequenzierung wurden durch zwei PCR-Reaktionsansätze mit jeweils einem geeigneten Sequenzierungsprimer (z.B. T7 Promoter und T7 Terminator) pro Plasmid hergestellt. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

- 2,5 μl Plasmid;
- 0,5 μl Primer (100 pmol/ μl);
- 3,5 μl Wasser;
- 4 μl BigDye Terminator Mix.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- 98 °C 2';
- 94 °C 20";
- 50 °C 20";
- 60 °C 3';
- für 25 Zyklen;
- 4 °C bis zur Entnahme.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe des DyeEx-Kits (Qiagen) aufgereinigt und von der Sequenzierungsabteilung des MPI Dortmund sequenziert.

AAV 25: Analytische Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden durch Lösen von 1 % Agarose in siedendem TAE-Puffer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA Dinatriumsalz, 40 mM Essigsäure, pH 8) gefolgt von Zusatz von 50 $\mu\text{l/l}$ 1% Ethidiumbromid und Eingießen in Gelgefäße mit entsprechenden Probenkammern hergestellt. Nach Erkalten wurden Agarosegele luftdicht bei 4 °C gelagert, jedoch möglichst schnell verwendet. Agarose-Gelelektrophorese wurde bei 120 V in TAE-Puffer durchgeführt.

5. Experimenteller Teil

Agarosegele wurden nachfolgend mit einem UV-Gelreader analysiert.

AAV 26: Präparative Agarosegelelektrophorese

Die Herstellung von Agarosegelen für die präparative Elektrophorese sowie die Durchführung der Elektrophorese verlief analog zu AAV 25. Die Isolierung von DNA aus Gelbanden wurde mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt.

AAV 27: SDS-PAGE

Gele für SDS-Page wurden in zwei Stufen (Trenngel und Sammelgel) in einem speziell angefertigten Gelhalter für neun Gele gegossen. Nach Gießen des Trenngels wurde die noch flüssige Gellösung mit einigen Millilitern Isopropanol/Wasser 1:1 bedeckt, um Austrocknen des Trenngels zu verhindern. Nach etwa 30-45 min wurde die Isopropanollösung entfernt, das Sammelgel gegossen und die Probenkämme eingesteckt. Nach erneuter Wartezeit von etwa 30-45 min wurden die auspolymerisierten Gele in feuchte Papiertücher eingeschlagen (Laufpuffer) und bei 4 °C aufbewahrt. Folgende Lösungen und Puffer wurden verwendet:

Trenngel:

- 25 ml 30 % Acrylamid;
- 12,5 ml 4x Trenngelpuffer (1,5 M TRIS, 0,4 % (w/w) SDS, pH 8,8);
- 12,5 ml Wasser;
- 250 µl 10 % Ammoniumpersulfat;
- 25 µl TEMED;

Sammelgel:

- 5 ml 30 % Acrylamid;
- 7,5 ml 4x Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS, 0,4 % (w/w) SDS, pH 6,8);
- 17,5 ml Wasser;
- 240 µl 10 % Ammoniumpersulfat;
- 30 µl TEMED;

Laufpuffer: 250 mM TRIS, 1,92 M Glycin, 1 % (w/w) SDS;

2x Probenpuffer: 62,3 mM TRIS, 2 % (w/w) SDS, 10 % Glycerin, 5 % BME,
2 mg Bromphenolblau

Coomassiefärbelösung: 150 mg R-250 blau (1,5 % (w/w)), 120 ml Essigsäure,
440 ml Wasser, 440 ml Ethanol

Coomassieentfärbelösung: 120 ml Essigsäure, 440 ml Wasser, 440 ml Ethanol

Proteinproben wurden durch Zugabe eines identischen Volumens 2x Probenpuffer sowie durch Kochen bei 96 °C für 7 min vorbereitet. SDS-PAGE wurde bei Verwendung eines Gels bei

konstanter Stromstärke von 50-60 mA sowie bei Verwendung von zwei Gelen bei 100-120 mM in Laufpuffer durchgeführt. Anfärbung erfolgte durch Zugabe von Coomassiefärbelösung, Erhitzen der Lösung bis zum Sieden (Mikrowelle) sowie Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Abgießen der Färbelösung wurden Entfärbelösung sowie ein Stück Filterpapier (Zewa) zugegeben, erneut bis zum Sieden erhitzt und je nach gewünschtem Entfärbungsgrad für 1-18 h bei Raumtemperatur inkubiert.

AAV 28: Herstellung elektrokompenter Zellen

Es wurde steril gearbeitet. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde der gewünschte *E.coli*-Stamm (XL1 blue für Klonierung, BL21 (DE3) sowie BL21 (DE3) Codon Plus RIL für Expression) in einem Liter LB-Medium (Antibiotika) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 vermehrt und die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm und 4°C pelletiert. Nach Abgießen des Überstands wurden die Zellen in 3 ml GYT-Medium („glycerol, yeast extract, trypton,“ 0,125 % Hefeextrakt, 0,25 % Trypton, 10 % Glycerin) resuspendiert, aliquotiert (80 µl für XL1 blue, 50 µl für BL21 (DE3) und BL21 (DE3) RIL), mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

AAV 29: Testexpression

Der für das gewünschte Protein kodierende Plasmid wurde nach AAV 16 in *E.coli* BL21 (DE3) oder *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL transformiert, plattiert, sechs Kolonien mit einer sterilen Eppendorfspitze entnommen und 18 h bei 37 °C in 3 ml LB-Medium amplifiziert (Antibiotika). Die sechs erhaltenen Kulturen wurden in je 25 ml LB-Medium (Antibiotika) transferiert und bei 37 °C bis zu einem OD₆₀₀ von 0,6-0,8 vermehrt. Nach Abnahme einer Präinduktionsprobe (1 ml, Zentrifugation 13500 rpm, 5 min; Entfernung des Überstands; Zugabe 100 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer, SDS-PAGE siehe AAV 27) wurde mit IPTG induziert und das gewünschte Protein für 4-24 h bei 20-37 °C exprimiert. Nach Ende der Expression wurde eine Postinduktionsprobe genommen (wie Präinduktionsprobe). Prä- und Postinduktionsproben wurden nach AAV 27 mittels SDS-PAGE analysiert.

AAV 30: Expression und Koexpression

Nach Transformation des entsprechenden Plasmids in *E.coli* BL21 (DE3) oder *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL, Plattierung und Vermehrung in 25 ml LB-Medium (Antibiotika) (siehe AAV 16) wurde die Zellsuspension in 1 l LB-Medium (Antibiotika) gegeben und die Zellen bei 37 °C bis zu einem OD₆₀₀ von 0,6-0,8 vermehrt. Nach Abnahme einer Präinduktionsprobe (1

5. Experimenteller Teil

ml, Zentrifugation 13500 rpm, 5 min; Entfernung des Überstands; Zugabe 100 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer, SDS-PAGE siehe AAV 27) wurde mit IPTG induziert und das gewünschte Protein für 4-24 h bei 20-37 °C exprimiert. Nach Ende der Expression wurde eine Postinduktionsprobe genommen (wie Präinduktionsprobe), die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C in 15 min pelletiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in etwa 30 ml Lysepuffer (jeweiliger Proteinpuffer mit 1 mM Proteasehemmer PMSF und 2 mM Reduktionsmittel BME, siehe Puffer) aufgenommen. Nach Homogenisierung der Suspension folgte Lyse in einem Fluidizer (Entnahme Gesamtproteinprobe, 40 µl) und Ultrazentrifugation zur Entfernung nichtlöslicher Bestandteile des Lysats (35000 rpm, 4 °C, 30 min). Nach Entnahme einer Probe der Lösung (lösliche Proteine, 40 µl) und Abnahme der Lösung zur Aufreinigung wurde das Pellet in der gleichen Menge Lysepuffer resuspendiert und eine weitere Probe entnommen (unlösliche Proteine, 40 µl). War ein Polyhistidintag vorhanden, wurde das überexprimierte Protein zunächst mittels Nickelaffinitätschromatographie (AAV 31) aufgereinigt. Es folgte Dialyse zur Entfernung von Imidazol in TEV-TRIS für 18 Stunden bei 4 °C; eventuell vorhandene TEV-Proteasetags wurden während der Dialyse durch Zusatz von 1:20 TEV-Protease zur Proteinlösung geschnitten (AAV 32, vorherige Konzentrationsbestimmung mittels Bradfordverfahren). Zur Entfernung von TEV-Protease (funktionalisiert mit Polyhistidintag) sowie des geschnittenen Affinitätstags wurde nach der Dialyse ein erneuter Nickelaffinitätschromatographieschritt durchgeführt (AAV 31). Nach Zentrifugation der Proteinlösung in einem Ampliconzentrifugationsgefäß (MWCO 10 kDa) zur Reduzierung des Lösungsvolumens auf etwa 5-10 Millilitern wurde diese mittels Gelfiltrationschromatographie gereinigt (AAV 33). Die gewonnene Proteinlösung wurde aliquotiert, schockgefroren (flüssiger Stickstoff) und bei -80 °C gelagert.

AAV 31: Nickelaffinitätschromatographie

Nickelaffinitätschromatographie wurde mit Säulen des Typs HisTrap HP (General Electric) eines Säulenvolumens von 1 ml oder 5 ml durchgeführt. Als Puffersystem zur Erzeugung eines linearen Imidazolgradienten kamen typischerweise folgende Puffer zum Einsatz:

Puffer A: siehe jeweiliges Protein; typischerweise 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 2 mM DTE (nicht BME, da nicht kompatibel zum Säulenmaterial), pH mindestens 1,5 Einheiten größer als der pI des Proteins;

Puffer B: wie Puffer A, 500 mM Imidazol

Vor Verwendung erfolgte Regeneration bzw Reinigung der verwendeten Säulen nach folgender Waschprozedur (2-4 ml/min, jeweils 2 min):

100 mM EDTA;

Wasser;

6 M Guanidinium-HCl, 0,2 M Essigsäure;
Wasser;
0,1 M NiSO₄;
Wasser;
Puffer B;
Puffer A.

Je nach Säulengröße wurden für die Chromatographie Flussraten von 1 ml/min oder 5 ml/min verwendet. Nach Equilibrierung der Säule mit 4 % Puffer B equilibriert wurde die Proteinlösung (etwa 30 ml) auf die Säule aufgebracht. Es folgte ein Gradientenprogramm von 4 % B bis 80 % B bei gleichzeitiger Fraktionssammlung von 20 bis 30 Fraktionen (Steilheit des Gradienten über Fraktionsanzahl). Die Fraktionsgröße wurde analog zur Säulengröße als 1 ml oder 5 ml gewählt, während Probendetektion mittels UV-Absorption erfolgte. Nach Auftrennung wurden relevante Fraktionen mit SDS-PAGE analysiert, Fraktionen mit aufgereinigtem Protein vereinigt sowie zur Entfernung von Imidazol dialysiert (siehe AAV 32). Ggf. erfolgte simultan ein Verdau mit TEV-Protease zur Entfernung der Affinitätstags.

AAV 32: Dialyse/TEV-Proteaseverdau

Für die Dialyse kamen Dialyseschläuche mit 12 kDa MWCO zum Einsatz. Die zu verwendende Schlauch wurde ca. 15 min in Wasser gequollen und einseitig mit einer Klammer verschlossen. Nach Einfüllen der zu dialysierenden Proteinlösung wurde der Dialyseschlauch mit einer zweiten Klammer verschlossen und in ein Gefäß mit 4 l TEV-Dialysepuffer bei 4 °C (siehe jeweiliges Protein; typischerweise 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 2 mM BME, 1 mM EDTA bei pH 8,0) sowie einem magnetischen Rührstab eingebracht. Optional wurden der Proteinlösung zum Verdau von TEV-Schnittstellen z.B. zur Entfernung von Affinitätstags TEV-Protease im Verhältnis 1:20 zugesetzt (vorherige Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung nach Bradford, AAV 15). Der Dialysepuffer mit Dialyseschlauch wurde 12-18 h bei 4 °C gerührt, der Dialyseschlauch entfernt und die dialysierte Proteinlösung entnommen.

AAV 33: Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltrationschromatographie erfolgte mit Säulen des Typs Superdex 75 (General Electric) in den Größen 16/60 (120 ml Säulenvolumen, max. 5 ml Probenvolumen) sowie 26/60 (320 ml Probenvolumen, max. 13 ml Probenvolumen), die mit Volumenströmen von 1 ml/min bzw. 3 ml/min eingesetzt wurden. Nach Equilibrierung der Säule mit etwa einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer (siehe jeweiliges Protein; typischerweise 25 mM HEPES bei pH 7,2-7,4, 40 mM NaCl, 5 mM BME oder 3 mM DTE/DTT) wurde die Proteinlösung aufgebracht und nach

5. Experimenteller Teil

einem Totvolumen Fraktionen gesammelt:

16/60: Totvolumen 20 ml, Fraktionsgröße 1 ml, gesammeltes Volumen 120 ml;

26/60: Totvolumen 70 ml, Fraktionsgröße 3 ml, gesammeltes Volumen 320 ml.

Proteindetektion erfolgte mittels UV-Absorption. Nach erfolgter Auftrennung wurden relevante Fraktionen mit SDS-PAGE analysiert und vereinigt.

AAV 34: Proteinfarnesylierung mit FTase *in vitro*

Folgender Reaktionsansatz wurde für die Farnesylierung von Proteinen verwendet (Gesamtvolumen 40 µl):

Zu farnesylierendes Protein (Endkonzentration 125 µM, sofern nicht anders angegeben);

1,00 µl 1 mM ZnCl₂ (Endkonzentration 20 µM);

1,25 µl 2 % Tween-20 (Endkonzentration 0,05 %);

1,88 µl 2,44 mM Fpp in MeOH/10 mM NH₄OH 7:3 (0,95 Äq., Aldrich);

1:30 FTase;

Proteinpuffer (jeweils angegeben).

Die Lösung wurde 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, und Vollständigkeit der Farnesylierung mittels MALDI-MS überprüft (SA-Matrix, ggf. Kalibration gegen Standardmix C3). Das farnesylierte Protein wurde ohne Aufreinigung direkt verwendet.

AAV 35: Konzentrationsbestimmung von mCherry mit Fluoreszenzspektroskopie

Eine 1 ml Fluoreszenzküvette wurde mit 600 µl HEPES-Puffer (25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE) gefüllt. Sequentiell wurden 5 x 6,00 µl H₆-mCherry (226 mM, 6,7 g/l, bestimmt nach Bradford, AAV 15) zugegeben und ein Anregungsspektrum aufgenommen (5 nm Schlitzbreite, Anregung 425-600 nm, Emissionsfilter 610 nm, 500 nm/min, mCherry-Konzentrationen 2,23 µM, 4,43 µM, 6,58 µM, 8,69 µM, 10,8 µM). Die Küvette wurde erneut mit 600 µl HEPES-Puffer gefüllt, 10 µl der mCherry-Lösung unbekannter Konzentration hinzugegeben und ein Anregungsspektrum aufgenommen. Durch Vergleich des Emissionsmaximums der Probe mit den Emissionsmaxima der Kalibrationsmessung konnte die unbekannte Konzentration abgeschätzt werden.

5.3 Abschnittsspezifische Arbeitsvorschriften

5.3.1 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.1

AV 5.3.1.1 zur Optimierung der Thiol-En-Reaktion in Lösung

Je eine Thiol- und Olefinverbindung der Verbindungen **1-13** wurden in einer Konzentration von 1 M gelöst, und 0,5 ml der Lösung in ein GC-Probenglässchen gefüllt. Das Glässchen wurde mit Argon geflutet, mit Parafilm luftdicht verschlossen und UV-Licht bei 365 nm oder 256 nm ausgesetzt. Als Bestrahlungsapparaturen kamen entweder ein UV-Karussellreaktor (Rayonet, 365 nm, 0,2 mW/cm², oder 256 nm, 0,6 mW/cm²) sowie ein Photolithographiegerät zum Einsatz (Süss, 365 nm, 10 mW/cm²). Zu bestimmten Zeitpunkten oder nach Ende der Bestrahlung wurden mit einer Eppendorfpipette Reaktionsproben entnommen, verdünnt und mittels GC-MS vermessen. Reaktionsausbeute wurden durch Peakintegration bestimmt. Reaktionsbedingungen sowie Reaktionsausbeuten sind in den Tabellen E1a und E1b aufgeführt.

AV 5.3.1.2 zur Optimierung der Thiol-En-Reaktion an der festen Phase

Zu 100 mg Harz **15** (0,120 mmol) in einem zuvor unter Argon ausgeheizten Glasreaktor mit Fritte, Kühleinsatz und UV-Lampe (Penray, 256 nm, 0,6 mW/cm²) wurden 3 ml trockenes DMF gegeben und das Harz unter Einblasen von Argon und Schütteln des Reaktors auf einem Horizontalschüttler 20 min gequollen. 21 Äquivalente Thiol **1**, **3** oder **7** (2,52 mmol, 303 mg **1**, 278 mg **3**, 192 mg **7**) wurden hinzugefügt, das Harz für weitere 5-20 min unter Einblasen von Argon und Schütteln gequollen und drei Stunden mit UV-Licht bei 265 nm bestrahlt. Nach Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz nach folgender Prozedur im Reaktor gewaschen:

2 x Spülen DMF;

sowie je drei min Schütteln mit:

2 x DMF;

DMF/Wasser 1:1;

2 x DMF;

5 x DCM.

Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor mit Fritte überführt, und das Reaktionsprodukt durch Schütteln mit 3 x 4 ml 5 % TFA/DCM für je 10 min vom Harz abgespalten. Es folgte Waschen des Harzes mit 2 x 4 ml DCM für je 3 min, Vereinigung der Abspalt- und Waschphasen sowie Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck. Das Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Das Verhältnis zwischen

5. Experimenteller Teil

Thiol	Olefin	Lösungsmittel	t [min]	UV-Licht	T	pH	Ausbeute [%]
1	11	MeOH	5	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	50
			15				88
			30				97
			45				98
2	11	MeOH	5	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	3
			15				16
			30				45
			45				53
			60				57
			90				60
3	11	MeOH	5	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	44
			15				68
			30				78
			45				88
			60				90
4	11	MeOH	5	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	68
			15				91
			30				93
			45				92
5	11	MeOH	5	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	14
			10				39
			15				74
			20				84
			30				89
			50				93
			75				96

Thiol	Olefin	Lösungsmittel	t [min]	UV-Licht	T	pH	Ausbeute [%]
6	11	MeOH	2	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	22
			7				54
			10				79
			20				88
			25				96
			35				99
6	11	MeOH	0,5	365 nm, 10 mW/cm ²	25 °C	-	84
			1				91
			2				94
			5				96
6	11	MeOH	0,5	256 nm, 0,6 mW/cm ²	40 °C	-	11
			1				16
			2				27
			3				39
			5				51
			7,5				56
			10				59
			15				64
			20				70
30	80						
			45				80

Tabelle E1a: Reaktionsparameter und Ausbeuten der Versuchsreihe zur Thiol-En-Reaktion in Lösung.

Thiol	Olefin	Lösungsmittel	t [min]	UV-Licht	T	pH	Ausbeute [%]
5	8	MeOH	15	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	99
							97
							55
							74
							64
							82
5	11	MeOH	15	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	-	73
		DMF					43
		Ethylenglykol					82
		Aceton					70
		MeCN					25
		DMSO					64
		Diethylether					77
5	11	MeOH	60	365 nm, 0,1 mW/cm ²	25 °C	-	51
		DMF					15
		Ethylenglykol					42
		Aceton					16
		MeCN					10
5	11	MeOH	240	365 nm, 0,1 mW/cm ²	25 °C	-	99
		DMF					40
		Ethylenglykol					89
		Aceton					90
		MeCN					75
6	11	Wasser	15	365 nm, 0,1 mW/cm ²	40 °C	4,6	40
						7,5	63
						8,7	42

Thiol	Olefin	Lösungsmittel	t [min]	UV-Licht	T	pH	Ausbeute [%]
1	Harz	DMF	180	365 nm, 0,1 mW/cm ²	11-15 °C	-	85
3							0
7							12

Tabelle E1b: Reaktionsparameter und Ausbeuten der Versuchsreihe zur Thiol-En-Reaktion in Lösung (Fortsetzung).

der mit Integration bestimmten Fläche charakteristischer Edukt- und Produktpeaks ergab die Reaktionsausbeute. Reaktionsbedingungen sowie Reaktionsausbeuten sind in Tabelle E1b aufgeführt.

AV 5.3.1.3 zum Vergleich verschiedener Oberflächen in der Thiol-En-Mikrostrukturierung (Spin-Coating)

Die in Tabelle E2 angegebenen thiole funktionalisierten Oberflächen wurden nach AAV 6 und AAV 7 hergestellt und nach AAV 8 mittels Spin-Coating mit Biotinverbindung **17** in einer Konzentration von 10 mM in DMF/Toluol und mit einer Bestrahlungszeit von 10 min mikrostrukturiert. Es folgte Nachweis von immobilisiertem Biotin nach AAV 13 (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5). Reaktionsbedingungen sowie quantitative Ergebnisse sind in Tabelle E2 dargestellt (gemittelte Fluoreszenzintensitäten). Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang.

5. Experimenteller Teil

Biotin- verbindung	Lösungsmittel	Applikation	Oberfläche	c_{UV}	t_{UV}	Signal	Hintergrund
17	DMF/Toluol 3:1	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 100 nm PECVD	10 mM	10 min	2,9x10 ⁴	0,9x10 ⁴
			Thiol-PAMAM + 250 nm PECVD			2,9x10 ⁴	0,2x10 ⁴
			Thiol-PAMAM + 500 nm PECVD			5,2x10⁴	0,5x10⁴
			Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD			3,7x10 ⁴	0,4x10 ⁴
			Thiol-PAMAM + 1000 nm therm. ox.			1,5x10 ⁴	0,3x10 ⁴
			Thiol-PAMAM + 200 nm PECVD + 1000 nm therm. ox.			1,9x10 ⁴	0,2x10 ⁴
			Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD + 1000 nm therm. ox.			5,0x10 ⁴	0,6x10 ⁴
			Thiol-PAMAM + Glas			0,6x10 ⁴	0,3x10 ⁴

Biotin- verbindung	Lösungsmittel	Applikation	Oberfläche	c_{UV}	t_{UV}	Signal	Hintergrund
17	DMF/Toluol 3:1	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	10 min	4,0x10⁴	0,09x10⁴
			Thiol + 1000 nm PECVD			0,8x10 ⁴	0,3x10 ⁴

Biotin- verbindung	Lösungsmittel	Applikation	Oberfläche	c_{UV}	t_{UV}	Signal	Hintergrund
16	DMF/Toluol 3:1	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	10 min	0,04x10 ⁴	0,01x10 ⁴
17	DMF/Toluol 3:1	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	10 min	4,3x10⁴	0,4x10⁴
18	EtOH	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	10 min	4,5x10⁴	0,5x10⁴

Biotin- verbindung	Lösungsmittel	Applikation	Oberfläche	c_{UV}	t_{UV}	Signal	Hintergrund
18	Ethylenglykol	Drop- Casting	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	10 min	4,5x10⁴	0,5x10⁴
19	Ethylenglykol	Drop- Casting	Olefin-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	10 min	3,0x10 ⁴	2,4x10 ⁴

Biotin- verbindung	Lösungsmittel	Applikation	Oberfläche	c_{UV}	t_{UV}	Signal	Hintergrund
17	DMF/Toluol 3:1	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	3 s	0,5x10 ⁴	0,4x10 ⁴
				10 mM	30 s	0,7x10 ⁴	0,4x10 ⁴
				10 mM	1 min	1,2x10 ⁴	0,5x10 ⁴
				10 mM	10 min	4,3x10⁴	0,4x10⁴
17	DMF/Toluol 3:1	Spin-Coating	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	0,01 mM	10 min	0,08x10 ⁴	0,04x10 ⁴
				0,1 mM	10 min	0,5x10 ⁴	0,2x10 ⁴
				1 mM	10 min	3,0x10 ⁴	0,5x10 ⁴
				10 mM	10 min	6,0x10⁴	0,6x10⁴

Biotin- verbindung	Lösungsmittel	Applikation	Oberfläche	c_{UV}	t_{UV}	Signal	Hintergrund
18	Ethylenglykol	Drop-Casting	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	10 mM	1 min	0,1x10 ⁴	0,04x10 ⁴
				10 mM	5 min	0,3x10 ⁴	0,03x10 ⁴
				10 mM	10 min	0,6x10⁴	0,06x10⁴
				10 mM	30 min	1,2x10⁴	0,06x10⁴
18	Ethylenglykol	Drop-Casting	Thiol-PAMAM + 1000 nm PECVD	0,5 mM	10 min	0,04x10 ⁴	0,01x10 ⁴
				1 mM	10 min	0,06x10 ⁴	0,01x10 ⁴
				10 mM	10 min	0,6x10⁴	0,06x10⁴
				30 mM	10 min	2,0x10 ⁴	0,8x10 ⁴
				50 mM	10 min	2,5x10 ⁴	1,5x10 ⁴

Tabelle E2: Prozessparameter und quantitative Auswertung der Versuchsreihe zur Mikrostrukturierung.

AV 5.3.1.4 zum Vergleich verschiedener Anker-moleküle in der Thiol-En-Mikrostrukturierung (Spin-Coating)

Die Biotinverbindungen **16** (in DMF/Toluol 3:1), **17** (in DMF/Toluol 3:1) und **18** (in EtOH) wurden mittels Spin-Coating in einer Konzentration von 10 mM und mit einer Bestrahlungszeit von 10 min nach AAV 8 auf thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Oberfläche (1000 nm) mikrostrukturiert, und immobilisiertes Biotin nach AAV 13 nachgewiesen (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5). Reaktionsbedingungen sowie quantitative Ergebnisse sind in Tabelle E2 dargestellt (gemittelte Fluoreszenzintensitäten). Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang.

AV 5.3.1.5 zum Vergleich verschiedener Anker-moleküle in der Thiol-En-Mikrostrukturierung (Drop-Casting)

Die Biotinverbindungen **18** und **19** wurden in einer Konzentration von 10 mM in Ethylenglykol gelöst und mittels Drop-Casting nach AAV 9 mit 10 min Bestrahlungszeit auf thiol-PAMAM- bzw. olefin-PAMAM-funktionalisierten PECVD-SiO_x/Si-Oberflächen (1000 nm) mikrostrukturiert. Nachweis immobilisierten Biotins erfolgte mit Streptavidin-Cy5 nach AAV 13 (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5). Reaktionsbedingungen sowie quantitative Ergebnisse sind in Tabelle E2 dargestellt (gemittelte Fluoreszenzintensitäten). Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang.

AV 5.3.1.6 zum Einfluss von Konzentration und Bestrahlungsdauer in der Thiol-En-Mikrostrukturierung (Spin-Coating).

Biotin-Verbindung **17** wurde mittels Spin-Coating nach AAV 8 auf thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Oberflächen (1000 nm) mikrostrukturiert. Verwendet wurden Bestrahlungszeiten von 3 s bis 10 min sowie Konzentrationen von 0,01 mM bis 10 mM. Immobilisiertes Biotin wurde nach AAV 13 mit Streptavidin-Cy5 nachgewiesen (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5). Reaktionsbedingungen sowie quantitative Ergebnisse sind in Tabelle E2 dargestellt (gemittelte Fluoreszenzintensitäten). Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang.

AV 5.3.1.7 zum Einfluss von Konzentration und Bestrahlungsdauer in der Thiol-En-Mikrostrukturierung (Drop Casting).

Biotin-Verbindung **18** wurde mittels Drop-Casting nach AAV 9 auf thiol-PAMAM-

funktionalisierten PECVD-SiO_x/Si-Oberflächen (1000 nm) mikrostrukturiert. Konzentrationen von 0,5 mM bis 50 mM sowie Bestrahlungszeiten von einer Minute bis 30 min kamen zum Einsatz. Immobilisiertes Biotin wurde nach AAV 13 mit Streptavidin-Cy5 detektiert (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5). Reaktionsbedingungen sowie quantitative Ergebnisse sind in Tabelle E2 dargestellt (gemittelte Fluoreszenzintensitäten). Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang.

5.3.2 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.2

AV 5.3.2.1 zur Thiol-En-Photomikrostrukturierung von Phosphopeptiden

Eine thiol-PAMAM-funktionalisierte, objektträgergroße PECVD-SiO_x/Si-Oberfläche (1000 nm) wurde nach dem Drop-Casting-Verfahren (AAV 9) mit 5 mM Phosphopeptid **21** in Wasser mikrostrukturiert (Bestrahlungszeit 10 min). Der Objektträger wurde 10 min mit TETBS-Puffer gewaschen und 30 min mit MESTBS-Puffer geblockt (siehe AAV 11). Nachfolgend wurde mit HEPES-Puffer (25 mM HEPES bei pH 7,2, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 2 mM DTT) gespült und eine Stunde mit 1:133 Cy5-markiertem anti-Phosphotyrosinantikörper (erhalten durch Präinkubation von biotinyliertem Antikörper mit Streptavidin-Cy5, gefolgt durch Absättigung mit Biotin) in HEPES-Puffer inkubiert. Nach Waschen mit TETBS-Puffer für zweimal 10 min wurde der Objektträger mit Wasser gespült, unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 analysiert (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5).

Ein zweiter Objektträger wurde in analoger Weise hergestellt. Nach Blocken der Oberfläche mit MESTBS-Puffer erfolgte Inkubation der Oberfläche mit der Phosphatase PTP1B (1,3 µg/ml, 25 °C) in HEPES-Puffer. Anschließend wurde die Prozedur wie zuvor beschrieben fortgeführt.

Ohne PTP1B: Signal: $0,8 \times 10^4$, Hintergrund: $0,4 \times 10^4$;

25 min 1,3 µg/ml PTP1B: Signal: $0,3 \times 10^4$, Hintergrund: $0,18 \times 10^4$

(Gemittelte Fluoreszenzintensitäten; für Fluoreszenzaufnahme siehe Anhang).

AV 5.3.2.2 zur Thiol-En-Mikrostrukturierung von Biotin mittels Mikrofluidik

Der für die Thiol-En-Mikrostrukturierung eingesetzte mikrofluidische Chip war mit Hilfe einer geeigneten Abgussform in Kooperation mit Dr. Markus Fleger nach etablierten Prozeduren aus PDMS (Arbeitsgebiet Mikrostrukturtechnik, TU Dortmund) hergestellt worden. Der Chip war in Objektträgergröße (75x25 mm²) angefertigt und besaß einen halboffenen, mikrofluidischen Kanal mit einer Breite von 100 µm und einer Höhe von 20 µm, drei halboffenen

Flüssigkeitsreservoirien sowie drei Befüllungsöffnungen (siehe Abbildung 20, Allg. Teil). Nach Aufbringen des Chips auf eine objektträgergroße Oberfläche und Fixierung mit transparentem Klebeband entstand eine luftdichte Verbindung zwischen beiden Materialien, während der Kanal sowie die Flüssigkeitsreservoirie einseitig durch den Objektträger verschlossen wurde. Nach luftdichtem Verschließen einer Befüllungsöffnung mit einem kurzen Stück abgeschmolzenen Kunststoffschlauchs (ID ~1 mm) wurde eine zweite Befüllungsöffnung über Kunststoffschlauch sowie einen Adapter aus Gummischlauch luftdicht mit einer 1 ml Einwegspritze verbunden. Für den mikrofluidischen Kanal vorgesehene Lösungen bzw. Lösungsmittel wurden mit Hilfe einer Mikroliterpipette in das offene Flüssigkeitsreservoir eindosiert (~100 µl) und durch Erzeugung eines Vakuums mit der Spritze in den mikrofluidischen Kanal eingesogen. Waschen des Kanals erfolgte durch Entfernung überschüssiger Lösung aus dem Flüssigkeitsreservoir sowie mehrfacher Befüllung mit Lösungsmittel und Ansaugen des gesamten Lösungsmittels durch den Kanal.

Nach Fixierung des mikrofluidischen Chips auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (1000 nm) wurde eine Lösung der olefinfunktionalisierten Biotinverbindung **17** (10 mM in DMF/Toluol 3:1) in den Kanal gesogen, der Flüssigkeitsstrom gestoppt und der gesamte Aufbau 10 min mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt (Photolithographieapparat). Der Kanal wurde mit DMF gewaschen und der mikrofluidische Chip abgelöst. Immobilisiertes Biotin wurde mit Hilfe von Streptavidin-Cy5 nachgewiesen (siehe AAV 13, GenePix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5).

Signal: $3,2 \times 10^3$, Hintergrund: $0,05 \times 10^3$

(gemittelte Fluoreszenzintensitäten; Hintergrund = Intensität außerhalb des Kanals; für Fluoreszenzaufnahme siehe Anhang).

5.3.3 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.3

AV 5.3.3.1 zu Biotinmikroarrays

Biotinverbindung **19** sowie Kontrolle **22** wurden in vier Konzentrationen (50 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM) in TBS-Puffer (25 mM TRIS bei pH 7,5, 150 mM NaCl) mit 5 mM TCEP und 20 % Glycerin gelöst und nach AAV X auf einem olefin-PAMAM-funktionalisierten Glasobjektträger ein Mikroarray erzeugt (Bestrahlungszeit 10 min). In gleicher Weise wurde mit Biotinverbindung **18** sowie Kontrolle **22** ein Mikroarray auf einem olefin-PAMAM-funktionalisierten Glasobjektträger hergestellt. Die Mikroarrays wurden zweimal 10 min in TETBS-Puffer im Ultraschallbad gereinigt, und immobilisiertes Biotin nach AAV 13 mit Streptavidin-Cy5 nachgewiesen (Typhoon Trio+, Standardeinstellungen für Cy5). Quantitative Ergebnisse sind in Tabelle E3 dargestellt. Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang.

5. Experimenteller Teil

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)				
	50mM	10mM	1mM	0.1mM
18	3.80E+07	1.94E+07	7.93E+06	2.17E+06
22 (Kontrolle)	1.32E+06	5.13E+05	1.27E+05	0.00E+00
18	3.56E+07	2.45E+07	6.47E+06	1.26E+06
22 (Kontrolle)	1.25E+06	6.48E+05	0.00E+00	0.00E+00
18	4.13E+07	2.08E+07	7.05E+06	2.19E+06
22 (Kontrolle)	0.00E+00	5.58E+05	1.64E+05	0.00E+00
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)				
	50mM	10mM	1mM	0.1mM
18	4.58E+07	2.33E+07	7.00E+06	2.12E+06
22 (Kontrolle)	1.05E+06	5.90E+05	1.44E+05	0.00E+00
18	5.24E+07	2.27E+07	7.06E+06	2.17E+06
22 (Kontrolle)	1.19E+06	5.87E+05	1.51E+05	0.00E+00
18	5.07E+07	2.38E+07	7.01E+06	2.16E+06
22 (Kontrolle)	1.06E+06	5.82E+05	1.40E+05	0.00E+00
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)				
	50mM	10mM	1mM	0.1mM
18	4.24E+07	2.37E+07	6.81E+06	2.19E+06
22 (Kontrolle)	1.29E+06	4.01E+05	2.12E+05	0.00E+00
18	4.56E+07	2.17E+07	7.62E+06	2.22E+06
22 (Kontrolle)	1.35E+06	5.40E+05	1.20E+05	0.00E+00
18	5.22E+07	1.97E+07	5.87E+06	2.16E+06
22 (Kontrolle)	1.58E+06	4.55E+05	1.43E+05	0.00E+00

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)				
	0.1mM	1mM	10mM	50mM
19	2.34E+07	3.14E+07	7.62E+07	6.95E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	1.17E+06	1.37E+06	5.88E+06
19	2.75E+07	3.70E+07	8.26E+07	8.74E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	5.75E+05	1.98E+06	5.95E+06
19	2.72E+07	3.71E+07	8.70E+07	8.72E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	8.47E+05	1.82E+06	5.85E+06
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)				
	0.1mM	1mM	10mM	50mM
19	1.73E+07	3.27E+07	6.29E+07	7.48E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	1.88E+05	1.18E+06	5.89E+06
19	2.19E+07	3.07E+07	5.79E+07	7.74E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	3.60E+05	1.34E+06	6.28E+06
19	1.69E+07	3.05E+07	6.06E+07	7.95E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	0.00E+00	1.70E+06	7.62E+06
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)				
	0.1mM	1mM	10mM	50mM
19	1.92E+07	2.86E+07	6.43E+07	7.37E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	1.15E+06	2.81E+06	9.60E+06
19	1.61E+07	3.07E+07	7.12E+07	7.53E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	9.34E+05	2.60E+06	8.72E+06
19	1.64E+07	2.91E+07	6.06E+07	6.26E+07
22 (Kontrolle)	0.00E+00	9.98E+05	1.53E+06	5.01E+06

Tabelle E3: Quantitative Auswertung der Biotinmikroarrays.

AV 5.3.3.2 zu Oligonukleotidmikroarrays

Thiofunktionalisiertes Oligonukleotid **23** sowie die unfunktionalisierte Kontrolle **24** wurden in vier Konzentrationen (100 μM , 20 μM , 4 μM , 0,8 μM) in TBS-Spottingpuffer (7,7 mM TRIS bei pH 7,5, 150 mM NaCl, 20 % Glycerin, 5 mM TCPE) gelöst und nach AAV 10 ein Mikroarray auf einem olefin-PAMAM-funktionalisierten Glasslide hergestellt (10 min Bestrahlungszeit). Der Objektträger wurde nach AAV 11 dreimal je 5 min mit TETBS-Puffer gewaschen, 30 min mit TETBS-Puffer mit 1 g/l DNA geblockt und eine Stunde mit 1 nM Cy5-markiertem Oligonukleotid **25** in TETBS mit 1 g/l DNA inkubiert. Nachfolgend wurde dreimal je 5 min mit TETBS-Puffer gewaschen, und mit TETBS-Puffer gespült. Der Objektträger wurde in Wasser getaucht und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Typhoon Trio+, Standardeinstellungen für Cy5). Die quantitativen Ergebnisse sind in Tabelle E4 dargestellt. Fluoreszenzaufnahmen sind dem Anhang zu entnehmen.

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)				
	0.8μM	4μM	20μM	100μM
23	2.04E+05	2.29E+06	9.14E+06	1.00E+07
24 (Kontrolle)	1.44E+05	6.74E+05	8.08E+05	7.43E+05
23	1.28E+05	2.46E+06	1.05E+07	1.11E+07
24 (Kontrolle)	2.63E+05	4.82E+05	7.20E+05	8.00E+05
23	4.22E+05	2.30E+06	1.05E+07	1.04E+07
24 (Kontrolle)	2.16E+05	1.30E+05	7.65E+05	7.76E+05
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)				
	0.8μM	4μM	20μM	100μM
23	4.68E+05	2.60E+06	1.10E+07	1.08E+07
24 (Kontrolle)	2.08E+05	4.22E+05	8.04E+05	8.21E+05
23	3.42E+05	2.52E+06	1.10E+07	1.19E+07
24 (Kontrolle)	1.96E+05	3.77E+05	8.30E+05	8.77E+05
23	2.92E+05	2.55E+06	1.05E+07	1.27E+07
24 (Kontrolle)	1.75E+05	3.97E+05	8.52E+05	8.85E+05
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)				
	0.8μM	4μM	20μM	100μM
23	3.54E+05	1.88E+06	7.60E+06	9.17E+06
24 (Kontrolle)	2.33E+05	3.49E+05	6.10E+05	4.25E+05
23	3.01E+05	1.88E+06	8.10E+06	8.77E+06
24 (Kontrolle)	2.77E+05	0.00E+00	5.51E+05	4.51E+05
23	2.58E+05	1.83E+06	8.70E+06	9.71E+06
24 (Kontrolle)	1.86E+05	2.42E+05	5.75E+05	4.22E+05

Tabelle E4: Quantitative Auswertung des Oligonukleotidmikroarrays.

AV 5.3.3.3 zur Herstellung eines Mikroarrays mit biotinyliertem MUC-1-Peptid 259 und Kontrolle 27

(durchgeführt von Dr. Ulrika Westerlind)

Nach AAV 10 wurde mit biotinyliertem, thioolfunktionalisierten MUC1-Peptid **26** in PBS-Puffer mit 20 % Glycerin (2,5 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,05 mM) sowie der acetylierten Kontrolle **27** (2,5 mM, 0,25 mM) auf einem olefin-PAMAM-funktionalisierten Glasobjektträger ein Mikroarray hergestellt (10 min Bestrahlungszeit). Der Objektträger wurde mit Wasser gespült, unter einem Argonstrom getrocknet, und GeneFrames (75 µl) wurden auf die drei Subarrays aufgebracht. Die Subarrays wurden 10 min mit 80 µl PBS-T-Puffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) gewaschen und zweimal 15 min mit je 80 µl Blockingpuffer (PBS mit 0,2 % Tween-20, 3 % BSA) inkubiert. Es wurde erneut 10 min mit 80 ml PBS-T-Puffer gewaschen, 45 min mit 100 nM Streptavidin-Cy5 inkubiert und dreimal mit je 80 µl PBS-T-Puffer gewaschen. Die GeneFrames wurden entfernt, der Objektträger mit Wasser gespült und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Typhoon Trio+, Standardeinstellungen für Cy5). Quantitative Ergebnisse sowie Fluoreszenzaufnahmen sind Abbildung 25, Allg. Teil zu entnehmen.

AV 5.3.3.4 zur Herstellung eines Mikroarrays mit MUC1-Peptid 28 und Kontrolle 29

(durchgeführt von Dr. Ulrika Westerlind)

Mit thioolfunktionalisiertem MUC1-Peptid **28** in PBS-T-Puffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) mit 0,5 Äquivalenten TCEP (2,5 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,05 mM) sowie der Kontrolle **29** (2,5 mM, 0,25 mM) wurde nach AAV 10 ein Mikroarray auf einer olefinfunktionalisierten Hydrogeloberfläche in Objektträgergröße (75x25 mm²) hergestellt (Bestrahlungszeit 10 min). Der Objektträger wurde mit Wasser gespült, unter einem Argonstrom getrocknet, und GeneFrames (75 µl) wurden auf die drei Subarrays aufgebracht. Die Subarrays wurden 10 min mit 80 µl PBS-T-Puffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) gewaschen und zweimal 15 min mit je 80 µl Blockingpuffer (PBS mit 0,2 % Tween-20, 3 % BSA) inkubiert. Es wurde erneut 10 min mit 80 ml PBS-T-Puffer gewaschen, 45 min mit 1:400 primärem, monoklonalen Mausantikörper (SM3, gegen deglycosyliertes Mucin)^[97, 98] inkubiert und dreimal 10 min mit je 80 µl PBS-T-Puffer gewaschen. Nachfolgend wurde 45 min mit Cy5-markiertem, sekundären anti-Maus-Antikörper inkubiert und dreimal 10 min mit je 80 µl PBS-T-Puffer gewaschen. Die GeneFrames wurden entfernt, der Objektträger mit Wasser gespült und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Typhoon Trio+, Standardeinstellungen für Cy5). Quantitative Ergebnisse sowie Fluoreszenzaufnahmen sind Abbildung 25, Allg. Teil zu entnehmen.

AV 5.3.3.5 zur Herstellung eines Mikroarrays mit MUC1-Glykopeptid **30** und Kontrolle **31**

(durchgeführt von Dr. Ulrika Westerlind)

Thioleffunktionalisiertes MUC1-Glykopeptid **30** wurde in vier Konzentrationen (2,5 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,05 mM) sowie die Kontrolle **31** in zwei Konzentrationen (2,5 mM, 0,25 mM) in PBS-T-Puffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) mit 0,5 Äquivalenten TCEP gelöst und nach AAV 10 auf einer olefinfunktionalisierten Hydrogeloberfläche in Objektträgergröße ein Mikroarray generiert. Der Objektträger wurde mit Wasser gespült, unter einem Argonstrom getrocknet, und GeneFrames (75 µl) wurden auf die drei Subarrays aufgebracht. Die Subarrays wurden 10 min mit 80 µl PBS-T-Puffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) gewaschen und zweimal 15 min mit je 80 µl Blockingpuffer (PBS mit 0,2 % Tween-20, 3 % BSA) inkubiert. Es wurde erneut 10 min mit 80 ml PBS-T-Puffer gewaschen, 45 min mit 1:4000 Maus-Serum (aus Impfung mit einem Konjugat von MUC1-Glykopeptid **32** und Tetanusprotein)^[77] inkubiert und dreimal 10 min mit je 80 µl PBS-T-Puffer gewaschen. Nachfolgend wurde 45 min mit Cy5-markiertem, sekundären anti-Maus-Antikörper inkubiert und dreimal 10 min mit je 80 µl PBS-T-Puffer gewaschen. Die GeneFrames wurden entfernt, der Objektträger mit Wasser gespült und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Typhoon Trio+, Standardeinstellungen für Cy5). Quantitative Ergebnisse sowie Fluoreszenzaufnahmen sind Abbildung 25, Allg. Teil zu entnehmen.

5.3.4 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.4

AV 5.3.4.1 zur Herstellung ligierter N-Ras¹⁻¹⁸¹-Proteine

Die Vorschrift folgt ^[80]. Zu N-Ras¹⁻¹⁸¹ in TRIS Puffer (20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) wurde bei 4 °C 1 Äquivalent MIC-funktionalisiertes Peptid (**34** oder **35**) gegeben und 16 h bei 4° C inkubiert. Der Ligationsfortschritt wurde mit MALDI-MS kontrolliert (SA-Matrix, nicht kalibriert):

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin: m/z: berechnet 21533, gefunden 21523 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Olefin: m/z: berechnet 21520, gefunden 21507 [M+H]⁺.

Der Ligationsansatz wurde mit einer Entsalzungssäule (HiTrap) aufgereinigt.

Zur Herstellung von mit GppNHp-beladenem, ligierten N-Ras¹⁻¹⁸¹ wurde vor der Ligation ein Nukleotidaustausch durchgeführt.^[83]

AV 5.3.4.2 zur indirekten Thiol-En-Photomikrostrukturierung alkalischer Phosphatase (CIAP) und Nachweis mit anti-CIAP-Antikörper

Biotinylierte CIAP in TETBS wurde nach AAV 14 indirekt mikrostrukturiert. Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 10 min mit TETBS mit 0,5 % Slimfast geblockt und eine Stunde mit 1:500 monoklonalem anti-CIAP-Mausantikörper in TETBS mit 0,5 % Slimfast inkubiert. Es folgte Waschen für zweimal 10 min mit TETBS mit 0,5 % Slimfast und Inkubation mit 1:500 polyklonalem, Cy5-markierten anti-Maus-Ziegenantikörper in TETBS mit 0,5 % Slimfast für eine Stunde. Der Objektträger wurde zweimal 10 min mit TETBS-Puffer gewaschen, mit Wasser gespült und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy5).

Signal: $6,0 \times 10^3$;

Hintergrund: $0,6 \times 10^3$

(gemittelte Fluoreszenzintensitäten; für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.4.3 zur indirekten Thiol-En-Photomikrostrukturierung alkalischer Phosphatase (CIAP) und Nachweis mit VektorRed

Biotinylierte CIAP in TETBS wurde nach AAV 14 indirekt mikrostrukturiert (mit **17**). Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 10 min mit TETBS-Puffer gewaschen und 10-45 min mit VektorRed-Lösung inkubiert (hergestellt nach Anweisung des VektorRed-Kits). Es folgte Waschen mit TRIS-Puffer für 5 min, Spülen mit Wasser und Trocknen unter einem Argonstrom. Analyse der Oberfläche wurde mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 durchgeführt (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy3).

Signal: $2,4 \times 10^5$;

Hintergrund: $0,2 \times 10^5$

(gemittelte Fluoreszenzintensitäten; für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.4.4 zur indirekten Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin und Nachweis mit anti-Ras-Antikörper

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin in TRIS-Puffer (1 μ M, 20 mM TRIS bei pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 10 μ M GDP, 2 mM DTE) wurde nach AAV 14 mikrostrukturiert (mit **18**). Die Oberfläche wurde nach AAV 11 mit TRIS-Puffer gespült und zweimal 10 min mit TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast geblockt. Es wurde eine Stunde mit 1:1500 Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper in TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast inkubiert, zweimal 10 min mit TRIS-Puffer gewaschen und mit Wasser gespült. Der Objektträger wurde unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem

Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 analysiert (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy3).

Signal: $5,5 \times 10^3$;

Hintergrund: $0,5 \times 10^3$.

(gemittelte Fluoreszenzintensitäten; für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.4.5 zur indirekten Thiol-En-Photomikrostrukturierung von GDP- und GppNHp-beladenem N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin und Interaktion mit RBD-YFP sowie Nachweis mit anti-Ras-Antikörper

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin (GDP-beladen) in TRIS-Puffer (1 μ M, 20 mM TRIS bei pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE) mit 10 μ M GDP sowie N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin (GppNHp-beladen) in TRIS-Puffer mit 10 μ M GppNHp wurden nach AAV 14 auf den beiden Hälften eines Objektträgers getrennt voneinander indirekt mikrostrukturiert (mit **18**). Die Oberfläche wurde nach AAV 11 mit TRIS-Puffer gespült und zweimal 10 min mit TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast geblockt. Es wurde eine Stunde mit 1 μ M RBD-YFP in TRIS-Puffer inkubiert und 1 min in TRIS-Puffer gewaschen. Die Oberfläche wurde kurz (!) in Wasser getaucht, unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner analysiert.

Eine auf gleiche Weise hergestellte, mikrostrukturierte Oberfläche wurde nach der Bestrahlung mit TRIS-Puffer gespült, zweimal 10 min mit TRIS-Puffer gewaschen und 30 min mit TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast geblockt. Nachfolgend wurde eine Stunde mit 1:1500 Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper in TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast inkubiert, zweimal 10 min mit TRIS-Puffer gewaschen und mit Wasser gespült. Der Objektträger wurde unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 analysiert (Typhoon Trio+, Anregung 488 nm, Emissionsfilter 520 BP20).

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin (GDP) + RBD-YFP: keine Strukturen;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin (GppNHp) + RBD-YFP: Signal: $1,2 \times 10^5$, Hintergrund: $0,85 \times 10^5$;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin (GDP und GppNHp) + anti-Ras-Ab: Signal: $7,0 \times 10^3$, Hintergrund: $0,5 \times 10^3$.

(gemittelte Fluoreszenzintensitäten; für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

5.3.5 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.5

AV 5.3.5.1 zur direkten Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Olefin

20 μ l 100 μ M N-Ras¹⁻¹⁸¹-Olefin in TRIS-Puffer (20 mM TRIS bei pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM

5. Experimenteller Teil

DTE) wurden nach AAV 9 mittels Drop-Casting auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (1000 nm) mikrostrukturiert (10 min Bestrahlungszeit). Der Objektträger wurde nach AAV 11 10 min in TRIS-Puffer gewaschen, 10 min in TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast geblockt und eine Stunde mit 1:1500 Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper in TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal 10 min mit TRIS-Puffer gewaschen, die Oberfläche in Wasser getaucht und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy3).

Signal: $3,3 \times 10^3$;

Hintergrund: $1,8 \times 10^3$

(gemittelte Fluoreszenzintensität; für Fluoreszenzaufnahme siehe Anhang).

AV 5.3.5.2 zur direkten Thiol-En-Photomikrostrukturierung von N-Ras, H-Ras und K-Ras4BFar

N-Ras, H-Ras und K-Ras4BFar in TRIS-Puffer (1 μ M, 20 mM TRIS bei pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE) wurden nach AAV 34 *in vitro* mit FTase und Fpp farnesyliert (Proteinendkonzentration 100 μ M). N-RasFar, H-RasFar und K-Ras4BFar wurden nach AAV 9 mittels Drop-Casting auf je einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (500 nm) mikrostrukturiert (Bestrahlungszeit 10 min). Die Objektträger wurden nach AAV 11 mit TRIS-Puffer gespült, zweimal 10 min mit TRIS-Puffer mit 0,05 % Tween-20 gewaschen und 30 min mit TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast geblockt. Es wurde eine Stunde mit 1:5000 Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper inkubiert, zweimal 10 min mit TRIS-Puffer gewaschen und mit Wasser gespült. Die Oberfläche wurde unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 analysiert (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy3).

H-RasFar: Signal: $4,0 \times 10^2$, Hintergrund: $2,8 \times 10^2$;

N-RasFar: Signal: $2,5 \times 10^2$, Hintergrund: $1,9 \times 10^2$;

K-Ras4BFar: Signal: $6,5 \times 10^3$, Hintergrund: $1,5 \times 10^3$

(gemittelte Fluoreszenzintensitäten; für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.5.3 zur NMR-Untersuchung der Reaktivität des Farnesylrestes

20,0 mg H-Cys(Far)-OMe (**36**, 58,9 μ mol) wurden in 58,9 μ l DMF gelöst und 63,2 ml 1-Butanthiol (589 μ mol) hinzugefügt. Die Lösung wurde in ein GC-Probenglässchen gegeben und unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt (Penray, Abstand 0,5 cm, 0,1 mW/cm²). Nach 90 h Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung mit

HPLC-MS analysiert (C4-Säule, B: MeOH mit 5 % THF und 0,1 % TFA, 1 min 0,5 % B, 2-15 min 0,5-100 % B):

Edukt: t_R 10,7 min, m/z 339,86 $[M+H]^+$ (ber. 340,23), 55 % (APCI);

Monoaddukt: t_R 12,1 min, m/z 429,94 $[M+H]^+$ (ber. 430,28). 45 % (APCI).

Das Gemisch wurde mit präparativer HPLC-MS aufgereinigt (C4, B: MeOH mit 5 % THF und 0,1 % TFA, 2 min 10 % B, 3-13 min 10-100 % B). Nach Lyophilisierung der vereinigten Fraktionen wurden erhalten:

5 mg (15 μ mol, 25 %) Edukt;

5 mg (12 μ mol, 20 %) Monoadduktgemisch (**37a**, **37b** oder **37c**).

Das Monoadduktgemisch wurde mittels NMR-Spektroskopie analysiert ($CDCl_3$, 1H , gCOSY, gHSQC, gHMBC) und als Gemisch von **37a** und **37b** identifiziert (siehe Abbildungen 36 und 37, Allg. Teil).

AV 5.3.5.4 zu weiteren Untersuchungen der direkten Thiol-En-Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar

K-Ras4B in TRIS-Puffer (1 μ M, 20 mM TRIS bei pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$) wurde nach AAV 34 mit FTase und Fpp *in vitro* farnesyliert. Nach der Farnesylierung wurden K-Ras4B-Far sowie nicht-farnesyliertem K-Ras verschiedene Pufferkomponenten zugesetzt (siehe Tabelle E5), und beide Proteine nach AAV 9 auf thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Objektträgern (500 nm) mittels Drop-Casting mikrostrukturiert (10 min Bestrahlungszeit). Die Objektträger wurden nach AAV 11 zweimal 10 min mit TRIS-Puffer mit 0,05 % Tween-20 gewaschen, 30 min mit TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast geblockt und eine Stunde mit 1:5000 Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper in TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast inkubiert. Nachfolgend wurde die Oberfläche zweimal 10 min mit TRIS-Puffer gewaschen, mit Wasser gespült und unter einem Argonstrom

5.3.6 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.6

AV 5.3.6.1 zur Herstellung des Mikroarrays von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin mit indirekter Thiol-En-Photoimmobilisierung

Nach AAV 10 wurde mit Biotinverbindung **19** in TBS-Puffer mit 20 % Glycerin und 2 mM TCEP (50 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM) ein Mikroarray auf einem olefin-PAMAM-funktionalisierten Glasobjektträger hergestellt (Bestrahlungszeit 10 min), und es wurden GeneFrames (75 μ l) aufgebracht. Die Oberfläche wurde 5 min im Ultraschallbad in TETBS-Puffer gereinigt, nach AAV 11 zweimal 10 min mit TETBS-Puffer gewaschen und 30 min mit TETBS-Puffer mit 1 % BSA geblockt. Der Objektträger wurde mit TETBS-Puffer gespült,

Protein	Pufferzusatz	Signal	Hintergrund
K-Ras4BFar	-	2,4x10 ⁴	1,2x10 ⁴
	2 mM DTE	1,2x10 ⁴	0,5x10 ⁴
	2 mM TCEP	1,4x10 ⁴	0,4x10 ⁴
	5 Äq. MIC-Biotin	2,2x10 ⁴	0,4x10 ⁴
K-Ras4B	-	3,4x10 ⁴	2,0x10 ⁴
	2 mM DTE	1,9x10 ⁴	1,4x10 ⁴
	5 Äq. MIC-Biotin	0,53x10 ⁴	0,13x10 ⁴

Protein	Pufferzusatz	Signal	Hintergrund
K-Ras4BFar	-	0,90x10 ⁴	0,20x10 ⁴
	2 mM TCEP	1,5x10 ⁴	0,2x10 ⁴
	3 Äq. MIC-Biotin	0,91x10 ⁴	0,20x10 ⁴

Protein	Pufferzusatz	Signal	Hintergrund
K-Ras4BFar	-	1,4x10 ⁴	0,7x10 ⁴
	3 Äq. MIC-Biotin	0,49x10 ⁴	0,12x10 ⁴
	2 mM TCEP	0,75x10 ⁴	0,20x10 ⁴
	3 Äq. MIC-Biotin + 2 mM TCEP	0,64x10 ⁴	0,15x10 ⁴

Tabelle E5: Mikrostrukturierung von K-Ras4BFar und K-Ras4B mit verschiedenen Pufferzusätzen. Angegeben sind die Daten der drei durchgeführten Experimente. Vergleiche sind nur innerhalb eines Experiments möglich.

getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 (Genepix 4000B, Standardeinstellungen für Cy3). Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Die Ergebnisse sowie die zugehörigen Pufferzusammensetzungen sind in Tabelle E5 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

5 min mit TETBS-Puffer gewaschen und 10 min mit 100 nM Streptavidin in TETBS inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal 10 min mit TRIS-Puffer (1 µM, 20 mM TRIS bei pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE) gewaschen und eine Stunde mit 1 mM N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin in TRIS-Puffer inkubiert. Die Oberfläche wurde mit TRIS-Puffer gespült und zweimal 5 min mit TRIS-Puffer gewaschen. Es wurde 5 min mit TRIS-Puffer mit 1 % BSA sowie eine Stunde mit 1:1500/1:5000/1:10000 anti-Ras-Antikörper in TRIS-Puffer mit 1 % BSA inkubiert. Es folgte Spülen und Waschen für 5 min mit TRIS-Puffer mit 0,05 % Tween-20, sowie für 5 min mit TRIS-Puffer. Der Objektträger wurde in Wasser getaucht, unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Fluoreszenzmikroarrayscanner nach AAV 12 analysiert (Typhoon Trio+, Standardeinstellungen für Cy3). Ergebnisse sind in Tabelle E6 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)					
		Keine Auswertung			
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)					
		Keine Auswertung			
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)					
		0.1mM	1mM	10mM	50mM
19		1.50E+06	4.47E+06	7.49E+06	8.67E+06
19		2.07E+06	4.78E+06	8.48E+06	9.54E+06
19		2.16E+06	5.03E+06	9.04E+06	9.32E+06

Tabelle E6: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von N-Ras¹⁻¹⁸¹-Biotin.

AV 5.3.6.2 zur Herstellung ligierter N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRT-Proteine (X = 0, 2, 4, 6)

50 µl N-Ras¹⁻¹⁸¹ (90 g/l, 4,4 mM, 220 nmol, bestimmt nach UV-Absorption, Nanodrop) in TRIS-Puffer (20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 3 mM DTE wurden auf eine Größenausschlusssäule (NAP5) gegeben, 450 µl TRIS-Puffer hinzugefügt und das Eluat verworfen. Vier Fraktionen wurden durch Zugabe von 4x250 µl TRIS-Puffer mit 10 µM GDP gesammelt und die Proteinkonzentration mittels UV-Absorption bestimmt (Nanodrop). Erhalten wurden 500 µl N-Ras¹⁻¹⁸¹ in einer Konzentration von 3,0 g/l (210 µM, 105 nmol). Zu je 100 µl Proteinlösung (21 nmol) wurden 2,1 µl 10 mM MIC-funktionalisiertes KRT-Peptid **39a-39d** (21 nmol, **39d** in Wasser/DMSO 1:1, **39a-39c** in Wasser) gegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und der Reaktionsfortschritt mit MALDI-MS kontrolliert (SA-Matrix). Die Zugabe der Peptide wurde dreimal wiederholt, bis nur noch wenig N-Ras¹⁻¹⁸¹ detektiert wurde. Es wurde angenommen, dass die vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption fehlerhaft war und daher mehr Peptid notwendig war als berechnet.

MALDI-MS (nicht kalibriert):

N-Ras¹⁻¹⁸¹-0KRT(StBu):

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20437 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-0KRT(StBu): m/z: berechnet 21589, gefunden 21585 [M+H]⁺

5. Experimenteller Teil

(Molgewicht Peptid **39d**: 1190 g/mol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-2KRT(StBu):

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20414 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-2KRT(StBu): m/z: berechnet 21845, gefunden 21889 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39c**: 1446 g/mol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-4KRT(StBu):

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20396 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-4KRT(StBu): m/z: berechnet 22102, gefunden 22106 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39b**: 1703 g/mol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT(StBu):

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20392 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT: m/z: berechnet 22359, gefunden 22357 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39a**: 1960 g/mol);

1 µl 0.5 M DTT (Endkonzentration ~5 mM) wurde zu den vier Proteinlösungen gegeben und 18 h bei 4 °C inkubiert. Analyse mittels MALDI-MS ergab Entfernung der Disulfidschutzgruppe:

MALDI-MS (nicht kalibriert):

N-Ras¹⁻¹⁸¹-0KRT:

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20395 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-0KRT: m/z: berechnet 21501, gefunden 21499 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39d** ohne Disulfidschutzgruppe: 1102 g/mol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-2KRT:

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20398 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-2KRT: m/z: berechnet 21757, gefunden 21765 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39c** ohne Disulfidschutzgruppe: 1358 g/mol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-4KRT:

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20365 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-4KRT: m/z: berechnet 22014, gefunden 22019 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39b** ohne Disulfidschutzgruppe: 1615 g/mol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT:

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20397 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT: m/z: berechnet 22271, gefunden 22270 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39a** ohne Disulfidschutzgruppe: 1872 g/mol);

Erhalten wurden (Bradfordbestimmung nach AAV 15, 0,5 µl Proteinlösung):

N-Ras¹⁻¹⁸¹-0KRT: ~110 µl, 7,2 g/l, 335 µM (37 nmol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-2KRT: ~110 µl, 8,8 g/l, 404 µM (44 nmol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-4KRT: ~110 µl, 10,1 g/l, 459 µM (50 nmol);

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT: ~110 µl, 14,3 g/l, 642 µM (71 nmol);

Die Proteinlösungen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

AV 5.3.6.3 zur Herstellung von GppNhp-beladenem N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar

Zu 50 µl GppNhp-beladenem N-Ras¹⁻¹⁸¹ (7,3 g/l, 360 µM, 18 nmol, bestimmt nach Bradfordverfahren, AAV 15) in TRIS-Puffer (20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) wurden 0,90 µl 20 mM Peptid **39a** (18 nmol) in Wasser gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels MALDI-MS kontrolliert (SA-Matrix). Es wurde Produkt sowie wenig N-Ras¹⁻¹⁸¹ detektiert:

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20393 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT(StBu): berechnet 22359, gefunden 22353 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39a**: 1960 g/mol).

Es wurden 0,75 µl 0,33 M DTT (5 mM Endkonzentration) in Wasser zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene weiße Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 13500 rpm bei 4 °C für 15 min entfernt, erneut 0,75 µl 0,33 M DTT (Endkonzentration 10 mM) in Wasser zugegeben und 18 h bei 4 °C inkubiert. Kontrolle mittels MALDI-MS zeigte Entfernung der Schutzgruppe:

N-Ras¹⁻¹⁸¹: m/z: berechnet 20399, gefunden 20392 [M+H]⁺;

N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT: m/z: berechnet 22271, gefunden 22253 [M+H]⁺

(Molgewicht Peptid **39a** ohne Disulfidschutzgruppe: 1827 g/mol).

Erhalten wurden 49 µl Protein bei einer Konzentration von 7,1 g/l (350 µM, 17 nmol, bestimmt nach Bradfordverfahren, AAV 15). Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

AV 5.3.6.4 zur Herstellung des N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Mikroarrays (X = 0, 2, 4, 6)

Die vier N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRT-Proteine (X = 0, 2, 4, 6) in TRIS-Puffer (20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 µM GDP) mit 5 mM DTT wurden nach AAV 34 mit FTase und Fpp *in vitro* in einer Konzentration von 150 µM farnesyliert, um die vier N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Proteine zu erhalten. Es wurden 20 % Glycerin zugegeben (Endkonzentration 120 µM) und durch Verdünnung mit TRIS-Puffer mit 20 % Glycerin und 5 mM DTT Probelösungen der Konzentration 100 µM, 10 µM und 1 µM hergestellt (enthalten < 20 µM ZnCl₂ und FTase, siehe AAV 34). Nach AAV 10 wurde auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten oder einem carbonsäure-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger (500 nm) ein Mikroarray

5. Experimenteller Teil

Thiol-PAMAM-PECVD-SiO _x /Si (500 nm)					
Oberes Subarray (SAE-Korrektur)					
	N-Ras-0KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-6KRTFar	
100uM	1.43E+07	6.09E+04	5.20E+04	1.45E+05	
	1.39E+07	6.32E+04	5.79E+04	1.32E+05	
	1.33E+07	5.71E+04	6.46E+04	1.35E+05	
	1.35E+07	6.32E+04	5.96E+04	1.85E+05	
	1.36E+07	6.20E+04	7.27E+04	1.39E+05	
	1.35E+07	7.33E+04	6.75E+04	1.47E+05	
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)					
	N-Ras-0KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-6KRTFar	
100uM	1.48E+07	7.95E+04	8.65E+04	1.58E+05	
	1.51E+07	7.41E+04	7.39E+04	1.40E+05	
	1.46E+07	6.99E+04	8.15E+04	2.18E+05	
	1.48E+07	8.74E+04	7.17E+04	1.24E+05	
	1.47E+07	7.97E+04	7.23E+04	1.51E+05	
	1.61E+07	8.22E+04	9.17E+04	1.76E+05	
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)					
	N-Ras-0KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-6KRTFar	
100uM	1.81E+07	8.15E+04	1.06E+05	1.52E+05	
	1.82E+07	7.17E+04	1.02E+05	1.86E+05	
	1.73E+07	7.48E+04	1.03E+05	2.33E+05	
	1.67E+07	7.42E+04	1.05E+05	1.65E+05	
	1.60E+07	7.35E+04	9.76E+04	1.38E+05	
	1.65E+07	5.42E+04	5.60E+04	1.16E+05	
Carbonsäure-PAMAM-PECVD-SiO _x /Si (500 nm)					
Oberes Subarray (SAE-Korrektur)					
	N-Ras-0KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-6KRTFar	
100uM	1.13E+07	4.41E+04	1.86E+04	6.90E+04	
	1.06E+07	5.92E+04	3.68E+04	8.59E+04	
	1.04E+07	7.31E+04	4.65E+04	1.23E+05	
	1.01E+07		5.18E+04	1.54E+05	
	1.08E+07	7.64E+04	5.19E+04		
	1.11E+07	8.57E+04	6.38E+04	2.09E+05	
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)					
	N-Ras-0KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-6KRTFar	
100uM	1.09E+07	8.12E+04	5.19E+04	1.50E+05	
	1.08E+07	7.74E+04	1.14E+05	1.71E+05	
	1.18E+07	7.90E+04	4.54E+04	1.82E+05	
	1.11E+07	8.06E+04	5.32E+04	1.45E+05	
	1.19E+07	7.29E+04	4.97E+04	1.49E+05	
	1.28E+07	7.17E+04	6.03E+04	1.58E+05	
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)					
	N-Ras-0KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-6KRTFar	
100uM	1.14E+07	1.03E+05	7.74E+04	2.23E+05	
	9.79E+06	8.70E+04	6.06E+04	1.92E+05	
	1.03E+07	1.11E+05	6.46E+04	1.52E+05	
	1.07E+07	1.16E+05	6.17E+04	1.84E+05	
	1.09E+07	1.37E+05	8.32E+04	2.06E+05	
	1.11E+07	1.29E+05	5.56E+04	2.58E+05	

Tabelle E7a: Quantitative Auswertung der N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Mikroarrays (X: 0, 2, 4, 6): Vergleich zwischen thiol- und säurefunktionalisierten Oberflächen.

Oberes Subarray (SAE Korrektur)								
	N-Ras-6KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-0KRTFar				
100uM	5.40E+04	3.52E+04	4.20E+04	1.76E+04	1.02E+03	5.57E+03	10uM	
1uM				4.20E+04	1.29E+04	1.34E+04	100uM	
10uM	1.76E+04	1.63E+04	1.42E+04	5.89E+03	3.67E+03	2.01E+03	1uM	
100uM	4.87E+04	3.28E+04	6.58E+04	3.40E+04	2.70E+04	2.22E+04	10uM	
1uM		1.36E+02			2.99E+04	2.64E+04	100uM	
10uM	2.22E+04	3.88E+04	2.74E+04				1uM	
Mittleres Subarray (SAE Korrektur)								
	N-Ras-6KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-0KRTFar				
100uM	1.49E+05	1.20E+05	1.20E+05	1.92E+04	1.41E+04	3.39E+04	10uM	
1uM	1.57E+04	2.80E+04	1.29E+04	1.17E+05	1.06E+05	1.09E+05	100uM	
10uM	3.52E+04	3.15E+04	3.24E+04	1.34E+04	9.42E+03	1.08E+04	1uM	
100uM	1.33E+05	1.30E+05	1.42E+05	4.29E+04	2.88E+04	3.00E+04	10uM	
1uM		4.99E+03	6.89E+03	1.00E+05	9.73E+04	7.46E+04	100uM	
10uM	4.73E+04	3.80E+04	4.08E+04	8.61E+03	7.35E+03	8.55E+03	1uM	
Unteres Subarray (SAE Korrektur)								
	N-Ras-6KRTFar	N-Ras-4KRTFar	N-Ras-2KRTFar	N-Ras-0KRTFar				
100uM		1.87E+05	1.80E+05	3.37E+04	2.77E+04		10uM	
1uM	1.32E+04	1.51E+04	1.23E+04	1.26E+05	1.19E+05	1.36E+05	100uM	
10uM		1.88E+04	2.87E+04	8.31E+03	9.54E+03	1.39E+04	1uM	
100uM		4.91E+04	5.48E+04	2.47E+04	2.37E+04	3.41E+04	10uM	
1uM	1.69E+03	6.48E+03	2.75E+03	8.09E+04	6.73E+04	5.41E+04	100uM	
10uM	1.32E+04	1.29E+04	1.61E+04	7.05E+03	2.04E+03	5.63E+03	1uM	

Tabelle E7b: Quantitative Auswertung der N-Ras¹⁻¹⁸¹-XKRTFar-Mikroarrays (X: 0, 2, 4, 6): Konzentrationsabhängige Immobilisierung (nur unteres Subarray für Auswertung verwendet).

hergestellt (10 min Bestrahlungszeit). Die Oberfläche wurde dreimal 10 min mit TRIS-Puffer mit 0,05 % Tween-20 gewaschen (Petrischale), mit TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast 30 min geblockt und eine Stunde mit 1:5000 Cy3-markiertem anti-Ras-Antikörper in TRIS-Puffer mit 0,5 % Slimfast inkubiert. Der Objektträger wurde zweimal 10 min mit TRIS-Puffer mit 0,05 % Tween-20, sowie 10 min mit Ras-TRIS-Puffer gewaschen (Petrischale) und mit Wasser gespült. Nach Trocknen unter einem Argonstrom erfolgte Analyse mit einem Mikroarray-fluoreszenzscanner nach AAV 12. Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in den Tabellen E7a und E7b angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.6.5 zu N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar-Mikroarray und Interaktion mit RBD-YFP

GDP- und GppNHp-beladenes N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRT (AV 5.3.6.2 und AV 5.3.6.3) in TRIS-Puffer (20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 μM GDP bzw. 10 μM GppNHp) wurden nach AAV 34 mit FTase und Fpp *in vitro* farnesyliert. 20 % Glycerin sowie 5 mM DTT wurden zugegeben und mit TRIS-Puffer mit 20 % Glycerin und 5 mM DTT Lösungen in den Konzentrationen 75 μM, 25 μM, 8,3 μM und 2,8 μM hergestellt (enthalten < 20 μM ZnCl₂ und FTase, siehe AAV 34). Nach AAV 10 wurde auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten Objektträger (500 nm) ein Mikroarray mit acht Punkten pro Konzentration und Protein

5. Experimenteller Teil

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)					
2.8uM (GDP)	-	-	-	-	-
8.3uM (GDP)	-	-	-	-	-
25uM (GDP)	-	6.37E+03	-	-	-
75uM (GDP)	-	4.39E+04	3.80E+04	3.82E+04	1.34E+04
2.8uM (GppNHp)	-	-	-	-	-
8.3uM (GppNHp)	-	-	-	-	-
25uM (GppNHp)	1.29E+05	1.39E+05	8.42E+04	1.09E+05	
75uM (GppNHp)	1.20E+05	1.56E+05	4.03E+04	9.87E+04	
	2.38E+05	2.30E+05	2.90E+05	2.65E+05	
	2.27E+05	2.32E+05	2.00E+05	1.98E+05	
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)					
2.8uM (GppNHp)	-	-	-	-	-
8.3uM (GppNHp)	-	-	-	-	-
25uM (GppNHp)	8.02E+04	9.40E+04	1.11E+05	9.52E+04	
75uM (GppNHp)	1.85E+05	8.55E+04	1.30E+05	6.92E+04	
	2.98E+05	2.36E+05	2.59E+05	2.06E+05	
	2.17E+05	2.73E+05	2.23E+05	1.10E+05	
2.8uM (GDP)	-	-	-	-	-
8.3uM (GDP)	-	-	-	-	-
25uM (GDP)	6.95E+04	9.77E+04		2.21E+04	
75uM (GDP)	4.91E+04	2.92E+04		4.25E+04	
	4.75E+04	1.26E+05	5.39E+04	5.34E+04	
	3.30E+04	2.50E+04	8.66E+04	6.51E+04	

Tabelle E8: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von GDP- und GppNHp-beladenem N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRtFar und Interaktion mit RBD-YFP.

hergestellt (10 min Bestrahlungszeit, Genetix QArray Max). Der Objektträger wurde nach AAV 11 2 min in TRIS-Puffer mit 0,5 % Tween-20 gewaschen (Petrischale), weitere dreimal 10 min in TRIS-Puffer mit 0,5 % Tween-20 gewaschen und 30 min mit TRIS-Puffer mit 1 % BSA geblockt. Es wurde eine Stunde mit 1 mM RBD-YFP in TRIS-Puffer mit 1 % BSA inkubiert, 10 s in TRIS-Puffer gewaschen, kurz in Wasser getaucht und die Oberfläche unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Typhoon Trio+, Anregung 488 nm, Emissionsfilter 520 BP20). Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E8 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.6.6 Klonierung von pOPINF H₆-mCherry-6KRT und Expression

Mittels PCR nach AAV 18 wurde aus einem für H₆-mCherry kodierenden pGAT-Vektor ein Insert für H₆-mCherry mit C-terminaler 6KRT-Sequenz (KKKKSKTKCVIM) generiert (Vorwärtsprimer (35-mer) 5' AAA AAA GCG GTA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AG 3' mit N-terminaler KpnI-Schnittstelle, Rückwärtsprimer (80-mer) 5' AAA AAA AAA GCT TCT ACA TAA TTA CAC ACT TTG TCT TTG ACT TCT TTT TCT TCT TTT TGT AGA GCT CGT CCA TGC CCC G 3' mit 6KRT-Sequenz und C-terminaler HindIII-Schnittstelle, T_M = 58 °C. t_E = 45 s). Das Insert sowie der Zielvektor pOPINF wurden nach AAV 19 mit KpnI verdaut, durch Präzipitierung nach AAV 20 gereinigt und mit HindIII verdaut. Es folgte Aufreinigung mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion nach AAV 26. Verdautes Insert und Plasmid wurden nach AAV 21 ligiert, nach AAV 16 transformiert (*E.coli* XL1 blue) und auf LB-Medium (Amp, IPTG, X-Gal) plattiert. Erhalten wurde eine Kultur, aus der nach AAV 17 Plasmid isoliert und nach AAV 24 sequenziert wurde (Primer: pOPINF-Standardsequenzierungsprimer). Erhalten wurde der gewünschte Plasmid pOPINF H₆-mCherry-6KRT.

Es folgte Expression nach AAV 30 (*E.coli* BL21 (DE3), LB + Amp). Trotz mehrfacher Wiederholung wurde kein Protein detektiert.

AV 5.3.6.7 Expression von pGAT H₆-mCherry-4KRT

pGAT H₆-mCherry-4KRT mit einer C-terminalen 4KRT-Sequenz (KKKKSKTKCVIM) wurde von Dr. Kirill Alexandrov (MPI Dortmund) erhalten. Der Plasmid wurde nach AAV 30 in *E.coli* BL21 (DE3) exprimiert (LB + Amp, 0,3 mM IPTG, 20 Stunden). Folgende Puffer kamen zum Einsatz:

Zelllyse:

50 mM HEPES bei pH 8,0, 500 mM LiCl, 2 mM BME, 1 mM PMSF, 10 mM GTP, 1 mM MgCl₂ (parallele Verwendung für H₆-Rab6A-6KRT);

Nickelaffinitätschromatographie:

Puffer A: 50 mM HEPES bei pH 8,0, 500 mM LiCl, 2 mM BME, 10 mM GDP, 1 mM MgCl₂ (parallele Verwendung für H₆-Rab6A-6KRT);

Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol;

Dialyse:

50 mM TRIS bei pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM BME;

Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75 26/60):

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE.

Erhalten wurden 42 mg H₆-mCherry-4KRT bei einer Konzentration von 7,0 g/l (243 µM, 6 ml),

5. Experimenteller Teil

bestimmt nach Bradford, AAV 15). Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für SDS-Page-Analyse siehe Abbildung E1. MALDI-MS (SA-Matrix, kalibriert mit Kalibrationsmix C3): m/z : berechnet 29584, gefunden 29595 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

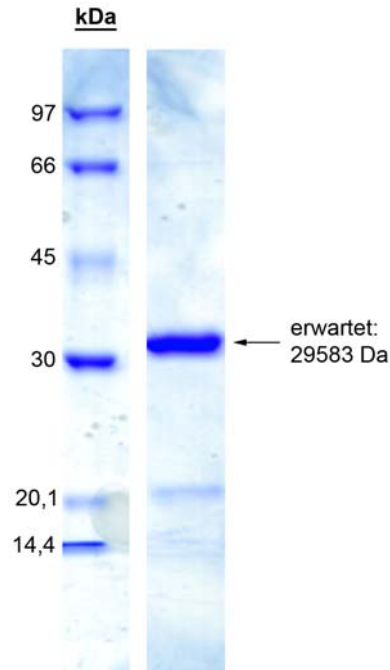


Abbildung E1: SDS-PAGE von H₆-mCherry-4KRT nach Expression und Aufreinigung.

AV 5.3.6.8 Expression von pOPINE H₆-mCherry

pOPINE H₆-mCherry wurde von Dr. Kirill Alexandrov (MPI Dortmund) erhalten. Der Plasmid wurde nach AAV 16 in *E.coli* BL21 (DE3) transformiert, und mit sechs Kolonien eine Testexpression durchgeführt (AAV 29, Kolonien 1-3: 1 mM IPTG, 37 °C, 4 h; Kolonien 4-6: 0,3 mM IPTG, 20 °C, 24 h). Kolonien 2, 4, 5 zeigten erfolgreiche Expression nach SDS-PAGE-Analyse (AAV 27). Mit Kolonie 4 wurde nach AAV 30 Überexpression induziert (LB + Amp, 0,3 mM IPTG, 20 °C, 24 h). Folgende Puffer wurden verwendet:

Zellyse: 20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM BME, 10 μM GDP (parallele Verwendung für K-Ras4B);

Nickelaffinitätschromatographie:

Puffer A: 20 mM TRIS bei pH 7,4, 200 mM NaCl, 2 mM BME;

Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol;

Dialyse:

50 mM TRIS bei pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 μM GDP (parallele Verwendung für K-Ras4B), 2 mM BME;

Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75 16/60):

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE.

Erhalten wurden 131 mg H₆-mCherry bei einer Konzentration von 8,7 g/l (300 μM, 15 ml, bestimmt nach Bradford, AAV 15). Für SDS-PAGE-Analyse siehe Abbildung E2. MALDI-MS (SA-Matrix, ohne Kalibrierung): m/z: berechnet 28194, gefunden 28236 [M+H]⁺.

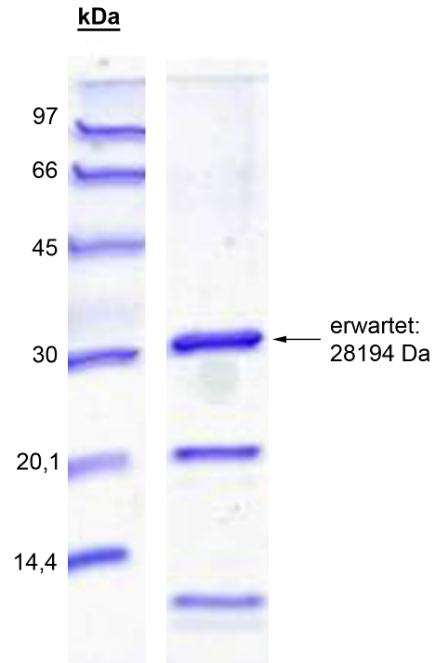


Abbildung E2: SDS-PAGE von H₆-mCherry nach Expression und Aufreinigung.

AV 5.3.6.9 Klonierung von H₆-Rab6A(m)-6KRT in pET27mod und Expression

Durch PCR nach AAV 18 wurde aus einem für H₆-Rab6A kodierenden, modifizierten Vektor pET19 (TEV-Schnittstelle nach H₆) ein Insert für H₆-Rab6A mit C-terminaler 6KRT-Sequenz (KKKKKKSKTKCVIM) erzeugt (Vorwärtsprimer (24-mer) 5' AAA AAA CCA TGG GCC ATC ATC ATC 3' mit N-terminaler NcoI-Schnittstelle, Rückwärtsprimer (80-mer) 5' AAA AAA CTC GAG CTA CAT AAT TAC ACA CTT TGT CTT TGA CTT CTT TTT CTT CTT TTT GCA GCT GCA GCC TCC TTC ACT G 3' mit 6KRT-Sequenz, C-terminaler XhoI-Schnittstelle und durch stille Mutation (GAA>CTG) eingefügte PstI-Schnittstelle zwischen Protein und 6KRT, T_M = 56 °C. t_E = 45 s). Das Insert sowie der Zielvektor pET27mod GST-Rab7 wurden nach AAV 19 mit NcoI verdaut, durch Präzipitierung nach AAV 20 gereinigt und mit XhoI verdaut. Es folgte Aufreinigung mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion nach AAV 26. Verdautes Insert und Plasmid wurden nach AAV 21 ligiert, nach AAV 16 transformiert (*E.coli* XL1 blue) und auf LB-Medium (Kan) plattiert. Erhalten wurden ~50 Kulturen. Aus sechs Kulturen wurde nach AAV 17 Plasmid isoliert und nach AAV 22 mit NotI eine Testrestriktion durchgeführt (pET27mod GST-Rab7: 1 x NotI, pET27mod H₆-RabA-6KRT: kein NotI). Von vier positiven Klonen wurde einer mittels DNA-Sequenzierung nach

5. Experimenteller Teil

AAV 24 analysiert (Primer: T7 Promoter, T7 Terminator). Erhalten wurde der gewünschte Plasmid pET27mod H₆-Rab6A-6KRT.

Der Plasmid wurde nach AAV 30 in *E.coli* BL21 (DE3) exprimiert (LB + Kan, 0,3 mM IPTG, 20 Stunden). Folgende Puffer kamen zum Einsatz:

Zellyse:

50 mM HEPES bei pH 8,0, 500 mM LiCl, 2 mM BME, 1 mM PMSF, 10 μ M GTP, 1 mM MgCl₂;

Nickelaffinitätschromatographie:

Puffer A: 50 mM HEPES bei pH 8,0, 500 mM LiCl, 2 mM BME, 10 mM GDP, 1 mM MgCl₂;

Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol;

Dialyse/TEV-Verdau:

1:20 TEV, 50 mM TRIS bei pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM BME;

Nickelaffinitätschromatographie zur Aufreinigung des TEV-Verdau:

50 mM TRIS bei pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM BME, 1 mM MgCl₂;

Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75 26/60):

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 μ M GTP, 3 mM DTE.

Erhalten wurden 12 mg Rab6A-6KRT bei einer Konzentration von 4,9 g/l (180 μ M, 2,5 ml, bestimmt nach Bradford, AAV 15). Für SDS-PAGE-Analyse siehe Abbildung E3. MALDI-MS (SA-Matrix, kalibriert mit Kalibrationsmix C3): m/z: berechnet 25447, gefunden 25439 [M+H]⁺.

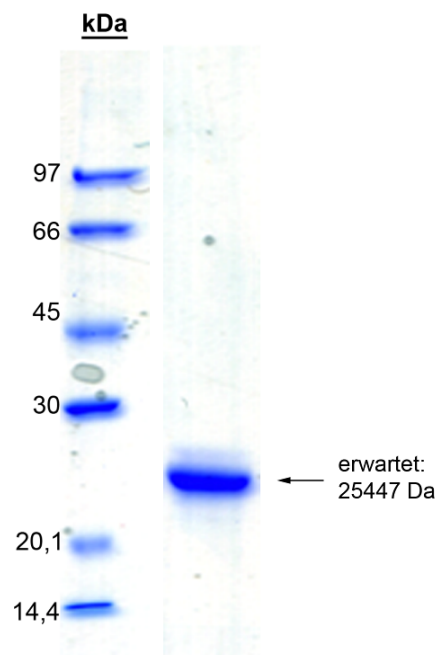


Abbildung E3: SDS-PAGE von Rab6A-6KRT nach Expression und Aufreinigung.

AV 5.3.6.10 H₆-mCherry-4KRTFar-Mikroarray (Kontrollen H₆-mCherry-4KRT, H₆-mCherry)

H₆-mCherry-4KRT in HEPES-Puffer (25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE) wurde nach AAV 34 mit FTase und Fpp in vitro farnesyliert. 20 % Glycerin wurden hinzugefügt, und die Lösung direkt verwendet. Folgende Lösungen bzw. Verdünnungen wurden hergestellt:

100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM H₆-mCherry-4KRTFar;

100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM H₆-mCherry-4KRT;

100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM H₆-mCherry

in 25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20; Lösungen von H₆-mCherry-4KRTFar enthalten zudem < 20 µM ZnCl₂ und FTase, siehe AAV 34).

Nach AAV 10 wurde auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger ein Mikroarray hergestellt (Bestrahlungszeit 10 min). Zwei Punkte pro Protein, Konzentration und

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)				
	100µM	10µM	1µM	0.1µM
H6-mCherry-4KRTFar	1.40E+06	5.41E+05	1.08E+05	5.51E+04
H6-mCherry-4KRT	2.35E+05	8.92E+04	3.20E+04	3.52E+04
H6-mCherry	0.00E+00	2.40E+03	6.16E+03	7.06E+03
H6-mCherry-4KRTFar	1.33E+06	4.69E+05	6.83E+04	-
H6-mCherry-4KRT	2.12E+05	9.50E+04	2.32E+04	1.81E+04
H6-mCherry	4.44E+04	8.02E+03	0.00E+00	2.21E+01
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)				
	100µM	10µM	1µM	0.1µM
H6-mCherry-4KRTFar	8.50E+05	3.60E+05	5.43E+04	2.96E+04
H6-mCherry-4KRT	1.99E+05	6.24E+04	2.59E+04	5.11E+03
H6-mCherry	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
H6-mCherry-4KRTFar	6.61E+05	3.16E+05	5.44E+04	3.07E+04
H6-mCherry-4KRT	1.65E+05	5.70E+04	-	1.51E+04
H6-mCherry	2.13E+04	7.58E+03	0.00E+00	0.00E+00
Unteres Subarray				
	100µM	10µM	1µM	0.1µM
H6-mCherry-4KRTFar				
H6-mCherry-4KRT				
H6-mCherry		nicht auswertbar		
H6-mCherry-4KRTFar				
H6-mCherry-4KRT				
H6-mCherry				

Tabelle E9: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von H₆-mCherry-4KRTFar, H₆-mCherry-4KRT und H₆-mCherry.

5. Experimenteller Teil

Subarray wurden gespottet. Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 5 min in HEPES-Puffer mit 0,05 % Tween-20 sowie zweimal 5 min in HEPES-Puffer gewaschen. Nachfolgend wurde die Oberfläche in Wasser getaucht, unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 analysiert (Typhoon Trio+, Anregung 532 nm, Emissionsfilter 610 BP30). Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E9 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.6.11 Rab6A(m)-6KRTFar-Mikroarray und Interaktion mit eGFP-Bicaudal_D2 (Kontrollen Rab6A(m)-6KRT, Rab6A)

Rab6A(m)-6KRT in HEPES-Puffer (25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 10 μ M GTP) wurde nach AAV 34 mit FTase und Fpp *in vitro* farnesyliert. 20 % Glycerin wurden

Oberes Subarray (0,089 μ M EGFP-Bicaudal_D2, SAE Korrektur)				
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Rab6A-6KRTFar	-	2.54E+03	1.10E+04	4.27E+05
Rab6A	-	1.06E+04	4.78E+03	6.07E+04
Rab6A-6KRT	-	-	1.23E+05	1.05E+06
Rab6A-6KRTFar	1.15E+03	9.99E+03	-	4.97E+05
Rab6A	7.96E+03	1.37E+04	9.70E+03	8.09E+04
Rab6A-6KRT	-	2.40E+03	9.90E+04	9.68E+05
Mittleres Subarray (0,43 μ M EGFP-Bicaudal_D2, SAE Korrektur)				
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Rab6A-6KRTFar	-	-	2.37E+05	1.66E+06
Rab6A	-	-	-	2.28E+05
Rab6A-6KRT	-	-	7.08E+05	4.67E+06
Rab6A-6KRTFar	-	-	2.16E+05	1.69E+06
Rab6A	-	-	-	9.12E+04
Rab6A-6KRT	-	-	9.36E+05	4.82E+06
Unteres Subarray (2,2 μ M EGFP-Bicaudal_D2, SAE Korrektur)				
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Rab6A-6KRTFar	-	-	6.96E+05	6.03E+06
Rab6A	-	-	1.67E+05	1.01E+06
Rab6A-6KRT	-	-	3.50E+06	1.65E+07
Rab6A-6KRTFar	-	-	2.02E+05	7.22E+06
Rab6A	-	-	0.00E+00	6.92E+05
Rab6A-6KRT	-	-	3.03E+06	1.71E+07

Tabelle E10: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von Rab6A-6KRTFar, Rab6A und Rab6A-6KRT.

hinzugefügt, und die Lösung direkt verwendet. Folgende Lösungen und Verdünnungen wurden hergestellt:

30 μM , 3 μM , 0,3 μM , 0,03 μM Rab6A-6KRTFar;
 30 μM , 3 μM , 0,3 μM , 0,03 μM Rab6A-6KRT;
 30 μM , 3 μM , 0,3 μM , 0,03 μM Rab6A
 in 25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20, 10 μM GTP; Lösungen von Rab6A-6KRTFar enthalten zudem < 20 μM ZnCl₂ und FTase (siehe AAV 34).

Nach AAV 10 wurde auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger ein Mikroarray hergestellt (Bestrahlungszeit 10 min). Zwei Punkte pro Protein, Konzentration und Subarray wurden gespottet, und drei Geneframes (75 μl) wurden aufgebracht. Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 5 min mit HEPES-Puffer mit 0,05 % Tween-20 und 5 min mit HEPES-Puffer gewaschen (gesamte Oberfläche). Es folgte Blocken der Oberfläche durch Inkubation mit HEPES-Puffer mit 1 % BSA für 30 min (nur Geneframes). Die drei Subarrays wurden eine Stunde mit eGFP-Bicaudal_D2 in HEPES-Puffer mit 1 % BSA in den Konzentrationen 2,2 μM , 0,89 μM und 0,43 μM inkubiert, die Oberfläche mit HEPES-Puffer gespült und zweimal 1 min mit HEPES-Puffer gewaschen. Die Geneframes wurden entfernt, der Objektträger in Wasser getaucht und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner nach AAV 12 (Typhoon Trio+). Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E10 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.6.12 H₆-mCherry-4KRTFar-Mikroarray mit Variation des pH-Werts und des Salzgehalts (Kontrolle H₆-mCherry-4KRT)

H₆-mCherry-4KRT in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, pH 7,2, 40 mM NaCl, 3 mM DTE) wurde nach AAV 34 mit FTase und Fpp *in vitro* farnesyliert. 20 % Glycerin wurden zugegeben, und folgende Lösungen hergestellt (Volumen 50 μl + jeweilige Zusätze; Proteinkonzentrationen sind nicht dementsprechend korrigiert):

50 μM , 5 μM H₆-mCherry-4KRTFar bei pH 7,2;
 50 μM H₆-mCherry-4KRT bei pH 7,2;
 50 μM , 5 μM H₆-mCherry-4KRTFar bei pH 4,5 (Zugabe 0,40 μl 1 M HCl);
 50 μM H₆-mCherry-4KRT bei pH 4,5 (Zugabe 0,40 μl 1 M HCl); die Proteinlösungen bei pH 4,5 wurden durch Zugabe von 1 M HCl **entfärbt** (nach Augenmaß geschätzt ~50 %);
 50 μM , 5 μM H₆-mCherry-4KRTFar bei pH 8,2 (Zugabe 0,96 μl 0,5 M NaOH);

5. Experimenteller Teil

50 μM H₆-mCherry-4KRT bei pH 8,2 (Zugabe 0,96 μl 0,5 M NaOH);

50 μM , 5 μM H₆-mCherry-4KRTFar bei pH 7,2 mit 500 mM LiCl

(Zugabe 2,30 μl 8,7 M LiCl);

50 μM H₆-mCherry-4KRT bei pH 7,2 mit 500 mM LiCl

(Zugabe 2,30 μl 8,7 M LiCl);

50 μM , 5 μM H₆-mCherry-4KRTFar bei pH 6,3 mit 500 mM LiCl

(Zugabe 2,30 μl 8,7 M LiCl, 2,80 μl 0,1 M HCl);

50 μM H₆-mCherry-4KRT bei pH 6,3 mit 500 mM LiCl

(Zugabe 2,30 μl 8,7 M LiCl, 2,80 μl 0,1 M HCl);

50 μM , 5 μM H₆-mCherry-4KRTFar bei pH 8,2 mit 500 mM LiCl

(Zugabe 2,30 μl 8,7 M LiCl, 0,96 μl 0,5 M NaOH);

50 μM H₆-mCherry-4KRT bei pH 8,2 mit 500 mM LiCl

(Zugabe 2,30 μl 8,7 M LiCl, 0,96 μl 0,5 M NaOH);

in 25 mM HEPES, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20;

Lösungen von H₆-mCherry-4KRTFar enthalten zudem < 20 μM ZnCl₂ und FTase (siehe

AAV 34).

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)						
	5 μM H6-mCherry-4KRTFar	50 μM H6-mCherry-4KRTFar	50 μM H6-mCherry-4KRT			
pH 7.2						
pH 4.5*						
pH 8.2						
pH 7.2+500mM LiCl		nicht auswertbar				
pH 6.3+500mM LiCl						
pH 8.2+500mM LiCl						
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)						
	5 μM H6-mCherry-4KRTFar	50 μM H6-mCherry-4KRTFar	50 μM H6-mCherry-4KRT			
pH 7.2						
pH 4.5*						
pH 8.2						
pH 7.2+500mM LiCl		nicht auswertbar				
pH 6.3+500mM LiCl						
pH 8.2+500mM LiCl						
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)						
	5 μM H6-mCherry-4KRTFar	50 μM H6-mCherry-4KRTFar	50 μM H6-mCherry-4KRT			
pH 7.2	8.90E+04	1.10E+05	1.69E+06	1.67E+06	1.77E+06	1.80E+06
pH 4.5*	1.67E+05	1.75E+05	9.08E+05	9.39E+05	8.58E+05	9.14E+05
pH 8.2	9.90E+04	9.97E+04	9.48E+05	9.74E+05	9.17E+05	9.62E+05
pH 7.2+500mM LiCl	7.76E+04	7.07E+04	2.73E+05	2.92E+05	1.86E+05	2.04E+05
pH 6.3+500mM LiCl	4.52E+04	5.04E+04	2.70E+05	2.60E+05	2.08E+05	2.31E+05
pH 8.2+500mM LiCl	7.04E+04	4.83E+04	2.68E+05	2.92E+05	1.22E+05	1.28E+05
*Entfärbung durch Zugabe von 1 M HCl (geschätzt ~50 %)						

Tabelle E11: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von H₆-mCherry-4KRTFar und H₆-mCherry-4KRT mit Variation von pH-Wert und Salzgehalt.

Benötigte Mengen an HCl oder NaOH zur pH-Wert-Einstellung wurden durch Titration von 100 ml 25 mM HEPES bei pH 7,2, 40 mM NaCl mit 1 M HCl oder 0,5 M NaOH (pH-Elektrode)

bestimmt und rechnerisch auf 50 µl Volumen übertragen. Nach AAV 10 wurde auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si-Objektträger ein Mikroarray hergestellt (20 min Bestrahlungszeit). Zwei Punkte pro Proteinprobe und Konzentration wurden gespottet. Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 5 min mit 25 mM HEPES bei pH 7,2, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20, 5 mM L-Lysin sowie zweimal 5 min mit HEPES-Puffer gewaschen. Die Oberfläche wurde in Wasser getaucht, unter einem Argonstrom getrocknet und mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner analysiert (AAV 12, Typhoon Trio+, Anregung 532 nm, Emissionsfilter 610 BP 30). Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E11 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

5.3.7 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.7

AV 5.3.7.1 Klonierung von pET27mod H₆-mCherry-4KRT

Mittels PCR nach AAV 18 wurde aus pGAT H₆-mCherry-4KRT ein H₆-mCherry-4KRT-Insert für den Vektor pET27mod erzeugt (Vorwärtsprimer (34-mer) 5' AAA ACC ATG GGG AGA TAT ATC CAT GAA CAC CAT T 3' mit N-terminaler NcoI-Schnittstelle, Rückwärtsprimer (80-mer) 5' AAA ACT CGA GTC ACA TAA TTA CAC ACT TTG 3' mit C-terminaler XhoI-Schnittstelle, T_M = 51 °C. t_E = 50 s). Das Insert sowie der Zielvektor pET27mod GST-Rab7 wurden nach AAV 19 30 min bzw. 60 min mit NcoI FastDigest und XhoI FastDigest verdaut. Das Insert wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, während der geschnittene Vektor Aufreinigung mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion nach AAV 26 unterzogen wurde. Verdautes Insert und Plasmid wurden nach AAV 21 ligiert, nach AAV 16 transformiert (*E.coli* XL1 blue) und auf LB-Medium (Kan) plattiert. Erhalten wurden +100 Kulturen. Aus sechs Kulturen wurde nach AAV 17 Plasmid isoliert und nach AAV 24 DNA-Sequenzierung durchgeführt (Primer: T7 Promoter, T7 Terminator). Erhalten wurde der gewünschte Plasmid pET27mod H₆-mCherry-4KRT.

AV 5.3.7.2 Herstellung von H₆-mCherry-4KRT-Expressionslysat

Expressionslysat entstammte der Expression von H₆-mCherry-4KRT (siehe AV 5.3.6.7) 5 x 100 µl Aliquots des Expressionslysats wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Expressionslysat wurde AAV 30 folgend ultrazentrifugiert und dem Überstand ebenfalls 5 x 100 µl Aliquots entnommen, die nachfolgend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden. Für SDS-PAGE-Analyse siehe Abbildung E4. Die Konzentration von H₆-mCherry-4KRT wurde nach Auftauen von Aliquots und

5. Experimenteller Teil

Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 15 min durch Fluoreszenzspektroskopie nach AAV 35 bestimmt:

Expressionslysat von H₆-mCherry-4KRT:

~185 µM;

Expressionslysat von H₆-mCherry-4KRT nach Ultrazentrifugation:

~150 µM.

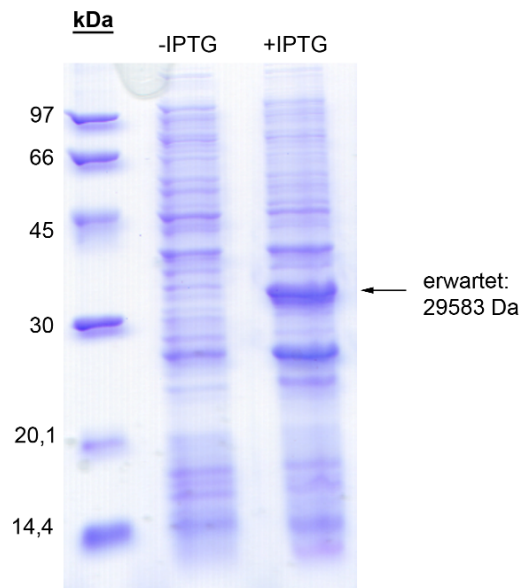


Abbildung E4: SDS-PAGE der Expression von H₆-mCherry-4KRT zur Herstellung von Expressionslysat.

AV 5.3.7.3 H₆-mCherry-4KRTFar-Lysatmikroarray

H₆-mCherry-4KRT in HEPES-Puffer (25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE), zentrifugiertes Expressionslysat sowie ultrazentrifugiertes Expressionslysat von H₆-mCherry-4KRT in 25 mM HEPES bei pH 8,0, 500 mM LiCl, 1 mM MgCl₂, 10 µM GTP, 2 mM BME, 1 mM PMSF (AV 5.3.7.2) wurden nach AAV 34 in vitro mit FTase und Fpp farnesyliert (Farnesylierung der Lysate konnte nicht mittels MALDI-MS bestimmt werden; Farnesylierung des aufgereinigten Proteins diente als Reaktionskontrolle). Folgende Lösungen und Verdünnungen wurden hergestellt:

100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM H₆-mCherry-4KRTFar in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 %

Tween-20 (enthalten zudem ≤ 20 µM ZnCl₂ und FTase, siehe AAV 34);

100 µM Expressionslysat in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 270 mM LiCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20 (enthält zudem < 20 μM ZnCl_2 , FTase, GTP sowie < 0,5 mM MgCl_2 , PMSF und < 2 mM BME);

10 μM Expressionslysat in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 27 mM LiCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20 (enthält zudem < 2 μM ZnCl_2 , FTase, GTP sowie < 50 μM MgCl_2 , PMSF und < 200 μM BME);

1 μM Expressionslysat in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 2,7 mM LiCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20 (enthält zudem < 0,2 μM ZnCl_2 , FTase, GTP sowie < 5 μM MgCl_2 , PMSF und < 20 μM BME);

100 μM ultrazentrifugiertes Expressionslysat in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 333 mM LiCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20 (enthält zudem < 20 μM ZnCl_2 , FTase, GTP sowie < 0,5 mM MgCl_2 , PMSF und < 2 mM BME);

10 μM ultrazentrifugiertes Expressionslysat in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 33 mM LiCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20 (enthält zudem < 2 μM ZnCl_2 , FTase, GTP sowie < 50 μM MgCl_2 , PMSF und < 200 μM BME);

1 μM ultrazentrifugiertes Expressionslysat in

25 mM HEPES bei pH 7,4, 40 mM NaCl, 3,3 mM LiCl, 3 mM DTE, 20 % Glycerin, 0,05 % Tween-20 (enthält zudem < 0,2 μM ZnCl_2 , FTase, GTP sowie < 5 μM MgCl_2 , PMSF und < 20 μM BME);

Nach AAV 10 wurde auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Objektträger (500 nm) ein Mikroarray generiert (Bestrahlungszeit 10 min). Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 5 min mit HEPES-Puffer mit 0,05 % Tween-20 sowie 5 min mit HEPES-Puffer gewaschen, in Wasser getaucht und unter einem Argonstrom getrocknet. Analyse erfolgte mit einem Mikroarrayfluoreszenzscanner (Typhoon Trio+, Anregung 532 nm, Emissionsfilter 610 BP 30). Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E12 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.7.4 Herstellung von Kolysat von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β

pGAT H₆-mCherry-4KRT und pGATEV H₆-GST-FTase- α/β wurden nach AAV 16 in *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL cotransformiert (je 50 ng Plasmid), und nach AAV 29 mit sechs

5. Experimenteller Teil

Oberes Subarray				
	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0,1 μ M
H6-mCherry-4KRTFar	1.29E+07	1.31E+06	3.28E+05	1.94E+05
H6-mCherry-4KRTFar Expressionslysate	5.75E+06	1.08E+06	2.57E+05	1.51E+05
H6-mCherry-4KRTFar ultrazentrifugiertes Expressionslysate	5.76E+06	8.23E+05	2.54E+05	1.44E+05
H6-mCherry-4KRTFar	1.21E+07	9.52E+05	3.12E+05	1.71E+05
H6-mCherry-4KRTFar Expressionslysate	5.30E+06	9.46E+05	2.70E+05	1.50E+05
H6-mCherry-4KRTFar ultrazentrifugiertes Expressionslysate	4.95E+06	7.21E+05	2.48E+05	1.46E+05
Mittleres Subarray				
	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0,1 μ M
H6-mCherry-4KRTFar	4.75E+06	7.94E+05	2.22E+05	1.39E+05
H6-mCherry-4KRTFar Expressionslysate	1.39E+06	5.20E+05	2.02E+05	1.25E+05
H6-mCherry-4KRTFar ultrazentrifugiertes Expressionslysate	1.03E+06	4.46E+05	1.93E+05	1.19E+05
H6-mCherry-4KRTFar	3.61E+06	7.29E+05	2.15E+05	1.41E+05
H6-mCherry-4KRTFar Expressionslysate	1.17E+06	4.97E+05	1.99E+05	1.24E+05
H6-mCherry-4KRTFar ultrazentrifugiertes Expressionslysate	1.86E+06	5.38E+05	1.93E+05	1.18E+05
Unteres Subarray				
	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0,1 μ M
H6-mCherry-4KRTFar				
H6-mCherry-4KRTFar Expressionslysate				
H6-mCherry-4KRTFar ultrazentrifugiertes Expressionslysate		nicht auswertbar		
H6-mCherry-4KRTFar				
H6-mCherry-4KRTFar Expressionslysate				
H6-mCherry-4KRTFar ultrazentrifugiertes Expressionslysate				

Tabelle E12: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von H₆-mCherry-4KRTFar und Expressionslysaten von H₆-mCherry-4KRTFar.

Kolonien eine Testexpression durchgeführt (LB + Amp + Kan + Cam, 0,3 IPTG, 24 h, 20 °C). Mit einer positiven Kolonie wurde nach AAV 30 Überexpression induziert (LB + Amp + Kan + Cam, 0,3 mM IPTG, 20 °C, 24 h). Die erhaltene Zellsuspension wurde in 25 mM HEPES, pH 7,2, 40 mM NaCl, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20, 20 μ M ZnCl₂ (Tween-20 zur Stabilisierung farnesylierter Proteine, ZnCl₂ notwendig für FTase-Aktivität) lysiert. SDS-PAGE zeigte Banden im Massenbereich von H₆-GST-FTase- α und H₆-mCherry-4KRT, während für FTase- β nur eine schwache Bande sichtbar war (Abbildung E5). 1 ml Aliquots wurden zur Entfernung unlöslicher Bestandteile bei 4 °C und 13500 rpm 15 min zentrifugiert (Benchtop), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration von im Kolysat enthaltenen H₆-mCherry-4KRT wurde nach Auftauen von Aliquots und Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 15 min durch Fluoreszenzspektroskopie nach AAV 35 bestimmt: 56 μ M.

AV 5.3.7.5 Mikroarray mit Kolysat von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β

H₆-mCherry-4KRT in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE wurde nach AAV 35

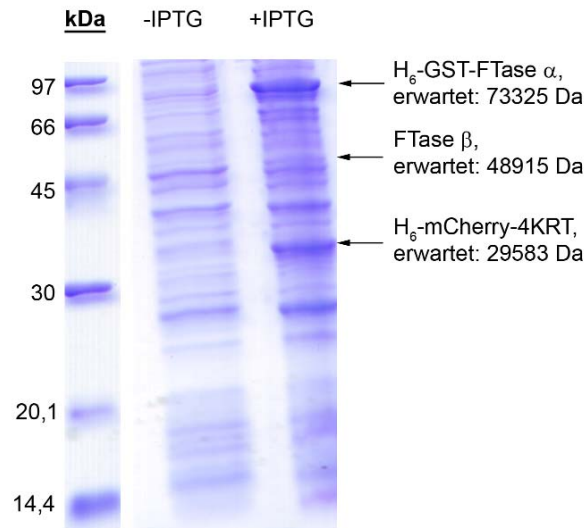


Abbildung E5: SDS-PAGE der Koexpression von H₆-mCherry-4KRT mit H₆-GST-FTase- α und FTase- β zur Herstellung von Koexpressionslysate.

mit FTase und Fpp *in vitro* farnesyliert. Aus Koexpressionslysate (AV 5.3.7.4) wurden folgende Lösungen hergestellt und je eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (für Mengenangaben siehe AAV 34):

- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE;
- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE + 0,5 Äq. Fpp;
- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE + 1,0 Äq. Fpp;
- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE + 2,0 Äq. Fpp;
- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE + 1:30 FTase + 0,5 Äq. Fpp;
- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE + 1:30 FTase + 1,0 Äq. Fpp;
- 40 μ l 56 μ M Kolysat + 3 mM DTE + 1:30 FTase + 2,0 Äq. Fpp.

Allen Lösungen von H₆-mCherry-4KRTFar, H₆-mCherry-4KRT und Kolysat wurden 20 % Glycerin und 0,05 % Tween-20 (außer H₆-mCherry-KRTFar) zugesetzt. Folgende Lösungen wurden zur Generierung eines Mikroarrays auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten PECVD-SiO_x/Si-Objektträger (500 nm) nach AAV 10 verwendet (10 min Bestrahlungszeit):

- 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M H₆-mCherry-4KRTFar
in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin
(enthalten zudem \leq 20 μ M ZnCl₂ und FTase, siehe AAV 34);
- 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M H₆-mCherry-4KRTFar
in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 3 mM DTE, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin;
- 45 μ M, 4,5 μ M, 0,45 μ M Kolysat

5. Experimenteller Teil

in 25 mM HEPES, pH 7,2, 40 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin (enthalten zudem <1 mM PMSF, <2 mM BME und <20 μ M ZnCl₂, siehe AV 5.3.7.4);

45 μ M Kolysat mit 0,5, 1,0, 2,0 Äq. Fpp;

45 μ M Kolysat mit 1:30 FTase und 0,5, 1,0, 2,0 Äq. Fpp

in 25 mM HEPES, pH 7,2, 40 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin (enthalten zudem ~0,8 mM PMSF, ~1,6 mM BME und ~16 μ M ZnCl₂, siehe AV 5.3.7.4).

Zwei Punkte wurden pro Proteinprobe, Konzentration und Subarray gespottet. Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 10 min in Waschpuffer (25 mM HEPES, pH 7,2, 40 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin, 5 mM Lysin) sowie zweimal 10 min in 25 mM HEPES, pH 7,2, 40 mM NaCl gewaschen. Nachfolgend wurde die Oberfläche in Wasser getaucht, unter einem Argonstrom getrocknet und mittels eines Mikroarrayfluoreszenzscanners analysiert (AAV 12, Typhoon Trio+, Anregung 532 nm, Emissionsfilter 610 BP 30). Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E13 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

AV 5.3.7.6 Klonierung von pET30a Rab6A-4KRT

Mittels PCR nach AAV 18 wurde aus einem für Rab6A kodierenden, modifizierten pET19-Vektor ein Rab6A-4KRT-Insert für den Vektor pET30a erzeugt (Vorwärtsprimer (27-mer) 5' AAA AAA CAT ATG TCC ACG GGC GGA GAC 3' mit N-terminaler NdeI-Schnittstelle, Rückwärtsprimer (66-mer) 5' AAA CTC GAG CTA CAT AAT TAC ACA CTT TGT CTT TGA CTT CTT TTT CTT GCA GGA ACA GCC TCC TTC 3' mit C-terminaler XhoI-Schnittstelle, $T_M = 54$ °C. $t_E = 60$ s). Das Insert sowie der leere Zielvektor pET30a wurden nach AAV 19 60 min mit NcoI FastDigest und XhoI FastDigest verdaut. Das Insert wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, während der geschnittene Vektor Aufreinigung mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion nach AAV 26 unterzogen wurde. Verdautes Insert und Plasmid wurden nach AAV 21 ligiert, nach AAV 16 transformiert (*E.coli* XL1 blue) und auf LB-Medium (Kan) plattiert. Erhalten wurden eine Kolonie, aus der nach AAV 17 Plasmid isoliert und nach AAV 24 sequenziert wurde (Primer: T7 Promoter, T7 Terminator). Erhalten wurde der gewünschte Plasmid pET30a Rab6A-4KRT.

AV 5.3.7.7 Optimierung der Koexpression von pET30a Rab6A-4KRT und pGATEV FTase α/β

pET30a Rab6A-4KRT und pGATEV H₆-GST-FTase α/β wurden nach AAV 16 in *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL cotransformiert (je 50 ng Plasmid), und nach AAV 29 Testexpressionen

Oberes Subarray (SAE-Korrektur)		1 uM	10 uM	100 uM	1 uM	10 uM	100 uM
H6-mCherry-4KRT		1.78E+04	3.67E+04	1.49E+05	2.28E+04	3.35E+04	1.81E+05
H6-mCherry-4KRTFar		1.97E+04	7.79E+04	2.84E+05	2.90E+04	6.44E+04	3.03E+05
Colysat		2.07E+04	2.46E+04	4.76E+04	2.68E+04	1.72E+04	4.25E+04
45 uM Colysat + Fpp		3.04E+04	2.88E+04	2.58E+04	2.92E+04	5.07E+04	3.39E+04
45 uM Colysat + 1:30 FTase + Fpp		3.22E+04	1.57E+04	2.48E+04	2.61E+04	6.21E+04	3.40E+04
		0,45 uM, 0,5 Äq. Fpp	4,5 uM, 1,0 Äq. Fpp	45 uM, 2,0 Eq. Fpp	0,45 uM, 0,5 Äq. Fpp	4,5 uM, 1,0 Äq. Fpp	45 uM, 2,0 Eq. Fpp
Mittleres Subarray (SAE-Korrektur)		1 uM	10 uM	100 uM	1 uM	10 uM	100 uM
H6-mCherry-4KRT		4.67E+04	7.04E+04	2.75E+05	2.38E+04	6.23E+04	3.08E+05
H6-mCherry-4KRTFar		4.41E+04	1.13E+05	4.04E+05	2.97E+04	9.11E+04	5.13E+05
Colysat		1.54E+04	1.70E+04	5.16E+04	1.61E+04	1.12E+04	7.69E+04
45 uM Colysat + Fpp		2.18E+04	2.46E+04	1.66E+04	2.74E+04	2.00E+04	5.13E+04
45 uM Colysat + 1:30 FTase + Fpp		1.67E+04	2.43E+04	1.59E+04	3.13E+04	1.40E+04	3.71E+04
		0,45 uM, 0,5 Äq. Fpp	4,5 uM, 1,0 Äq. Fpp	45 uM, 2,0 Eq. Fpp	0,45 uM, 0,5 Äq. Fpp	4,5 uM, 1,0 Äq. Fpp	45 uM, 2,0 Eq. Fpp
Unteres Subarray (SAE-Korrektur)		1 uM	10 uM	100 uM	1 uM	10 uM	100 uM
H6-mCherry-4KRT							
H6-mCherry-4KRTFar							
Colysat				nicht auswertbar			
45 uM Colysat + Fpp							
45 uM Colysat + 1:30 FTase + Fpp							
		0,45 uM, 0,5 Äq. Fpp	4,5 uM, 1,0 Äq. Fpp	45 uM, 2,0 Eq. Fpp	0,45 uM, 0,5 Äq. Fpp	4,5 uM, 1,0 Äq. Fpp	45 uM, 2,0 Eq. Fpp

Tabelle E13: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von H₆-mCherry-4KRTFar, H₆-mCherry-4KRT und Koexpressionslysaten von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase α und FTase β .

Temperatur	C_{IPTG}	Dauer
20 °C	0,3 mM	20 h
25 °C	0,3 mM	6 h
		20 h
	0,5 mM	6 h
		20 h
	1,0 mM	6 h
		20 h
30 °C	0,3 mM	6 h
		20 h
	0,5 mM	6 h
		20 h
	1,0 mM	6 h
		20 h
37 °C	0,3 mM	6 h
		20 h
	0,5 mM	6 h
		20 h
	1,0 mM	6 h
		20 h

Tabelle E14: Parameter zur Optimierung der Koexpression von Rab6A-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β .

mit den in Tabelle E14 aufgeführten Parametern durchgeführt (LB + Amp + Kan + Cam). Der Expressionsverlauf wurde mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abbildung 56, Allg. Teil).

AV 5.3.7.8 Optimierte Herstellung von Kolysat von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β

Mit pGAT H₆-mCherry-4KRT und pGATEV H₆-GST-FTase- α/β wurden nach AAV 16 in *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL kotransformiert (je 50 ng Plasmid), und nach AAV 29 mit sechs Kolonien eine Testexpression durchgeführt (LB + Amp + Kan + Cam, 0,3 IPTG, 24 h, 30 °C). Mit einer positiven Kolonie wurde nach AAV 30 Überexpression induziert (LB + Amp + Kan + Cam, 0,3 mM IPTG, 30 °C, 24 h). Die erhaltene Zellsuspension wurde in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20, 20 μ M ZnCl₂ lysiert. SDS-PAGE zeigte Banden im Massenbereich von H₆-GST-FTase- α , FTase- β und H₆-mCherry-4KRT (Abbildung E6). 1 ml Aliquots wurden zur Entfernung unlöslicher Bestandteile bei 4 °C und 13500 rpm 15 min zentrifugiert (Benchtop), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration von im Kolysat enthaltenen H₆-mCherry-4KRT wurde nach Auftauen von Aliquots und Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 15 min durch Fluoreszenzspektroskopie nach AAV 35 bestimmt: 78 μ M.

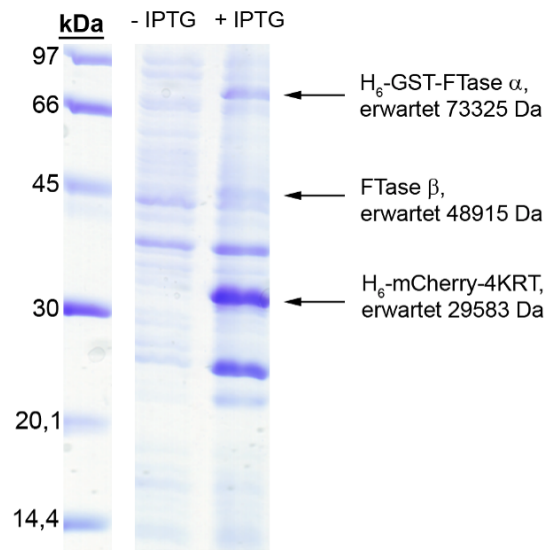


Abbildung E6: SDS-PAGE der optimierten Koexpression von H₆-mCherry-4KRT mit H₆-GST-FTase α und FTase β zur Herstellung von Koexpressionslysat.

AV 5.3.7.9 Herstellung von H₆-mCherry-4KRT-Expressionslysat

E.coli BL21 (DE3) Codon Plus RIL wurde nach AAV 16 mit pGAT H₆-mCherry-4KRT transformiert (50 ng Plasmid), und nach AAV 29 mit sechs Kolonien eine Testexpression durchgeführt (LB + Kan + Cam, 0,3 IPTG, 24 h, 20 °C). Mit einer positiven Kolonie wurde nach AAV 30 Überexpression induziert (LB + Kan + Cam, 0,3 mM IPTG, 20 °C, 24 h). Die erhaltene Zellsuspension wurde in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20 lysiert. 1 ml Aliquots wurden zur Entfernung unlöslicher Bestandteile bei 4 °C und 13500 rpm 15 min zentrifugiert (Benchtop), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration von im Kolysat enthaltenen H₆-mCherry-4KRT wurde nach Auftauen von Aliquots und Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 15 min durch Fluoreszenzspektroskopie nach AAV 35 bestimmt: 75 μ M.

AV 5.3.7.10 Mikroarray mit Kolysat von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β - optimierte Bedingungen

Mit H₆-mCherry-4KRT-Expressionslysat (AV 5.3.7.9) und Koexpressionslysat von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β (AV 5.3.7.8) wurde nach AAV 10 ein Mikroarray auf einem mit langem Thiolanker und PAMAM funktionalisierten PECVD-SiO_x/Si-Objektträger (500 nM) hergestellt (10 min Bestrahlungszeit). Folgende Lösungen wurden

5. Experimenteller Teil

verwendet:

78 μ M Kolysat;

78 μ M Kolysat + 5 mM DTT;

78 μ M Kolysat + 10 mM DTT;

78 μ M Kolysat + 1 mM TCEP;

78 μ M Kolysat + 5 mM TCEP;

78 μ M Kolysat + 0,1 mM MIC

in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 20 mM ZnCl₂, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin.

75 μ M Lysat;

75 μ M Lysat + 5 mM DTT;

75 μ M Lysat + 10 mM DTT;

75 μ M Lysat + 1 mM TCEP;

75 μ M Lysat + 5 mM TCEP;

75 μ M Lysat + 0,1 mM MIC

in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin.

Drei Punkte wurden pro Protein, Konzentration und Subarray gespottet. Der Objektträger wurde nach AAV 11 zweimal 10 min in Waschpuffer (25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin, 5 mM Lysin) sowie zweimal 10 min in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl gewaschen. Nachfolgend wurde die Oberfläche in Wasser getaucht, unter einem Argonstrom getrocknet und nach AAV 12 mittels eines Mikroarrayfluoreszenzscanners analysiert (Typhoon Trio+, Anregung 532 nm, Emissionsfilter 610 BP 30).

Das Experiment wurde mit folgenden Lösungen wiederholt:

78 μ M Kolysat + 10 mM DTT;

78 μ M Kolysat + 10 mM DTT + 1 Äq. Fpp;

78 μ M Kolysat + 10 mM DTT + 1:30 FTase + 1 Äq. Fpp;

in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 20 mM ZnCl₂, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin.

75 μ M Lysat + 10 mM DTT;

in 25 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM NaCl, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 0,05 % Tween-20, 20 % Glycerin.

Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle E15 angegeben (für Fluoreszenzaufnahmen siehe Anhang).

a)

Unteres Subarray (SAE-Korrektur)							
Colysat	2.62E+05	2.89E+05	2.61E+05	2.47E+05	2.21E+05	2.32E+05	Colysat + 5 mM DTT
Colysat + 10 mM DTT	3.76E+05	3.53E+05	4.18E+05	2.09E+05	2.17E+05	1.88E+05	Colysat + 1 mM TCEP
Colysat + 5 mM TCEP	2.55E+05	2.84E+05	2.42E+05	2.09E+05	2.09E+05	1.95E+05	Colysat + 0,1 mM MIC
H6-mCherry-4KRT-Lysat	1.50E+05	1.37E+05	1.17E+05	6.73E+04	5.89E+04	6.83E+04	Lysat + 5 mM DTT
Lysat + 10 mM DTT	6.78E+04	6.71E+04	5.61E+04	8.34E+04	8.51E+04	7.11E+04	Lysat + 1 mM TCEP
Lysat + 5 mM TCEP	1.09E+05	1.13E+05	9.71E+04	1.20E+05	9.53E+04	1.18E+05	Lysat + 0,1 mM MIC

b)

Unteres Subarray (SAE-Korrektur)							
78 μ M Colysat		5.27E+04	5.01E+04	5.12E+04	5.14E+04	3.61E+04	5.30E+04
78 μ M Colysat + 1 Äq. Fpp		6.48E+04	6.70E+04	5.86E+04	6.19E+04	6.05E+04	6.16E+04
78 μ M Colysat + 1 Äq. Fpp + 1:30 FTase		6.19E+04	6.13E+04	6.12E+04	5.86E+04	6.02E+04	6.09E+04
75 μ M H6-mCherry-4KRT-Lysat		6.13E+03	3.57E+03	5.45E+03	4.63E+03	6.80E+03	6.45E+03

Tabelle E15: Quantitative Auswertung des Mikroarrays von H₆-mCherry-4KRT-Lysat und Koexpressionslysats von H₆-mCherry-4KRT, H₆-GST-FTase- α und FTase- β . a) Erstes Experiment. b) Zweites Experiment.

5.3.8 Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 3.8

5.3.8.1 Nanostrukturierung unter Verwendung von Spin-Coating

In Analogie zu AAV 8 wurde ein thiol-PAMAM-funktionalisierter PECVD-SiO_x/Si-Objektträger (1000 nm) mittels Spin-Coating mit Biotin-Verbindung **17** beschichtet (10 mM DMF/Toluol 3:1, 10 min Bestrahlungszeit). Der Objektträger wurde auf dem Probenhalter eines konfokalen Lasermikroskops fixiert (Zeiss Axiovert 200) und mit einem UV-Laser bei 411 nm, der über ein fiberoptisches Kabel verbunden, über einen dichroitischen Strahlteiler geteilt (Chroma, 425dcxr) und mit einem 100x-Objektiv (Carl Zeiss) fokussiert wurde, bestrahlt (1 μ m/s, 25 mW, 500 kW/cm²). Schreiben von Nanostrukturen erfolgte mit Hilfe des Kontrollmoduls JPK Nanowizard und der Software JPK SPM. Der Objektträger wurde nach AAV 11 und AAV 13 prozessiert, und immobilisiertes Biotin unter Verwendung eines Lasers bei 632,5 nm mit dem gleichen konfokalen Lasermikroskop detektiert (605 nm Hochpassfilter, Photodetektor PerkinElmer SPCMAQR-14). Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Abbildung 59, Allg. Teil.

5.3.8.2 Nanostrukturierung unter Verwendung von Drop-Casting

Ein nach AAV 7 hergestelltes, thiol-PAMAM-funktionalisiertes Deckgläschen (Durchmesser 25 mm) wurde mit Silikonfett im Probenhalter eines konfokalen Lasermikroskops fixiert (Zeiss

5. Experimenteller Teil

LSM510meta). 100 μl einer 10 mM Lösung von **18** in Wasser/Ethylenglykol 3:1 wurden mit einer Mikroliterpipette auf die funktionalisierte Oberfläche pipettiert, und der erhaltene Tropfen mit einem zweiten, unfunktionalisierten Deckglässchen im Abstand von ~ 2 mm so bedeckt, dass zwei parallele Glas-Flüssigkeitsgrenzflächen erhalten wurden. Immersionöl wurde auf den Aufbau gegeben und mit einem 60x-Objektiv (Carl Zeiss) auf die Grenzfläche zwischen funktionalisierter Oberfläche und Lösung fokussiert. Nachfolgend wurde die Oberfläche mit einem UV-Laser (405 nm, 30 mW, 460 kW/cm^2) mit UV-Licht belichtet. Linien und rechteckige Strukturen wurden mit folgenden Parametern hergestellt:

Linien: 0,9 s/ μm , 2,7 s/ μm , 13,3 s/ μm Schreibgeschwindigkeit;

Strukturen: 20s, 60 s, 100 s Belichtungszeit.

Das unfunktionalisierte Deckglässchen wurde entfernt, die funktionalisierte Oberfläche mit Wasser gespült und 10 min mit 100 μl 100 nM Streptavidin-Cy5 in PBS-Puffer inkubiert. Nachfolgend wurde mit PBS-Puffer gespült, 100 μl PBS-Puffer auf die Oberfläche pipettiert und wie zuvor ein unfunktionalisiertes Deckglässchen verwendet, um zwei parallele Glas-Flüssigkeitsgrenzflächen zu erhalten. Nach Aufbringen von Immersionsöl wurde immobilisiertes Biotin unter Verwendung des gleichen Mikroskopaufbaus und eines Laser bei einer Wellenlänge von 632,5 nm detektiert. Folgende Intensitätswerte wurden erhalten:

Linien:

0,9 s/ μm : Signal: 100, Hintergrund: 75;

2,7 s/ μm : Signal: 120, Hintergrund: 75

13,3 s/ μm : Signal: 160, Hintergrund 75;

Strukturen:

20s: Signal: 65, Hintergrund: 33;

60 s: Signal: 95, Hintergrund: 33;

100 s: Signal: 120, Hintergrund: 33;

Für Fluoreszenzaufnahmen siehe Abbildung 60, Allg. Teil.

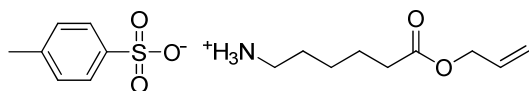
5.3.8.3 Nanostrukturierung unter Verwendung von Mikrofluidik

Verwendet wurde der in AV 5.3.2.2 beschriebene PDMS-Mikrofluidikchip. Nach Fixierung des mikrofluidischen Chips auf einem thiol-PAMAM-funktionalisierten SiO_x/Si -Objektträger (1000 nm) wurde eine 10 mM Lösung der olefinfunktionalisierten Biotinverbindung **17** in DMF/Toluol 3:1 in den Kanal gesogen, der Flüssigkeitsstrom gestoppt und der gesamte Aufbau auf dem Probenhalter eines konfokalen Lasermikroskops (Zeiss Axiovert 200) fixiert. Nach Fokussierung auf die Grenzfläche zwischen Lösung und funktionalisierter Oberfläche innerhalb des mikrofluidischen Kanals, wurden mit einem UV-Laser bei 411 nm, der über ein fiberoptisches Kabel verbunden, über einen dichroitischen Strahlteiler geteilt (Chroma,

425daxr) und mit einem 100x-Objektiv (Carl Zeiss) fokussiert wurde, Linienstrukturen auf die funktionalisierte Oberfläche geschrieben ($1 \mu\text{m/s}$, 25 mW , 500 kW/cm^2). Verwendet wurde das Kontrollmodul JPK Nanowizard und die Software JPK SPM. Der Kanal wurde mit DMF und TBS-Puffer gespült, mit 100 nM Streptavidin-Cy5 in TBS-Puffer befüllt und die Oberfläche 10 min inkubiert. Nachfolgend wurde mit TBS-Puffer gespült, und der Kanal durch Einsaugen von Luft geleert. Immobilisiertes Biotin wurde unter Verwendung des gleichen mikroskopischen Aufbaus und eines Lasers bei $632,5 \text{ nm}$ Wellenlänge nachgewiesen. Es wurden keine Strukturen detektiert.

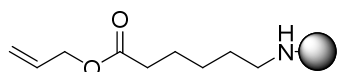
5.4 Arbeitsvorschriften zu chemischen Synthesen

6-Aminohexansäureallylester Toluolsulfonsäuresalz (**14**)



Die Vorschrift folgt ^[67]. Zu 3,0 g 6-Aminocapronsäure (22,9 mmol) in 120 ml Benzol wurden 4,6 g Toluolsulfonsäurehydrat (24,0 mmol) und 18,1 ml Allylalkohol (266 mmol) gegeben und 16 h am Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand mit Ethylacetat digeriert, filtriert und im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 7,1 g **14** (90 %, 60,2 mmol). Analytische Daten aus ^[67]: ¹H-NMR (400 Mhz, CDCl₃): δ = 7,74 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, ar-H), 7,20 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, ar-H), 5,96-5,86 (m, 1H, CH=CH₂), 5,32 (d, ³J = 17.2 Hz, 1H, CH=CH_a), 5,22 (d, ³J = 10.5 Hz, 1H, CH=CH_b), 4,53 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 2,80-2,74 (m, 2H, CH₂-NH), 2,37 (s, 3H, CH₃), 2,19 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, CH₂-C=O), 1,53-1,42 (m, 4H, CH₂-CH₂-C=O, N-CH₂-CH₂), 1,27-1,18 (m, 2H, (CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂). ¹³C-NMR (100 Mhz, CDCl₃): δ = 172,9 (C=O), 141,1, 140,9 (2 ar-C), 132,2 (CH=CH₂), 129,1, 125,8 (4 ar-C), 118,1 (CH=CH₂), 65,0 (CH₂-CH=CH₂), 39,7 (CH₂-N), 33,7, 27,0, 25,8, 24,1 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C=O). FAB-MS: m/z: berechnet: 344,15, gefunden 344,15 [M + H]⁺.

2-Chlortritylharz **15**



Die Vorschrift folgt ^[67]. Alle Schritte wurden mit getrockneten Glasgeräten und unter Argonatmosphäre durchgeführt. 1,63 g 2-Chlortritylharz (2,28 mmol, 1,4 mmol/g) wurden 10 min in 5 ml trockenem DCM gequollen. Das Lösungsmittel wurde abgelassen, 3,11 ml DIPEA (18,3 mmol), 3,1 g **14** (9,13 mmol) und 16 ml DCM wurden zugegeben, und die Suspension wurde 3 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Das Harz wurde nach folgender Prozedur mit je 20 ml Volumen und für je 3 min gewaschen:

3 x DCM/MeOH/DIPEA 17:2:1;

3 x DCM;

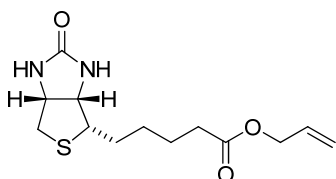
2 x DMF;

3 x DCM.

Das Harz wurde im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 2,36 g Harz **15**. Die Beladung wurde mit einer Testabspaltung überprüft. 92,2 mg Harz wurden in einem Spritzenreaktor mit Fritte dreimal 10 min mit je 5 % TFA in DCM geschüttelt. Die gesammelten Abspaltphasen wurden unter reduziertem Druck eingengt, und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 19,0 mg Feststoff, der mittels ¹H-NMR als TFA-Salz von 6-

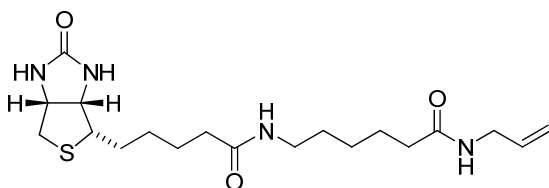
Aminocaprinsäureallylester (0,067 mmol) identifiziert wurde. Beladung: 0,73 mmol/g.

D(+)-Biotinallylester (16)



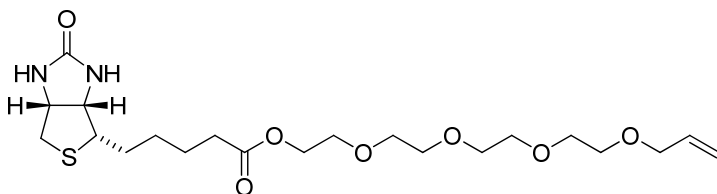
16 wurde von Dr. Maja Köhn erhalten. Für analytische Daten und die Synthesevorschrift siehe [67].

D(+)-Biotin-6-amidocaprinsäureallylester (17)



17 wurde von Dr. Maja Köhn erhalten. Für analytische Daten und die Synthesevorschrift siehe [67].

D(+)-Biotin-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-enylester (18)

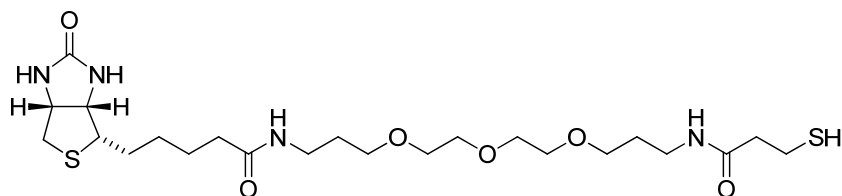


Tetraethylenglykolmonoallylether (96 mg, 0,41 mmol, Synthese siehe [99]), DMAP (12,4 mg, 0,10 mmol), EDC (102 mg, 0,66 mmol) und D-Biotin (100 mg, 0,41 mmol) wurden in 5 ml DCM gelöst und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 ml DCM wurde die Lösung mit 50 ml 1M HCl gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt (C18, 25 ml/min, 2 min 10% B, 3 min bis 18 min 10 % B bis 60 % B). Erhalten wurden 97 mg (0,21 mmol, 71 %) **X** als farbloses, viskoses Öl. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 5,99\text{-}5,81$ (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), $5,33\text{-}5,11$ (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), $4,58\text{-}4,46$ (m, 1H, $\text{CH}-\text{CH}_2\text{-S}$), $4,35\text{-}4,29$ (m, 1H, $\text{CH}-\text{CH-S}$), $4,27\text{-}4,15$ (m, 2H, CO-O-CH_2), $4,04\text{-}3,98$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), $3,73\text{-}3,55$ (m, 14H, 7 CH_2), $3,20\text{-}3,10$ (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-S}$), $2,90$ (dd, $^2\text{J} = 12,8$ Hz, $^3\text{J} = 5,0$ Hz, 1H, $\text{CH-CH}_a\text{-S}$), $2,76$ (d, $^2\text{J} = 12,8$ Hz, 1H, $\text{CH-CH}_b\text{-S}$), $2,36$ (t, $^3\text{J} = 7,5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-O}$), $1,80\text{-}1,58$ (m, 4H, S-CH-CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-O}$), $1,54\text{-}1,36$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 173,84$ (CO-O), $163,77$ (NH-CO-NH), $134,97$ ($\text{CH}=\text{CH}_2$), $117,30$ ($\text{CH}=\text{CH}_2$), $72,43$ ($\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), $70,84$, $70,82$, $70,78$, $70,73$, $69,65$, $69,36$ (O-CH_2),

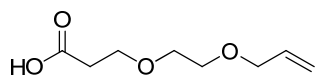
5. Experimenteller Teil

63,65 (CO-O-CH₂), 62,30 (S-CH-CH), 60,54 (S-CH₂-CH), 55,66 (S-CH-CH₂), 40,67 (S-CH₂-CH), 33,98 (CH₂-CO-O), 28,51, 28,42 (CH₂-CH₂-CH₂-CO-O, CH₂-CH₂-CH₂-CO-O), 24,93 (S-CH-CH₂). ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): berechnet 461,2316, gefunden 461,2312 [M+H]⁺.

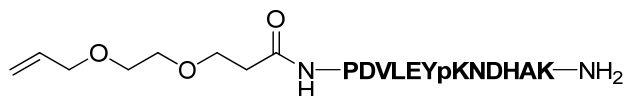
D-(+)-Biotin-N-17-mercapto-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadecylamid (19)



Zu 3-(Thiotrityl)propansäure (700 mg, 2,01 mmol) in 20 ml DMF wurden bei 0 °C HBTU (1,52 g, 4,02 mmol) und DIPEA (0,35 ml, 2,01 mmol) gegeben und fünf min bei 0 °C gerührt. Nach Zutropfen einer Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridekandiamin (2,94 ml, 13,5 mmol) in 20 ml DCM bei 0 °C wurde das Reaktionsgemisch unter Erwärmen auf Raumtemperatur 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (Chloroform/MeOH 95:5). Erhalten wurden 880 mg (1,60 mmol, 80%) des geschützten Thioankers. D-(+)-Biotin (200 mg, 0,82 mmol), HBTU (307 mg, 0,81 mmol) und DIPEA (285 µl, 1,64 mmol) wurden in 8 ml DMF gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Der geschützte Thiolankers (880 mg, 1,60 mmol) wurde zugegeben, und das Reaktionsgemisch 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in 40 ml eines Gemischs von DCM/TFA/TES im Verhältnis 92,5:5:2,5 aufgenommen und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck, wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt (C18, 25 ml/min, 2 min 10% B, 3 min bis 18 min 10% B bis 60 % B). Erhalten wurden 259 mg (0,48 mmol, 60 %) **X** als farbloses, viskoses Öl. ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 4,59-4,46 (m, 1H, CH-CH₂-S), 4,39-4,26 (m, 1H, CH-CH-S), 3,71-3,49 (m, 12H, 6 CH₂-O), 3,44-3,26 (m, 4H, 2 CH₂-NH), 3,22-3,06 (m, 1H, S-CH-CH), 2,91 (dd, ²J = 12,9 Hz, ³J = 4,7 Hz, 1H, S-CH_a-CH), 2,84-2,70 (m, 3H, S-CH_b-CH, CH₂-SH), 2,48 (t, ³J = 6,8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-SH), 2,21 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH), 1,84-1,73 (m, 4H, CO-NH-CH₂-CH₂), 1,72-1,57 (m, 4H, CH₂-CH₂-CO-NH, CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH), 1,50-1,35 (m, 2H, S-CH-CH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 173,53 (CO-CH₂-CH₂-SH), 171,11 (CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH), 164,11 (NH-CO-NH), 70,65, 70,21, 70,18, 70,82 (O-CH₂), 62,16 (S-CH-CH), 60,54 (S-CH₂-CH), 55,80 (S-CH-CH), 40,74, 40,58 (S-CH₂-CH, CO-CH₂-CH₂-SH), 38,07, 38,02 (CO-NH-CH₂), 36,09 (CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH), 29,19 (NH-CH₂-CH₂), 28,35, 28,27 (CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH, S-CH-CH₂), 25,88 (CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH), 20,83 (CO-CH₂-CH₂-SH). ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 535,2619, gefunden 535,2611 [M+H]⁺.

4,7-Dioxadec-9-ensäure (20)

Die Vorschrift folgt ^[100]: 1,5 g Allyloxyethanol (14,7 mmol) wurde in 74 ml *tert*-Butanol gelöst, und 29,4 g Ethylacrylat (294 mmol) sowie 4,69 g Cäsiumcarbonat (14,4 mmol) wurden zugegeben. Die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt, über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Erhalten wurden 2,74 g 4,7-Dioxadec-9-ensäureethylester (13,5 mmol, 92 %) als farbloses Öl, die direkt für den nächsten Reaktionsschritt verwendet wurden. Die Vorschrift folgt ^[101]: Zu 2,70 g 4,7-Dioxadec-9-ensäureethylester (13,3 mmol) gelöst in 120 ml THF/MeOH 1:1 wurde eine Lösung von 1,79 g Lithiumhydroxid (42,6 mmol) in 42,6 ml Wasser gegeben, und das Reaktionsgemisch 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde auf 0 °C gekühlt, der pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 2 eingestellt, und die Lösung dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Erhalten wurden 2,16 g **20** (12,4 mmol, 93 %) als leicht gelbliches Öl. ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 9,97 (s, COOH), 5,89 (ddt, ³J = 17,2 Hz, ³J = 10,4 Hz, ³J = 5,7 Hz, 1H, CH₂-CH=CH₂), 5,30-5,15 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂), 4,01 (dt, ³J = 5,7 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 3,76 (t, ³J = 6,4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO-O), 3,69-3,55 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 2,63 (t, ³J = 6,4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO-O). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 177,07 (C=O), 134,75 (CH₂=CH-CH₂), 117,43 (CH₂=CH-CH₂), 72,41 (CH₂=CH-CH₂), 70,62, 69,37 (O-CH₂-CH₂-O), 66,51 (CH₂-CH₂-COOH), 35,01 (CH₂-CH₂-COOH). ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 175,0965, gefunden 175,0964 [M + H]⁺.

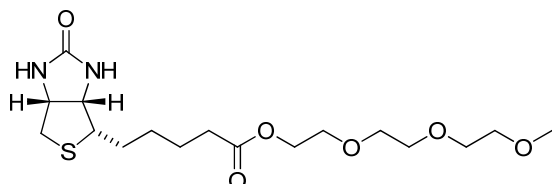
Peptid 21

Peptidsynthese des Peptids **21** im Maßstab 0,1 mmol erfolgte mit Hilfe des Syro Peptidsynthesizers nach AAV 3 ausgehend von Rink-Amid-MBHA-Harz (0,72 mmol/g). Als Kupplungsreagenz kam HCTU zur Anwendung, als Waschlösungsmittel DMF. Fmoc-Abspaltung erfolgte mit 40 % Piperidin in DMF. Phosphotyrosin wurde als Fmoc-P-Tyr(NMe₂)₂-OH eingeführt. Nach der automatisierten Synthese wurde das Harz in einen Spritzenreaktor mit Fritte transferiert, dreimal je 5 min mit je 3 ml DCM gewaschen (Schütteln auf einem Horizontalschüttler) und unter reduziertem Druck getrocknet. Das Harz wurde in 3 ml DMF 15 min gequollen, 15 min und 5 min mit je 3 ml 2 % DBU/DMF geschüttelt und dreimal 1 min mit je 3 ml DMF gewaschen. Eine Kupplungslösung aus 69,7 mg **20** (0,4 mmol), 165 mg HCTU (0,4 mmol) und 140 µl DIPEA (0,8 mmol) in 1,9 ml DMF wurde zugegeben,

5. Experimenteller Teil

und die Harzsuspension eine Stunde geschüttelt. Das Harz wurde dreimal 1 min mit je 3 ml DMF gewaschen, und die Kupplung wiederholt. Nachfolgend wurde dreimal 1 min mit je 3 ml DMF sowie dreimal 1 min mit je 3 ml DCM gewaschen, und das Peptid nach AAV 5 mit einer Abspaltlösung aus TFA/TIS/Wasser/EDT 96:1:2:1 vom Harz abgespalten (dreimal 3 ml, 1h, 10 min, 10 min). Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mit präparativer RP-HPLC-MS (C18-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 2 min 10 % B, 3-18 min 10 % bis 40 % B). Erhalten wurden 18,4 mg **21** (10,1 μmol , 10 %) als weißer, lockerer Feststoff. RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeOH mit 5 % THF und 0,1 % TFA; 1 min 5 % B, 2 min bis 16 min 5 % B bis 100 % B): $t_R = 8,8$ min. ESI-MS: m/z: berechnet 1826,84, gefunden 1828,50 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 913,9217, gefunden 913,9223 $[(\text{M}+2\text{H})/2]^{2+}$.

D-(+)-Biotin-3,6,9-trioxadecylester (**22**)



Zu einer Suspension von D-(+)-Biotin (100 mg, 0,41 mmol) in 4 ml trockenem DCM wurden unter Rühren EDC (102 mg, 0,53 mmol), DMAP (12,5 mg, 0,10 mmol) und Triethylglykolmonomethylether (337 mg, 2,05 mmol) gegeben und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erfolgte Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (C18, 25 ml/min, 2 min 10 % B, 3 min bis 18 min 10 % B bis 60 % B). Erhalten wurden 114 mg (0,29 mmol, 71 %) **22** als farbloser Feststoff. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 4,58\text{-}4,48$ (m, 1H, S-CH₂-CH), 4,36-4,28 (m, 1H, S-CH-CH), 4,27-4,15 (m, 2H, CO-O-CH₂), 3,74-3,48 (m, 10H, O-CH₂), 3,37 (s, 3H, CH₃), 3,20-3,10 (m, 1H, S-CH-CH), 2,90 (dd, $^2J = 12,9$ Hz, $^3J = 4,9$ Hz, S-CH_a-CH), 2,76 (d, $^2J = 12,9$ Hz, S-CH_b-CH), 2,36 (t, $^3J = 7,5$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂-CO), 1,78-1,58 (m, 4H, S-CH-CH₂, CH₂-CH₂-CH₂-CO), 1,52-1,36 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CO). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 173,83$ (CO-O), 163,86 (NH-CO-NH), 72,12, 70,78, 70,74, 70,70, 69,34 (O-CH₂), 63,62 (CO-O-CH₂), 62,31 (S-CH-CH), 60,56 (S-CH₂-CH), 59,21 (S-CH-CH), 55,66 (S-CH-CH), 40,64 (S-CH₂-CH), 33,96 (CH₂-CH₂-CH₂-CO), 28,49, 28,38 (S-CH-CH₂, CH₂-CH₂-CH₂-CO), 24,90 (CH₂-CH₂-CH₂-CO). ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 391,1897, gefunden 391,1902 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Oligonukleotid **23**



23 wurde von MWG Biotech bezogen. Die Sequenz stammt aus ^[102].

Oligonukleotid 24

24 wurde von MWG Biotech bezogen. Die Sequenz stammt aus ^[102].

Oligonukleotid 25

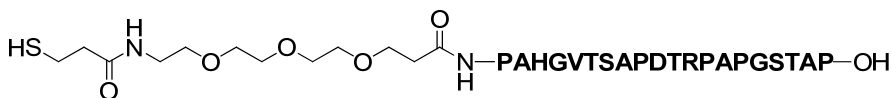
25 wurde von MWG Biotech bezogen. Die Sequenz stammt aus ^[102].

Peptid 26

Peptid **26** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 20,7$ min. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 1209,0830, gefunden 1209,0831 $[(M + 2H)/2]^{2+}$, berechnet 806,3911, gefunden 806,3918 $[(M + 3H)/3]^{3+}$.

Peptid 27

Peptid **27** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 18,7$ min. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 772,3865, gefunden 772,3869 $[(M + 3H)/3]^{3+}$, berechnet 579,5417, gefunden 579,5417 $[(M + 4H)/4]^{4+}$.

Peptid 28

Peptid **28** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 19,6$ min. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet

5. Experimenteller Teil

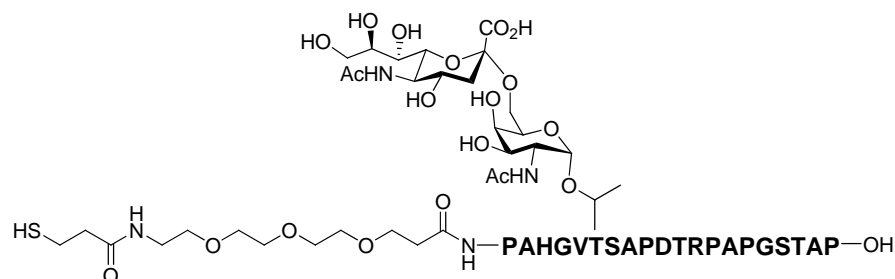
1096,5362, gefunden 1096,5366 $[(M + 2H)/2]^{2+}$, berechnet 731,3599, gefunden 731,3605 $[(M + 3H)/3]^{3+}$.

Peptid 29



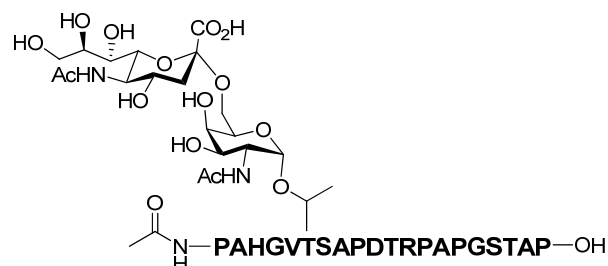
Peptid **29** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 18,7$ min. ESI-HR-MS (Micromass Q-TOF Ultima): m/z: berechnet 1928,9467, gefunden 1928,9425 $[M + H]^+$.

Peptid 30

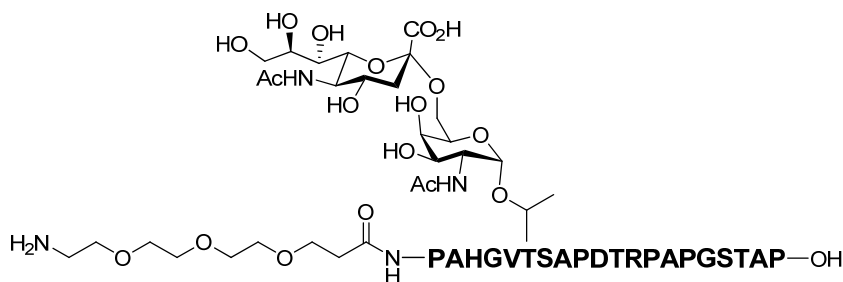


Peptid **30** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 18,3$ min. ESI-HR-MS (Micromass Q-TOF Ultima): m/z: berechnet 896,0849, gefunden 896,0858 $[(M + 3H)/3]^{3+}$.

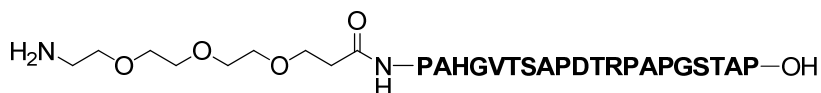
Peptid 31



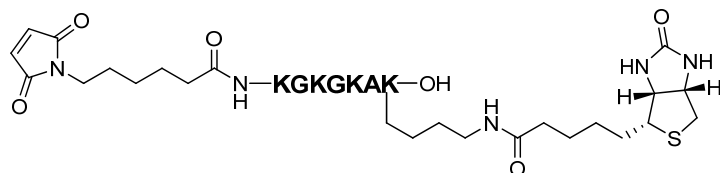
Peptid **31** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 17,3$ min. ESI-HR-MS (Micromass Q-TOF Ultima): m/z: berechnet 1212,0646, gefunden 1212,0601 $[(M + 2H)/2]^{2+}$.

Peptid 32

Peptid **32** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 16,6$ min. ESI-HR-MS (Micromass Q-TOF Ultima): m/z: berechnet 1292,6172, gefunden 1292,6217 $[(M + 2H)/2]^{2+}$.

Peptid 33

Peptid **30** wurde von Dr. Ulrika Westerlind synthetisiert.^[103] RP-HPLC (Phenomenex Luna C18 (2), 4,6 mm x 250 mm; A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA; 5 % B bis 50 % B in 45 min, Detektion bei 213 nm): $t_R = 18,1$ min. ESI-HR-MS (Micromass Q-TOF Ultima): m/z: berechnet 1045,5298, gefunden 1045,5338 $[(M + 2H)/2]^{2+}$.

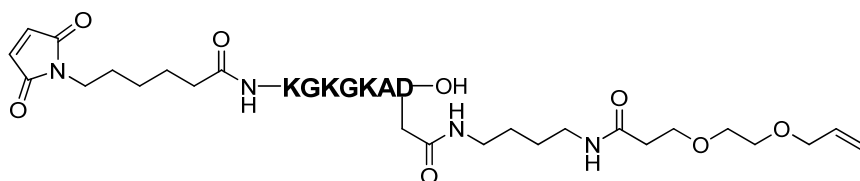
Peptid 34

Peptidsynthese des Peptids **34** im Maßstab 0,1 mmol erfolgte mit Hilfe des Syro Peptidsynthesizers nach AAV 3 ausgehend von 2-Chlortritylharz beladen mit Fmoc-Lys(Biotin)-OH (beladen nach AAV 1). MIC wurde wie eine gewöhnliche Fmoc-Aminosäure automatisch gekuppelt. Als Kupplungsreagenz kam HCTU in einstündigen Einfachkupplungen zur Anwendung, als Waschlösungsmittel DMF. Fmoc-Abspaltungen erfolgten mit DBU/Piperidin/DMF 2:2:96. Nach der automatisierten Synthese wurde das Harz in einen Spritzenreaktor mit Fritte überführt und dreimal 5 min mit je 3 ml DCM gewaschen. Abspaltung des Produkts erfolgte nach AAV 5 mit TFA/TES/Wasser 95:2,5:2,5. Der erhaltene weiße Feststoff wurde mittels präparativer RP-HPLC-MS aufgereinigt (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 2 min 10 % B, 3-28 min 10-30 % B). Erhalten wurden 56 mg **34** (49,4 μ mol, 49 %). RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 bis 11 min 5 % B bis 100 % B): $t_R = 6,2$ min. ESI-MS: m/z: berechnet 1135,63, gefunden 1135,56 $[M+H]^+$. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet

5. Experimenteller Teil

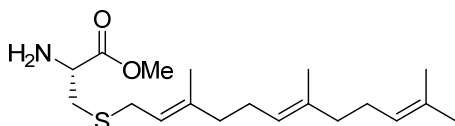
568,31825, gefunden 568,31828 $[(M+2H)/2]^{2+}$.

Peptid 35



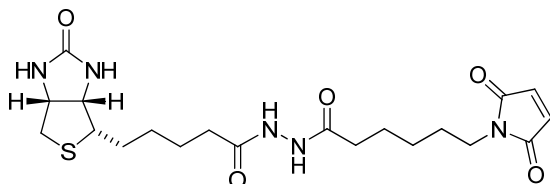
Peptid **35** wurde von Dr. Pascal Jonkheijm in Analogie zu Peptid **34** synthetisiert. RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 bis 11 min 5 % B bis 100 % B): $t_R = 6,3$ min. ESI-MS: m/z: berechnet 1122,65, gefunden 1122,56 $[M+H]^+$.

H-L-Cys(Far)-OMe (36)



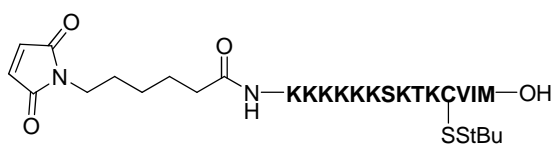
36 wurde von Kristina Görmer erhalten. Für analytische Daten und die Synthesevorschrift siehe [104].

N'-D-(+)-Biotinyl-N-6-(2,5-dihydro-2,5-dioxopyrrol-1-yl)-hexanhydrazid (MIC-Biotin, 38)



38 wurde von Sigma Aldrich bezogen.

Peptid 39a



Peptidsynthese des Peptids **39a** im Maßstab 0,1 mmol erfolgte mit Hilfe des Syro Peptidsynthesizers nach AAV 3 ausgehend von Fmoc-Met-beladenem 2-Chlortritylharz (beladen nach AAV 1). Als Kupplungsreagenz kam HCTU zur Anwendung. Ab Serin Nr. 7 wurden Doppelkupplungen durchgeführt. Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor mit Fritte transferiert, dreimal je 5 min mit je 3 ml DCM gewaschen (Schütteln auf einem Horizontalschüttler) und unter reduziertem Druck getrocknet. Mit 7,0 mg Harz wurde in einem Spritzenreaktor mit Fritte eine Testabspaltung nach folgender Abfolge durchgeführt:

1 x 3 ml DMF, je 5 min;

2 x 3 ml 2 % DBU/DMF, 15 min, 5 min;

3 x 3 ml DMF, je 5 min;

3 x 3 ml DCM, je 5 min;

3 x 3 ml TFA/Wasser 95:5, 1 h, 2 x 5 min;

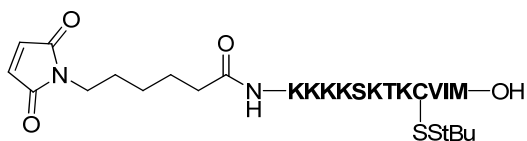
Das Lösungsmittel der gesammelten Abspaltlösungen wurde unter reduziertem Druck entfernt. Erhalten wurden 5 mg eines gelblichen Öls. Der Feststoff wurde mittels analytischer RP-HPLC analysiert (C18-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 min bis 15 min 5 % B bis 100 % B). Es wurde kein Produkt detektiert.

Wiederholung der Synthese des Peptids **39a** erfolgte nach AAV 4 auf dem Mikrowellenpeptidsynthesizer Liberty im Maßstab 0,1 mmol und ausgehend von Fmoc-Met-beladenem 2-Chlortriethylharz (siehe oben). Ab Serin Nr. 7 wurden Doppelkupplungen durchgeführt. Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor mit Fritte überführt und durch Schütteln auf einem Horizontalschüttler dreimal 5 min mit je 3 ml DCM gewaschen. Es wurde unter reduziertem Druck 18 h getrocknet und bis zur nachfolgenden Funktionalisierung und Abspaltung im Spritzenreaktor unter Argonatmosphäre und bei Raumtemperatur gelagert.

Das Harz wurde im Spritzenreaktor 15 min in 3 ml DMF gequollen, eine Kupplungslösung aus 106 mg MIC (0,5 mmol), 208 mg HCTU (0,5 mmol) und 171 μ l DIPEA (1,0 mmol) in 1 ml DMF wurde zugegeben und 40 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte Waschen für dreimal 5 min mit je 3 ml DMF und erneutes Schütteln mit Kupplungslösung für 40 min. Nach Waschen für dreimal 5 min mit je 3 ml DMF sowie dreimal 5 min mit je 3 ml DCM wurde das Harz 18 h unter reduziertem Druck getrocknet. Erhalten wurden 168 mg oranges Harz.

Abspaltung des Produkts erfolgte nach AAV 5 mit TFA/TES/Wasser 95:2,5:2,5. Der erhaltene weiße Feststoff wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 2 min 10 % B, 3-13 min 10-100 % B). Erhalten wurden 6,2 mg **39a** in einer Reinheit von 87 % (2,8 μ mol) sowie 12,2 mg in einer Reinheit von 78 % (4,9 μ mol) als weißer Feststoff (Gesamtausbeute 7,7 %, korrigiert nach Produktgehalt). RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 min bis 16 min 5 % B bis 50 % B): $t_R = 6,0$ min. ESI-MS: m/z: berechnet 1959,17, gefunden 1959,88 $[M+H]^+$. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z: berechnet 653,72751, gefunden 653,72687 $[(M+3H)/2]^{3+}$.

Peptid **39b**

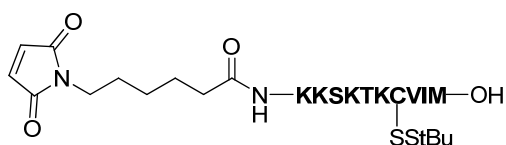


Synthese des Peptids **39b** erfolgte analog zur Synthese von Peptid **39d**. Erhalten wurden 27,8 mg **39b** in 90 % Reinheit (14,7 μ mol, 14,7 %). RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 min bis 11 min 5 % B bis 100 % B): $t_R = 4,0$

5. Experimenteller Teil

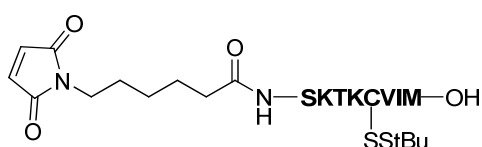
min. ESI-MS: m/z: berechnet 1702,98, gefunden 1703,47 [M+H]⁺.

Peptid 39c



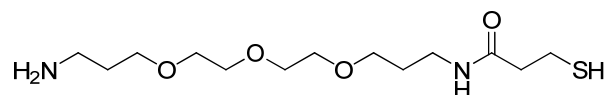
Synthese des Peptids **39c** erfolgte analog zur Synthese von Peptid **39d**. Erhalten wurden 14,6 mg **39c** in 95 % Reinheit (9,6 μ mol, 9,6 %). RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 bis 11 min 5 % B bis 100 % B): t_R = 4,4 min. ESI-MS: m/z: berechnet 1446,79, gefunden 1447,32 [M+H]⁺.

Peptid 39d



Synthese des Peptids **39d** erfolgte nach AAV 4 auf dem Mikrowellenpeptidsynthesizer Liberty im Maßstab 0,1 mmol ausgehend von Fmoc-Met-beladenem 2-Chlortritylharz (beladen nach AAV 1). Ab Serin Nr. 7 wurden Doppelkupplungen durchgeführt. Nach der Synthese wurde das Harz in einen Spritzenreaktor mit Fritte überführt und eine Kupplungslösung aus 106 mg MIC (0,5 mmol), 208 mg HCTU (0,5 mmol) und 171 μ l DIPEA (1,0 mmol) in 1 ml DMF wurde zugegeben und 40 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte Waschen für dreimal 5 min mit je 3 ml DMF und erneutes Schütteln mit Kupplungslösung für 40 min. Nach Waschen für dreimal 5 min mit je 3 ml DMF sowie dreimal 5 min mit je 3 ml DCM erfolgte Abspaltung des Produkts nach AAV 5 mit TFA/TES/Wasser 95:2,5:2,5. Der erhaltene weiße Feststoff wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 2 min 10 % B, 3-13 min 10-100 % B). Erhalten wurden 17,8 mg **39d** in 95 % Reinheit (14,2 μ mol, 14,2 %). RP-HPLC-MS (C4-Säule, A: Wasser mit 0,1 % TFA, B: MeCN mit 0,1 % TFA, 1 min 5 % B, 2 bis 11 min 5 % B bis 100 % B): t_R = 5,2 min. ESI-MS: m/z: berechnet 1190,60, gefunden 1190,21 [M+H]⁺.

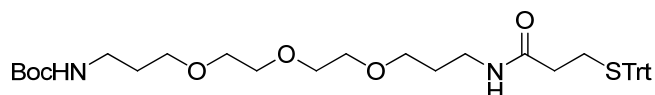
17-Amino-4-Aza-3-oxo-8,11,14-trioxaheptadecan-1-thiol (40)



Zu 190 mg **41** (0,29 mmol) in 5 ml DCM wurden 5 ml TFA und 91 μ l TES (0,6 mmol) gegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck entfernt, Wasser zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat gewaschen, und das Wasser unter reduziertem Druck entfernt. Erhalten wurden

89 mg **40** (0,29 mmol, 100 %) als farbloses Öl. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 3,60\text{-}3,54$ (m, 10H), 3,49 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 3,18 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,01 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,67 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,44 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,85 (quintet, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,70 (quintet, $J = 6,6$ Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 174,41, 143,96, 126,28, 69,89, 69,85, 69,75, 69,65, 68,63, 68,61, 37,98, 36,66, 35,15, 33,46, 28,53, 26,82$. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z : berechnet 309,1843, gefunden 309,1831 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6-Aza-5-oxo-2-thia-10,13,16-trioxa-1,1,1-triphenylnonadecan-19-yl-tert-butyl-carbammat
(**41**)



Zu einer Lösung von 327 mg 3-(Tritylthio)-propansäure (0,94 mmol) und 300 mg einseitig Boc-geschütztem 4-7-10-Trioxatridecan-1,13-diamin^[105] (0,94 mmol) in 10 ml DCM wurden 360 mg EDC (1,87 mmol), 253 mg HOBt (1,87 mg) und 392 μl TEA (2,81 mmol) gegeben und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. 10 ml Wasser wurden hinzugefügt und zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohrprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Erhalten wurden 550 mg **41** (0,85 mmol, 90 %). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,38 (dd, $J = 7,2, 1,3$ Hz, 6H), 7,27-7,22 (m, 6H), 7,18 (tt, $J = 7,0, 1,3$ Hz, 3H), 3,63-3,47 (m, 14H), 3,17 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,47 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,08 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,75-1,69 (m, 4H), 1,41 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 171,14, 156,21, 144,87, 129,73, 128,06, 126,81, 79,18, 70,66, 70,37, 70,25, 69,95, 69,63, 66,89, 38,82, 38,01, 35,58, 29,84, 29,01, 28,62, 27,94$. ESI-HR-MS (LTQ Orbitrap): m/z : berechnet 651,3462, gefunden 651,3458 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6. Literaturverzeichnis

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, *et al.*, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [2] D. Pushkarev, N. F. Neff, S. R. Quake, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 847-850.
- [3] S. Ness, *Mol. Biotechnol.* **2007**, *36*, 205-219.
- [4] M. Uttamchandani, S. Q. Yao, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2428-2438.
- [5] Y. Liu, A. S. Palma, T. Feizi, *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 647-656.
- [6] P. H. Seeberger, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 368-372.
- [7] A. J. Vegas, J. H. Fuller, A. N. Koehler, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1385-1394.
- [8] D. Weinrich, P. Jonkheijm, Christof M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7744-7751.
- [9] Z. Zijian, L. D. Weston, R. G. Louise, H. Fengwei, J. S. Andrew, Z. Gengfeng, A. M. Chad, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7626-7629.
- [10] G. Zheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, C. M. Lieber, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1294-1301.
- [11] S. A. Ruiz, C. S. Chen, *Soft Matter* **2007**, *3*, 168-177.
- [12] K. Salaita, Y. Wang, C. A. Mirkin, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 145-155.
- [13] S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, F. Cerrina, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 974-978.
- [14] N. P. Reynolds, S. Janusz, M. Escalante-Marun, J. Timney, R. E. Ducker, J. D. Olsen, C. Otto, V. Subramaniam, G. J. Leggett, C. N. Hunter, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14625-14631.
- [15] M. Montague, R. E. Ducker, K. S. L. Chong, R. J. Manning, F. J. M. Rutten, M. C. Davies, G. J. Leggett, *Langmuir* **2007**, *23*, 7328-7337.
- [16] A. S. Blawas, W. M. Reichert, *Biomaterials* **1998**, *19*, 595-609.
- [17] R. P. Adam, M. Glenn, G. K. Robert, *et al.*, *Photolithographic synthesis of high-density DNA probe arrays: Challenges and opportunities* **2007**, *25*, 2537-2546.
- [18] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [19] V. Rudolf, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1431-1442.
- [20] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618-9647.
- [21] L. S. Wong, J. Thirlway, J. Micklefield, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12456-12464.
- [22] H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 55-63.
- [23] R. Michael, S. Frank, W. Johanna Gabriela, H. Markus, M. Dieter, S. Thomas, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 1498-1505.
- [24] R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, G. MacBeath, *Nature* **2006**, *439*, 168-174.

- [25] C. Mateo, R. Torres, G. Fernandez-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. Lopez-Gallego, O. Abian, J. M. Palomo, L. Betancor, B. C. C. Pessela, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 772-777.
- [26] K. Jiang, L. S. Schadler, R. W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, M. Terrones, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37-39.
- [27] J. Groll, E. V. Amirgoulova, T. Ameringer, C. D. Heyes, C. Rocker, G. U. Nienhaus, M. Moller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4234-4239.
- [28] J. M. Slocik, E. R. Beckel, H. Jiang, J. O. Enlow, J. S. Zabinski, Jr., T. J. Bunning, R. R. Naik, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2095-2100.
- [29] I. Caelen, H. Gao, H. Sigrist, *Langmuir* **2002**, *18*, 2463-2467.
- [30] E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyck, B. Michel, C. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, *Langmuir* **1996**, *12*, 1997-2006.
- [31] F. R. Lawrence, R. B. David, P. A. F. Stephen, G. S. Peter, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 801-802.
- [32] D. Ryan, B. A. Parviz, V. Linder, V. Semetey, S. K. Sia, J. Su, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2004**, *20*, 9080-9088.
- [33] K. Lee, F. Pan, G. T. Carroll, N. J. Turro, J. T. Koberstein, *Langmuir* **2004**, *20*, 1812-1818.
- [34] K. L. Christman, H. D. Maynard, *Langmuir* **2005**, *21*, 8389-8393.
- [35] N. M. Green, C. B. Anfinsen, Jr., J. T. Edsall, F. M. Richards, in *Adv. Protein Chem.*, Vol. Volume 29, Academic Press, **1975**, pp. 85-133.
- [36] H.-N. Kai, G. B.-S. Annette, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1071-1076.
- [37] Y. Woon-Seok, M. Dal-Hee, W. H. Robert, L. G. Geoffrey, M. Milan, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5480-5483.
- [38] C. A. K. Borrebaeck, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 379-382.
- [39] R. Wacker, H. Schröder, C. M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 281-287.
- [40] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- [41] I. Sielaff, A. Arnold, G. Godin, S. Tugulu, H.-A. Klok, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 194-202.
- [42] B. Helms, I. v. Baal, M. Merckx, E. W. Meijer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1790-1794.
- [43] A. Girish, H. Y. Sun, D. S. Y. Yeo, G. Y. J. Chen, T. K. Chua, S. Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2447-2451.
- [44] Y. Kwon, M. A. Coleman, J. A. Camarero, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1726-1729.

- [45] A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408-1412.
- [46] A. D. de Araujo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Köhn, H. Schröder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 296-301.
- [47] P. C. Lin, S. H. Ueng, M. C. Tseng, J. L. Ko, K. T. Huang, S. C. Yu, A. K. Adak, Y. J. Chen, C. C. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286-4290.
- [48] A. J. Holloway, R. K. van Laar, R. W. Tohill, D. D. L. Bowtell, *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 481 - 489
- [49] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92-98.
- [50] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1170.
- [51] J. E. Butler, *Methods* **2000**, *22*, 4-23.
- [52] L. R. Rebecca, G. M. David, *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 300-366.
- [53] M. M. Dominguez, M. Wathier, M. W. Grinstaff, S. E. Schaus, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1064-1066.
- [54] V. Hlady, J. Buijs, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 72-77.
- [55] S. Chen, J. Zheng, L. Li, S. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14473-14478.
- [56] A. Dondoni, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995-8997.
- [57] T. Posner, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1905**, *38*, 646-657.
- [58] C. R. Becer, H. Richard, S. S. Ulrich *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4900-4908.
- [59] A. Gress, A. Volkel, H. Schlaad, *Macromolecules* **2007**, *40*, 7928-7933.
- [60] G. Yan, E. D. Dennis, J. Justyna, S. Helmut, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7578-7581.
- [61] Z. Hordyjewicz-Baran, L. You, B. Smarsly, R. Sigel, H. Schlaad, *Macromolecules* **2007**, *40*, 3901-3903.
- [62] K. L. Killops, L. M. Campos, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062-5064.
- [63] Christoph D. Heidecke, Thisbe K. Lindhorst, *Chemistry - A European Journal* **2007**, *13*, 9056-9067.
- [64] M. Köhn, J. M. Benito, C. O. Mellet, T. K. Lindhorst, J. M. G. Fernández, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 771-777.
- [65] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226-5230.
- [66] D. Alessandro, M. Alessandro, N. Paolo, R. Aldo, *Chemistry - A European Journal* **2009**, *9999*, NA.
- [67] M. Köhn, TU Dortmund **2005**.
- [68] G. Karl, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 273-287.

- [69] M. Cretich, G. di Carlo, R. Longhi, C. Gotti, N. Spinella, S. Coffa, C. Galati, L. Renna, M. Chiari, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5197-5203.
- [70] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686-694.
- [71] W.-J. Kim, S. Kim, B. S. Lee, A. Kim, C. S. Ah, C. Huh, G. Y. Sung, W. S. Yun, *Langmuir* **2009**.
- [72] A. Lambacher, P. Fromherz, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **1996**, *63*, 207-216.
- [73] M. Gutierrez, P. Jonkheijm, persönliche Kommunikation.
- [74] S. Zhang, Z.-Y. Zhang, *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 373-381.
- [75] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198-1206.
- [76] U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, accepted.
- [77] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [78] T. Porstmann, S. T. Kiessig, *J. Immunol. Methods* **1992**, *150*, 5-21.
- [79] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**, pp. 297-416.
- [80] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [81] I. R. Horn, A. Wittinghofer, A. P. de Bruïne, H. R. Hoogenboom, *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 115-120.
- [82] J. R. Sydor, M. Engelhard, A. Wittinghofer, R. S. Goody, C. Herrmann, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14292-14299.
- [83] J. John, R. Sohmen, J. Feuerstein, R. Linke, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6058-6065.
- [84] L. Brunsveld, H. Waldmann, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 273-288.
- [85] K. E. Hightower, C. A. Fierke, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 176-181.
- [86] M. Pechlivanis, R. Ringel, B. Popkirova, J. Kuhlmann, *Biochemistry* **2007**, *46*, 5341-5348.
- [87] N. M. Okeley, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21833-21840.
- [88] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*, 1746-1752.
- [89] O. Mozziconacci, V. Sharov, T. D. Williams, B. A. Kerwin, C. Schöneich, *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 9250-9257, und darin zitierte Literaturstellen.

- [90] B. Dursina, R. Reents, C. Delon, Y. Wu, M. Kulharia, M. Thutewohl, A. Veligodsky, A. Kalinin, V. Evstifeev, D. Ciobanu, S. E. Szedlacsek, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2822-2835.
- [91] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567-1572.
- [92] U. T. T. Nguyen, J. Cramer, J. Gomis, R. Reents, M. Gutierrez-Rodriguez, R. S. Goody, K. Alexandrov, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 408-423.
- [93] L. Brunsveld, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 6622-6646.
- [94] M. Zerial, H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 107-117.
- [95] F. Darchen, B. Goud, *Biochimie* **2000**, *82*, 375-384.
- [96] T. Bergbrede, N. Chuky, S. Schoebel, W. Blankenfeldt, M. Geyer, E. Fuchs, R. S. Goody, F. Barr, K. Alexandrov, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2628-2635.
- [97] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylorpapadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, D. Lampion, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476-5482.
- [98] J. Burchell, J. Taylorpapadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691-696.
- [99] L.-E. Perret-Aebi, A. v. Zelewsky, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4482-4485.
- [100] H. Saneyoshi, K. Seio, M. Sekine, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10453-10460.
- [101] B. T. Houseman, M. Mrksich, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7552-7555.
- [102] C. M. Niemeyer, R. Wacker, in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **2005**.
- [103] D. Weinrich, M. Köhn, P. Jonkheijm, U. Westerlind, L. Dehmelt, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nüsse, H. Schröder, R. Wacker, E. Voges, R. Breinbauer, H. Kunz, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, **2009**, manuscript in preparation.
- [104] A. K. Tamara, R. Conrad, Y. Nathan, A. Evelyn, C. D. Dennis, D. D. Mark, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2003**, *46*, 29-54.
- [105] M.-C. Tseng, Y.-P. Chang, Y.-H. Chu, *Anal. Biochem.* **2007**, *371*, 1-9.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampicillin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AG	Arbeitsgruppe
Ak.	Antikörper
Allg. Teil	Allgemeiner Teil
Amp	Ampicillin
Äq.	Äquivalent
ASPPS	automated solid-phase peptide synthesis
@	bei
AV	Arbeitsvorschrift
BC	Bicaudal
ber.	berechnet
bp	Basenpaare
C	Chloramphenicol
Cam	Chloramphenicol
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CIAP	calf-intestine alkaline phosphatase
COSY	correlation spectroscopy
Cy3	Cyanine 3 (Fluoreszenzfarbstoff)
Cy5	Cyanine 5 (Fluoreszenzfarbstoff)
d (NMR)	Dublett
δ (NMR)	chemische Verschiebung
Da	Dalton
DBU	Diazabicycloundecen
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	desoxyribonucleic acid
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
DPN	dip pen nanolithography
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	Ethandithiol
EDTA	ethylenediamintetraacetic acid

7. Abkürzungsverzeichnis

EGFP	enhanced green fluorescent protein
ESI	electrospray ionisation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAB	fast atom bombardement
Far	Farnesyl
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Fpp	Farnesylpyrophosphat
FTase	Proteinfarnesyltransferase
funkt.	funktionalisiert
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
gHMBC	gradient-enhanced heteronuclear multiple bond correlation
gHSQC	gradient-enhanced heteronuclear single quantum correlation
GppNHp	Guanosine-5'-($\beta\gamma$ -imino)triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H (NMR)	Proton
H ₆	Hexahistidin
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chloro-1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His ₆	Hexahistidin
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	high-performance liquid chromatography
HR	high resolution
ID	inner diameter
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kanamycin
Kan	Kanamycin
KRT	K-Ras-C-Terminus
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
μ CP	microcontact printing
m (NMR)	Multiplett
M	molar

MALDI	matrix-assisted laser desorption ionisation
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MESTBS	milk-EDTA-tris-buffered saline
MIC	6-Maleimidocapronsäure
min	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NMR	nuclear magnetic resonance
PEG	Polyethylenglykol
PAMAM	Poly(amidoamin) (-Dendrimer)
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	phosphate-buffered saline, Tween-20
PECVD	plasma-enhanced chemical vapour deposition
PDMS	Polydimethylsiloxan
PPL	polymer pen lithography
ppm	parts per million
pTyr	Phosphotyrosin
PTP1B	Protein-Tyrosinphosphatase 1B
PTP μ	Protein-Tyrosinphosphatase μ
q (NMR)	Quartett
RBD	Ras-binding domain
RP	reverse phase
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
s (NMR)	Singulett
SA	sinapinic acid
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SiO _x /Si	Siliziumoxid auf Silizium
S/N	Signal-Hintergrund-Verhältnis
Str oder SA _v	Streptavidin
t (NMR)	Triplett
<i>t</i> Bu	tert-Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TES	Triethylsilan

7. Abkürzungsverzeichnis

TETBS	Tween-20-EDTA-tris-buffered saline
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TOF	time of flight
t_R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
UV	ultraviolett
VIS	visible light
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1517 und 1525).

8. Anhang

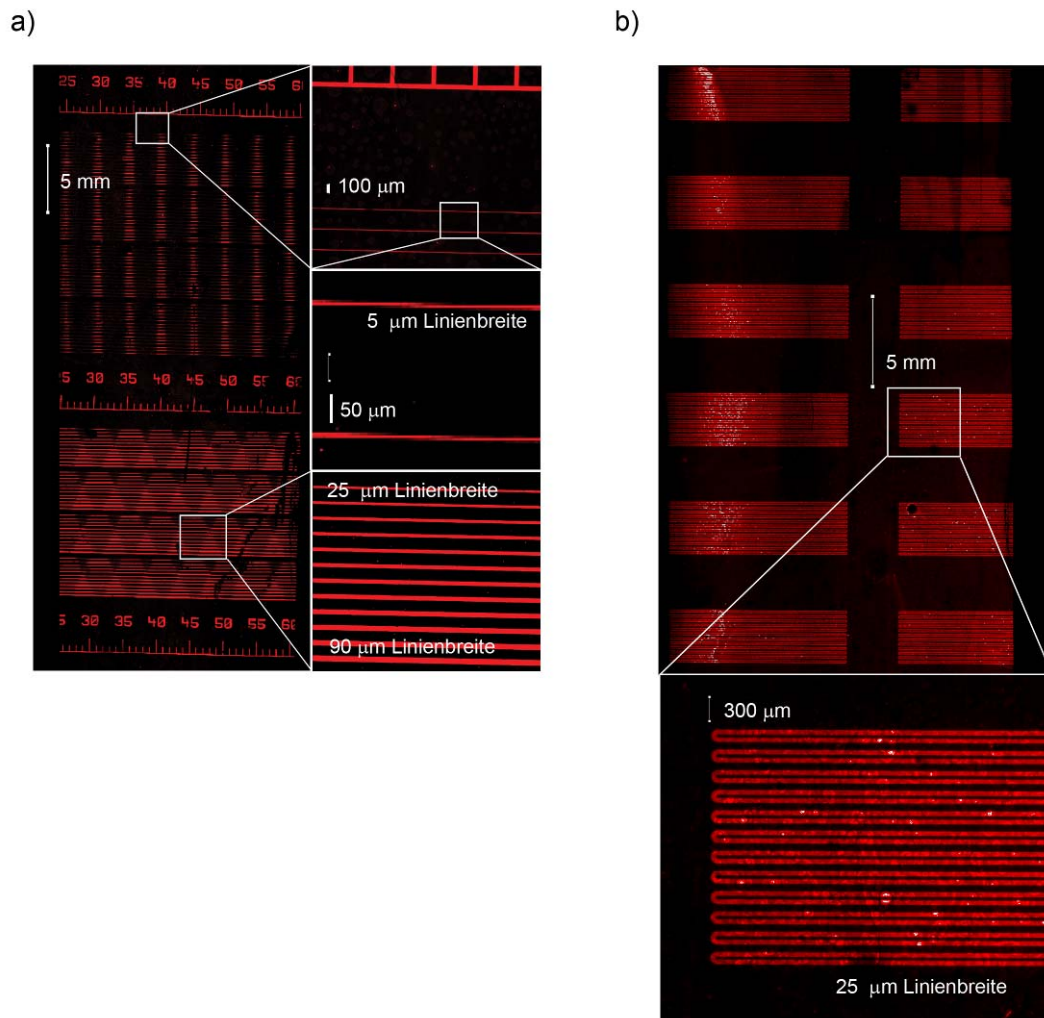


Abbildung A1: In der Photolithographie verwendete Masken. a) Maske mit Linienstrukturen in verschiedenen Dicken (Gesamtfläche $\sim 75 \times 25 \text{ mm}^2$). b) Maske mit konstant breiten Linienstrukturen (Gesamtfläche $\sim 75 \times 25 \text{ mm}^2$).

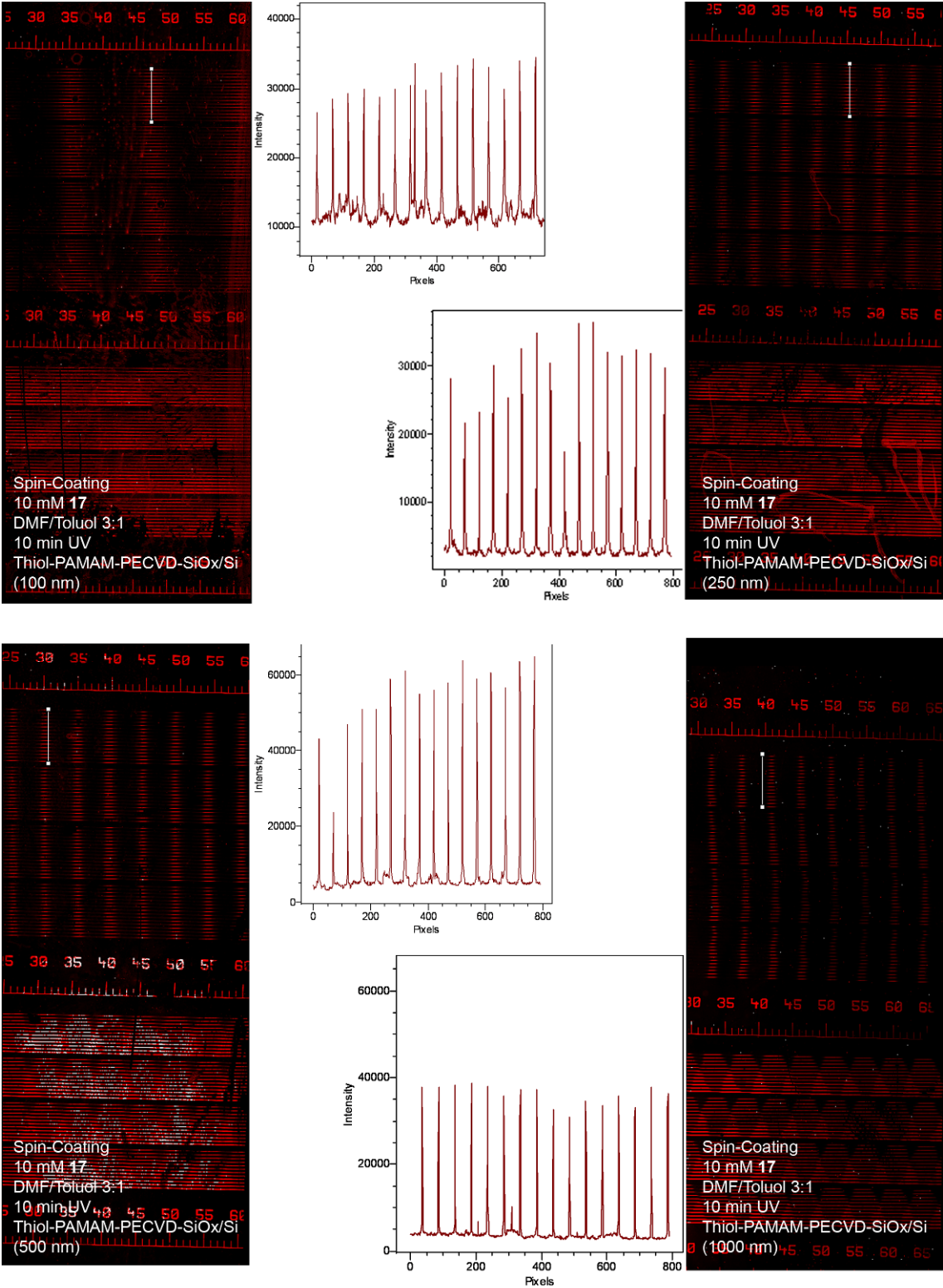


Abbildung A2: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.3.

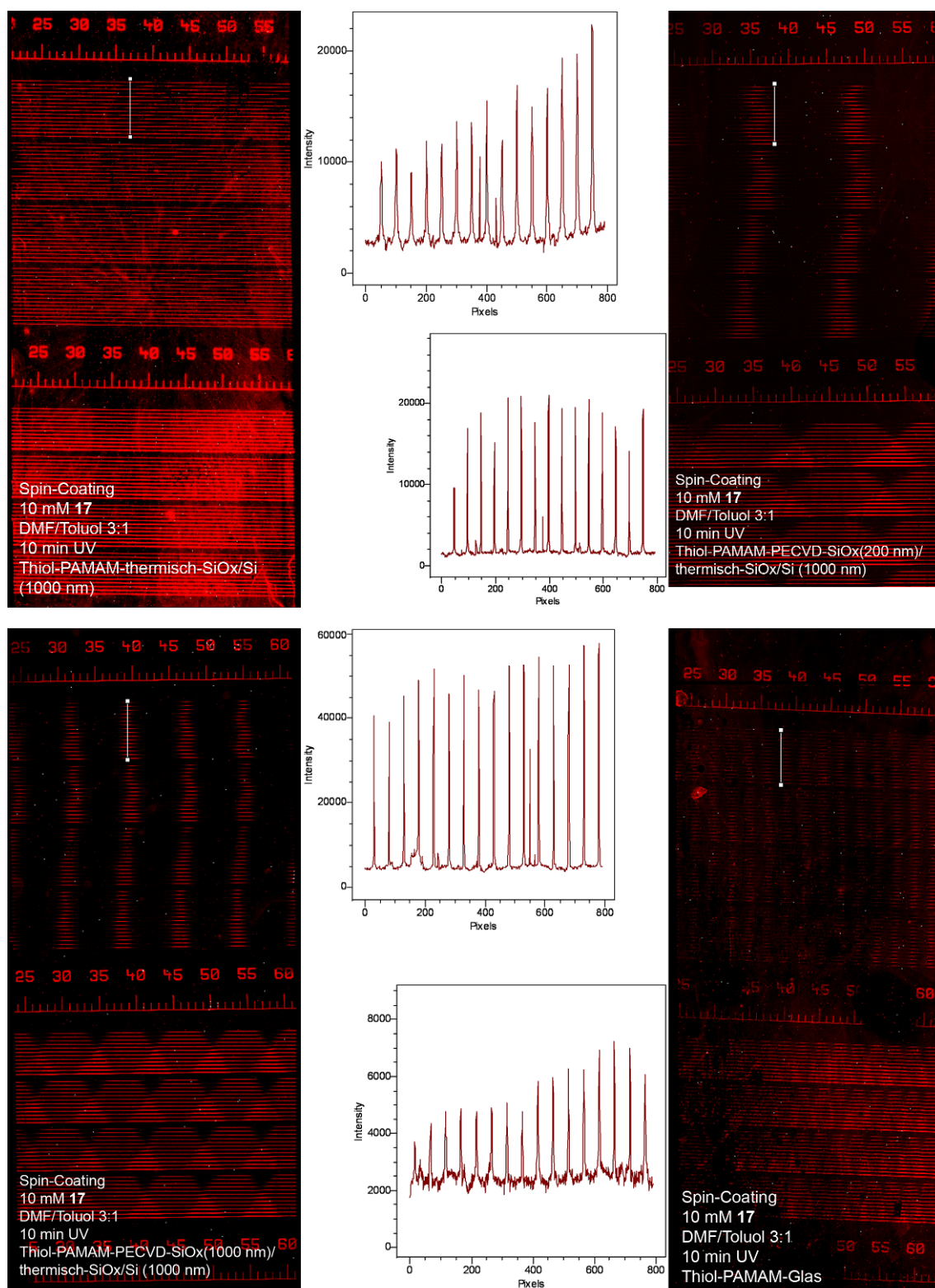


Abbildung A3: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.3 (Fortsetzung).

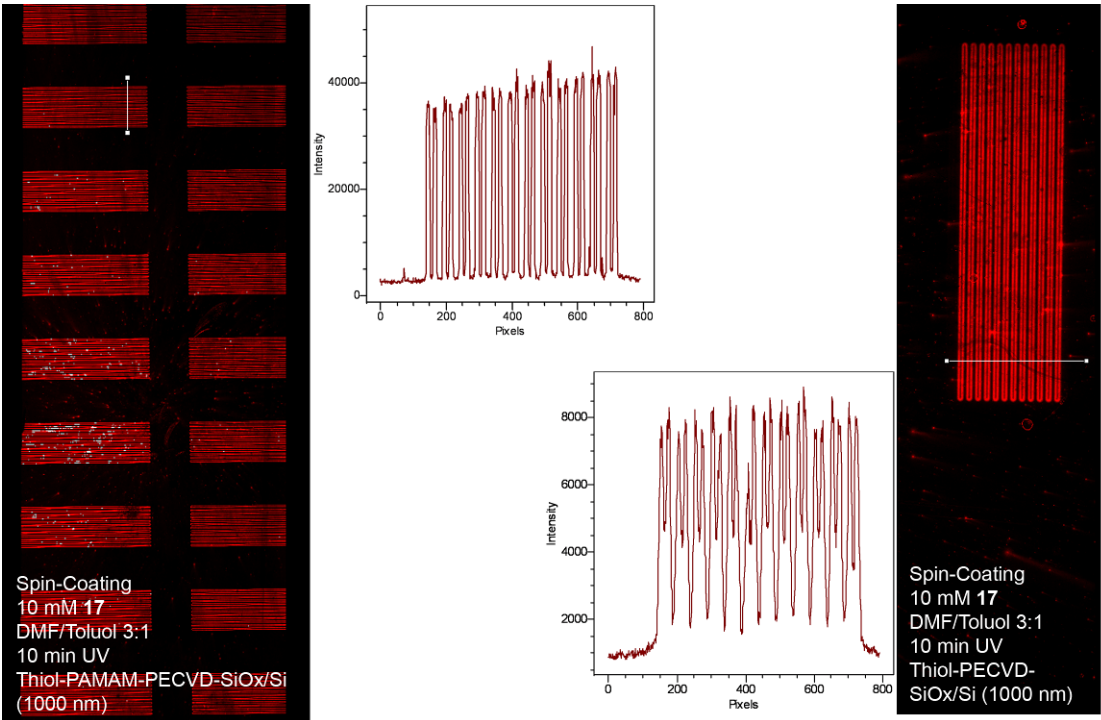


Abbildung A4: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.3 (Fortsetzung).

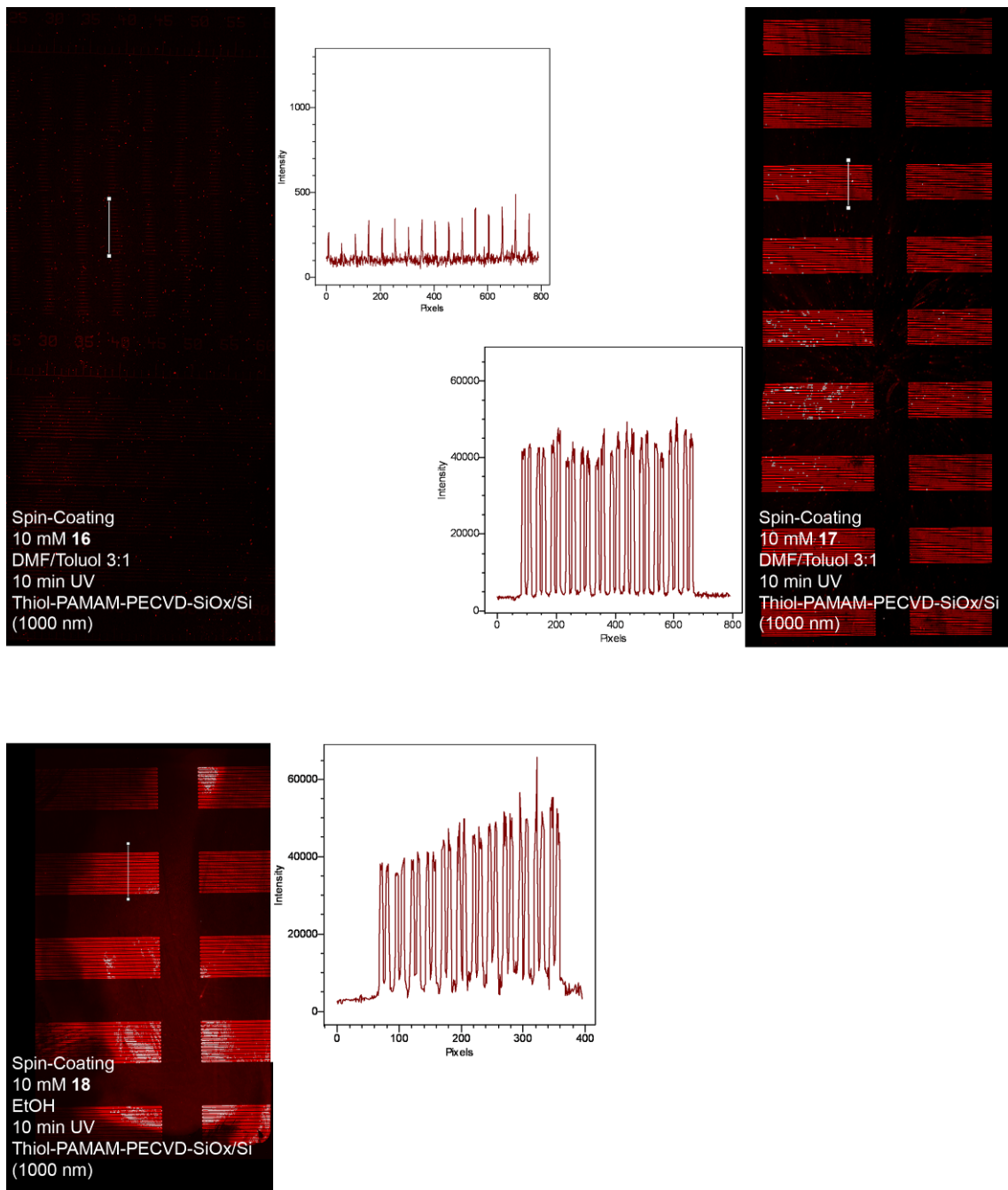


Abbildung A5: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.4.

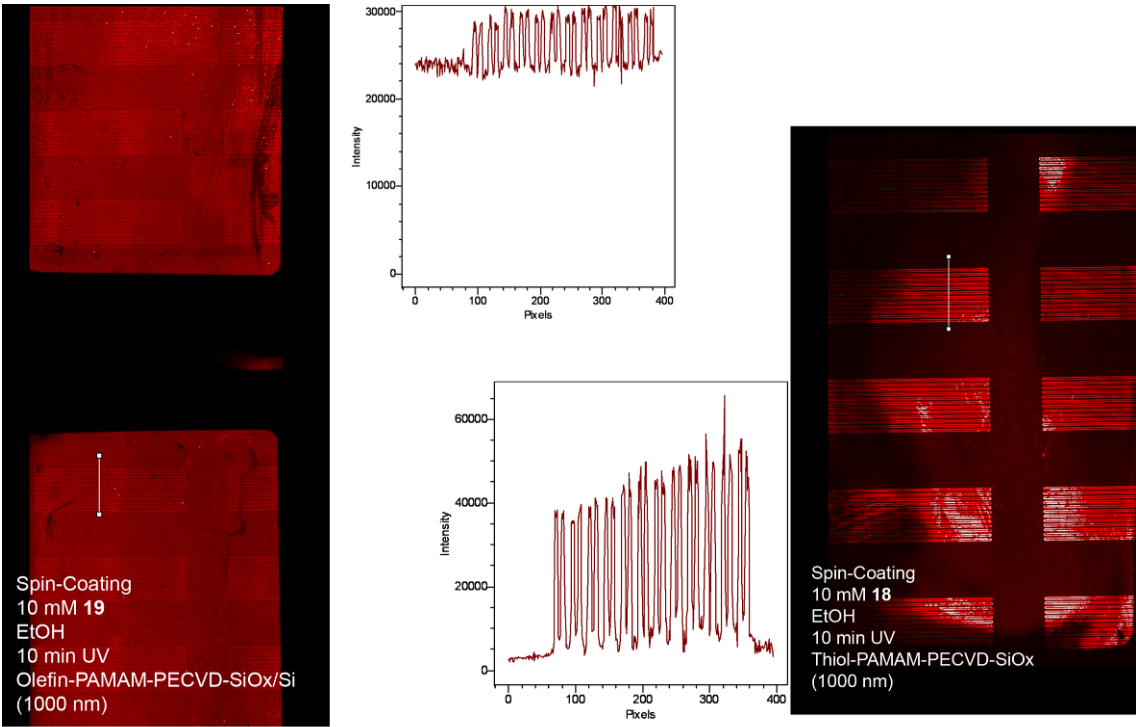


Abbildung A6: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.5.

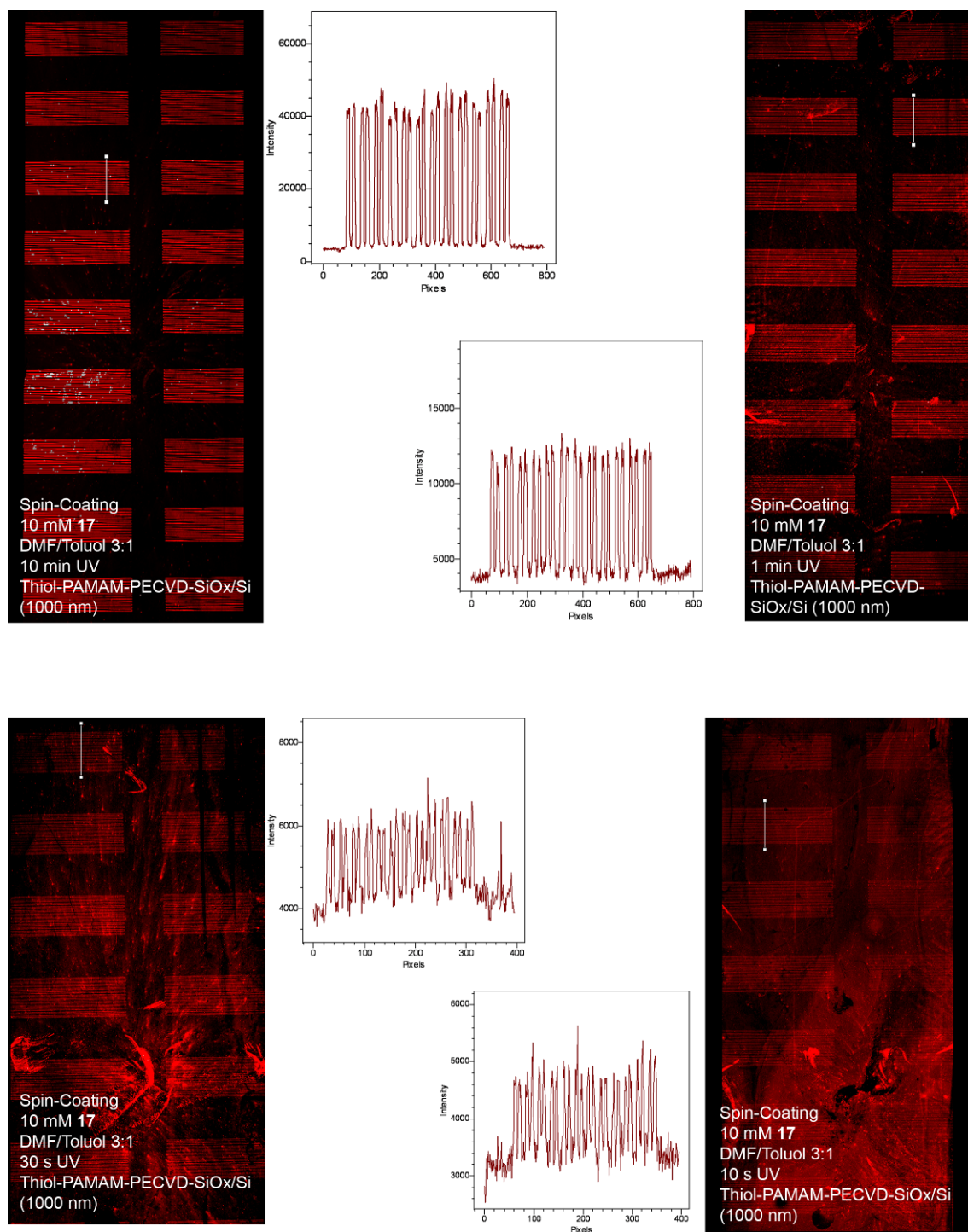


Abbildung A7: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.6.

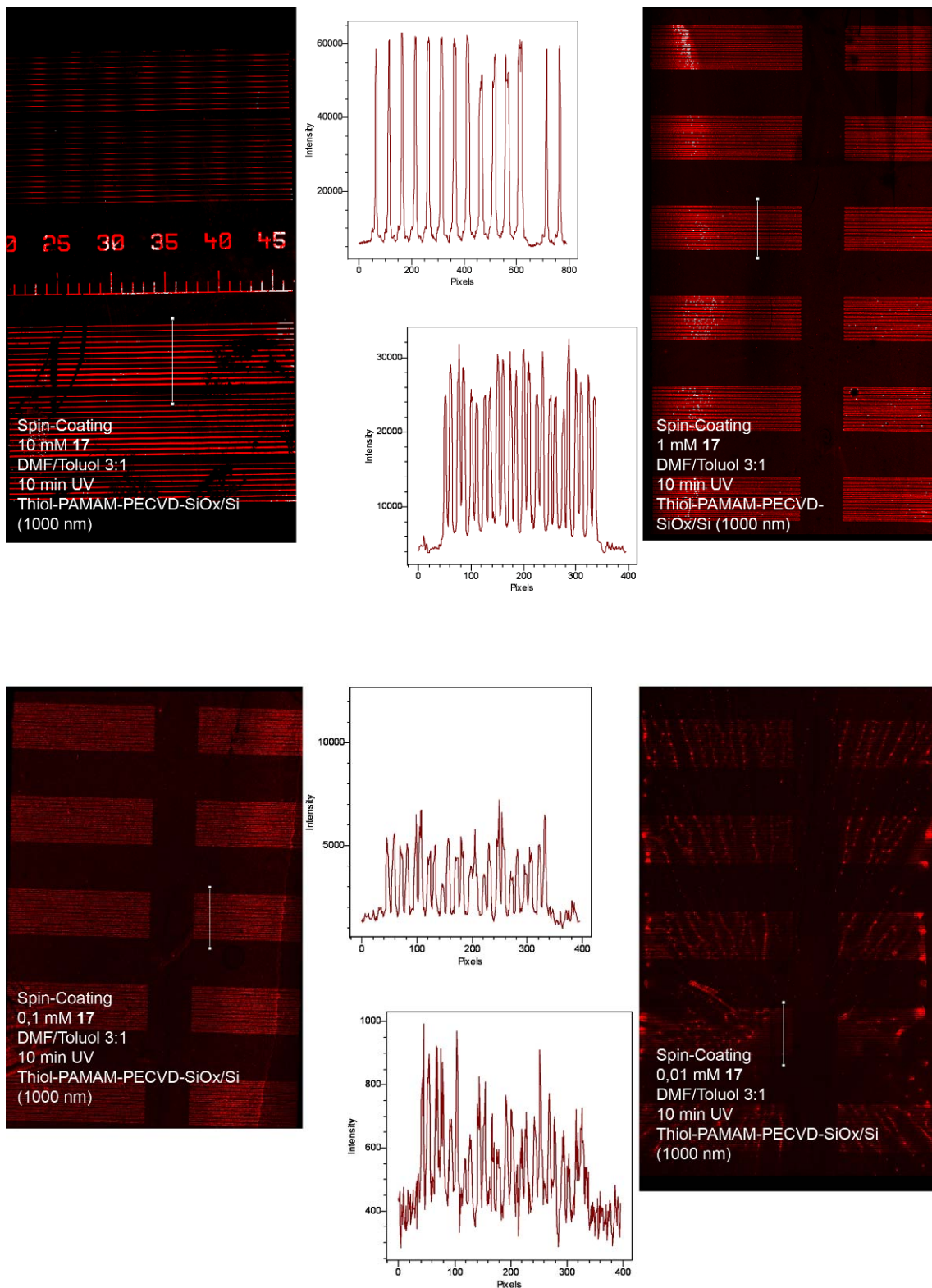


Abbildung A8: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.6 (Fortsetzung).

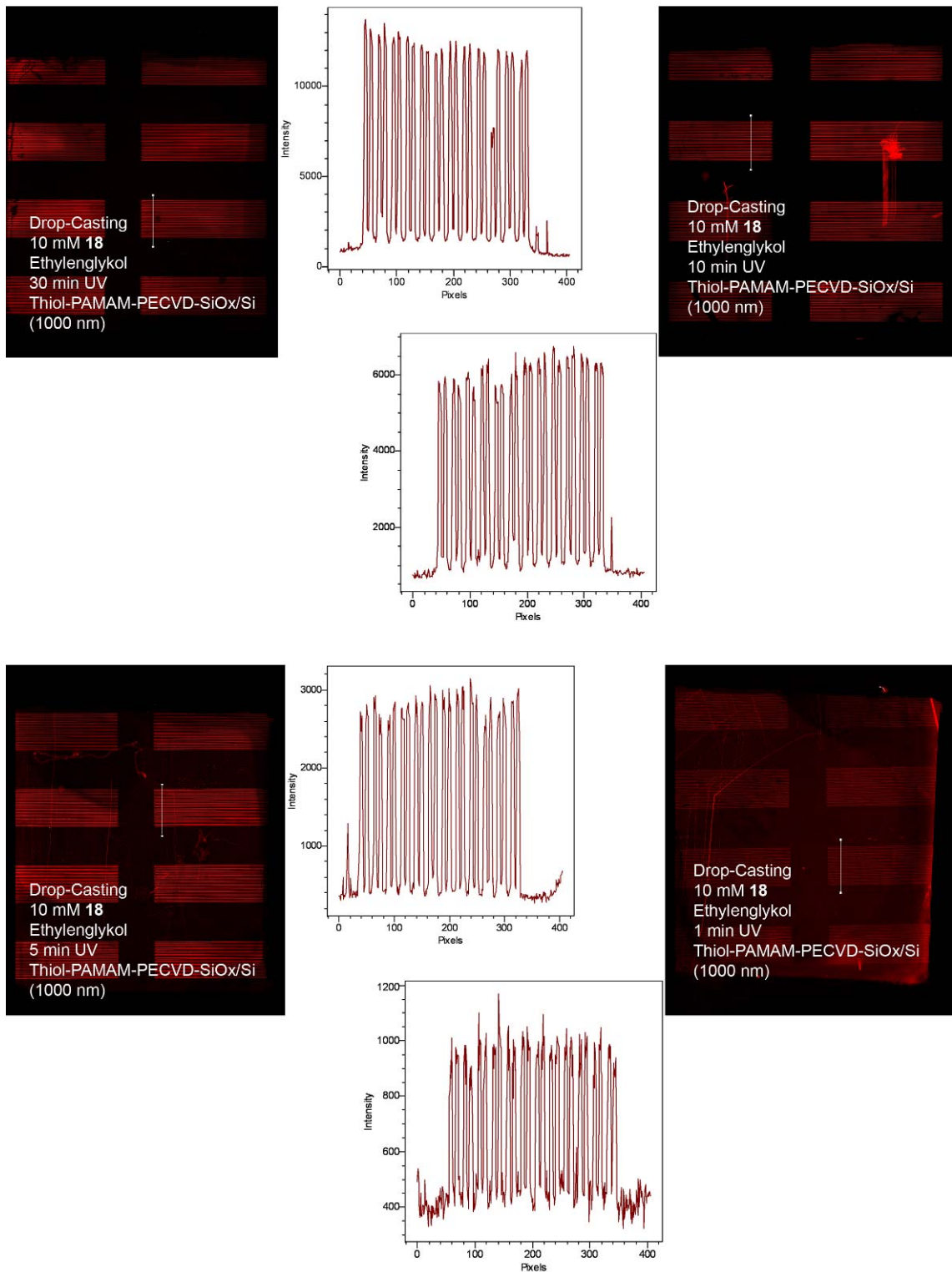


Abbildung A9: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.7.

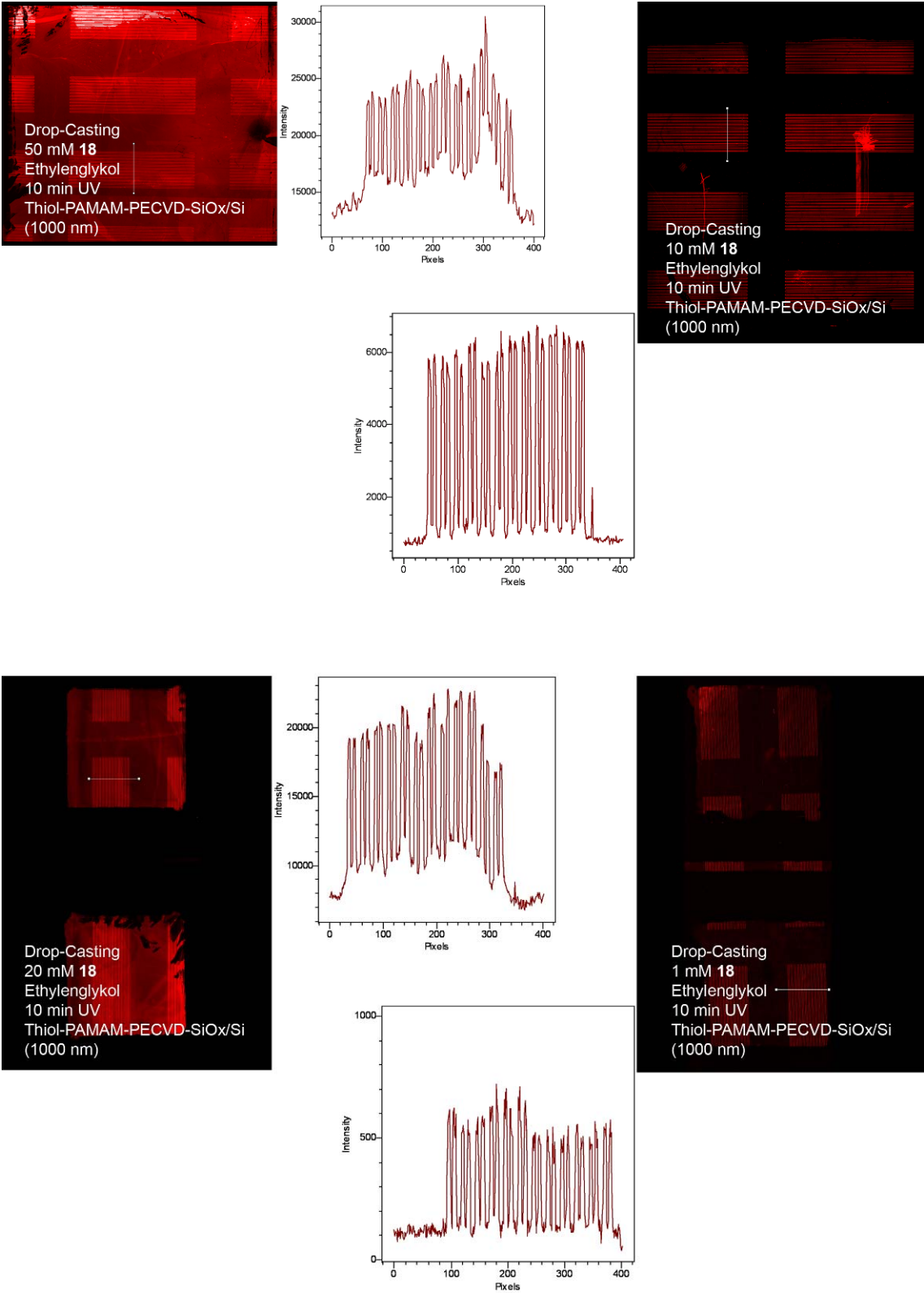


Abbildung A10: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.7 (Fortsetzung).

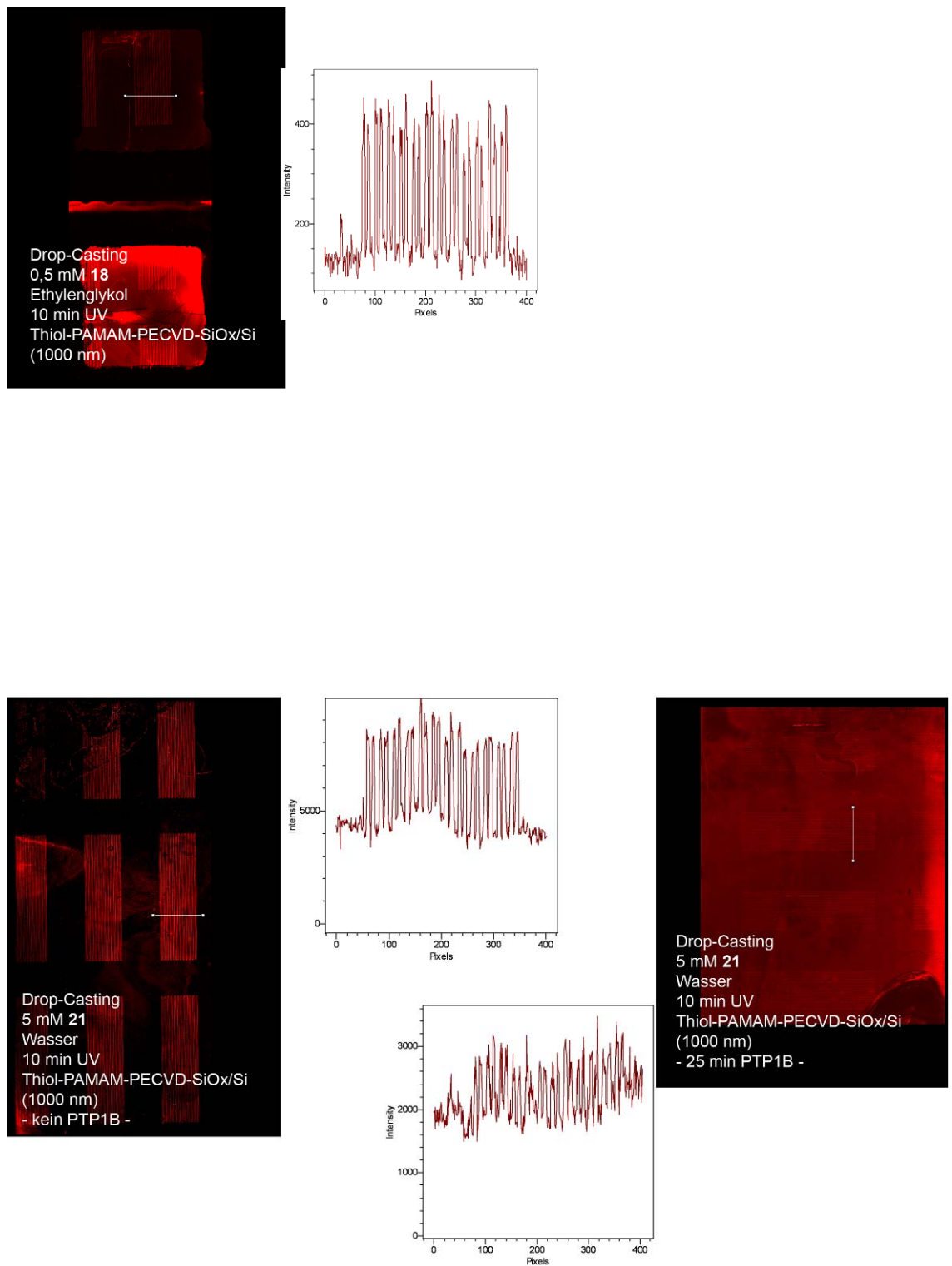


Abbildung A11: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.1.7 (Fortsetzung) und 5.3.2.1.

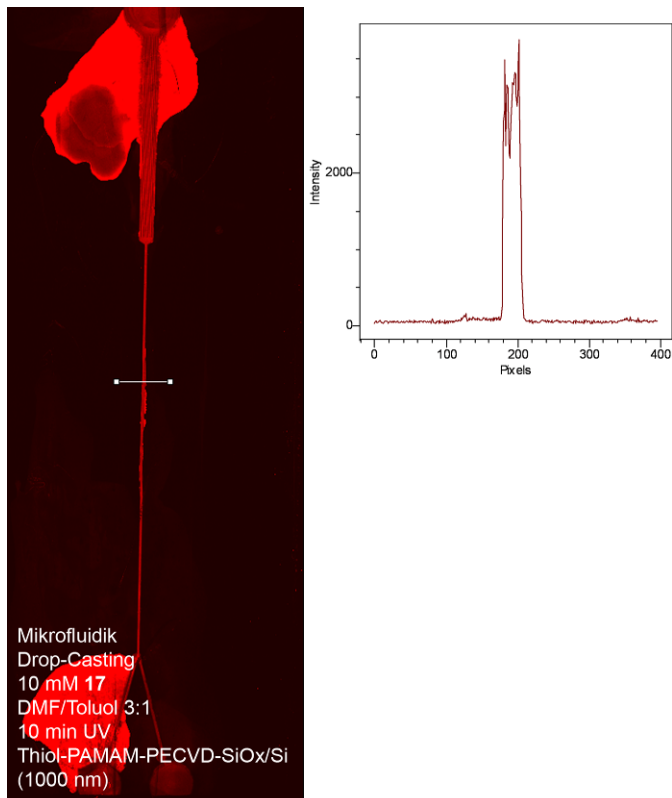


Abbildung A12: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.2.2.

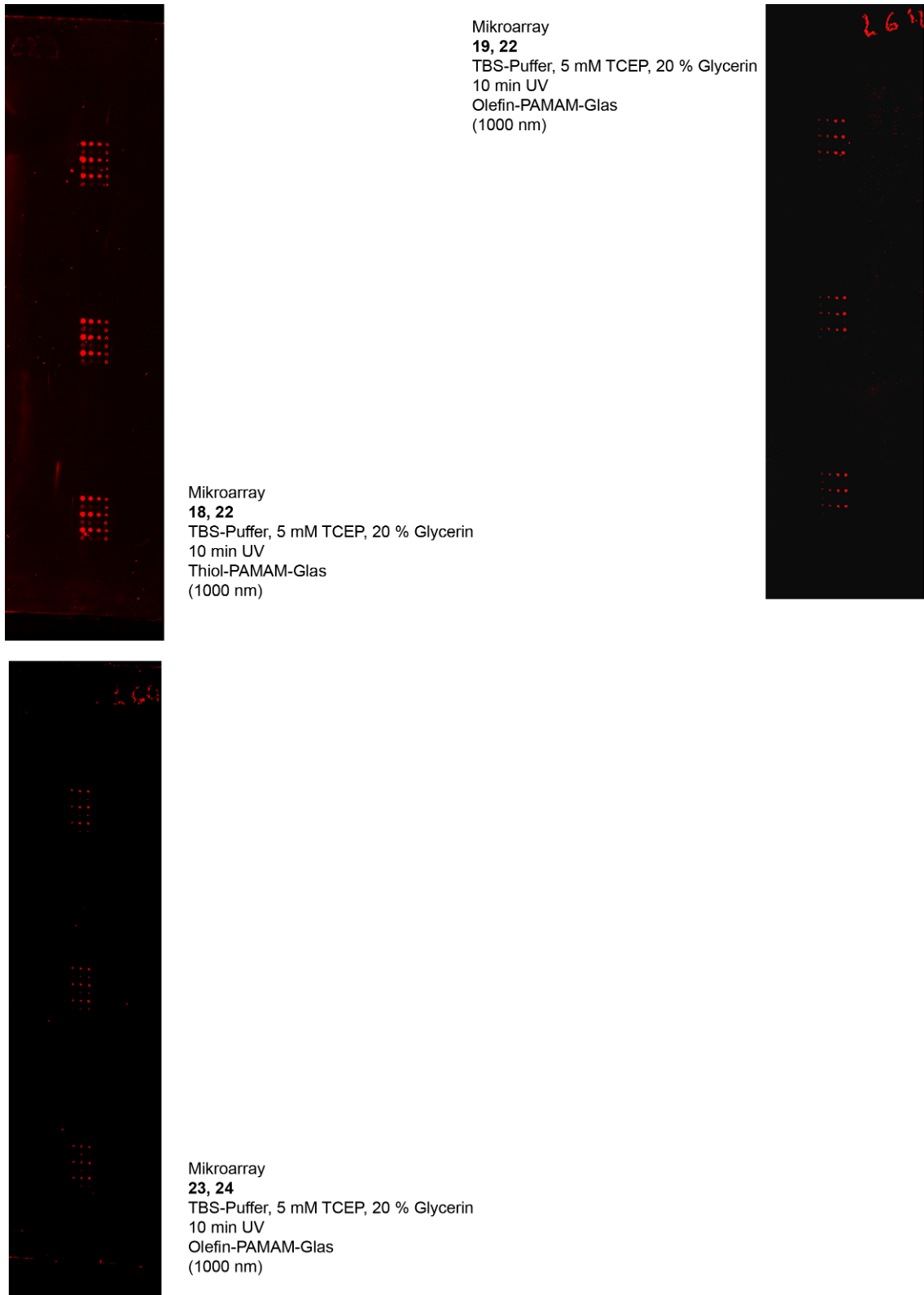


Abbildung A13: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.3.1 und AV 5.3.3.2

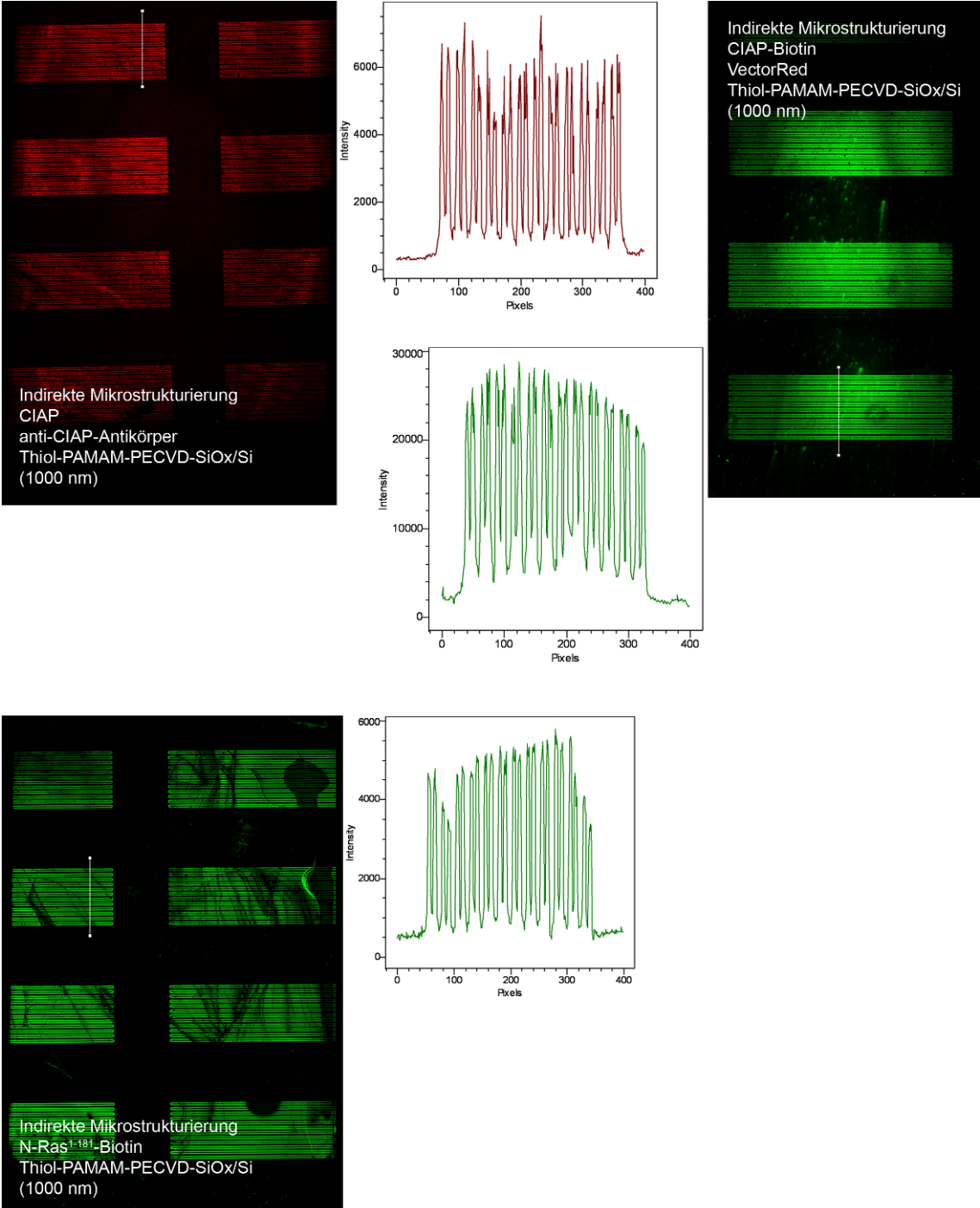


Abbildung A14: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.4.2., 5.3.4.3 und 5.3.4.4.

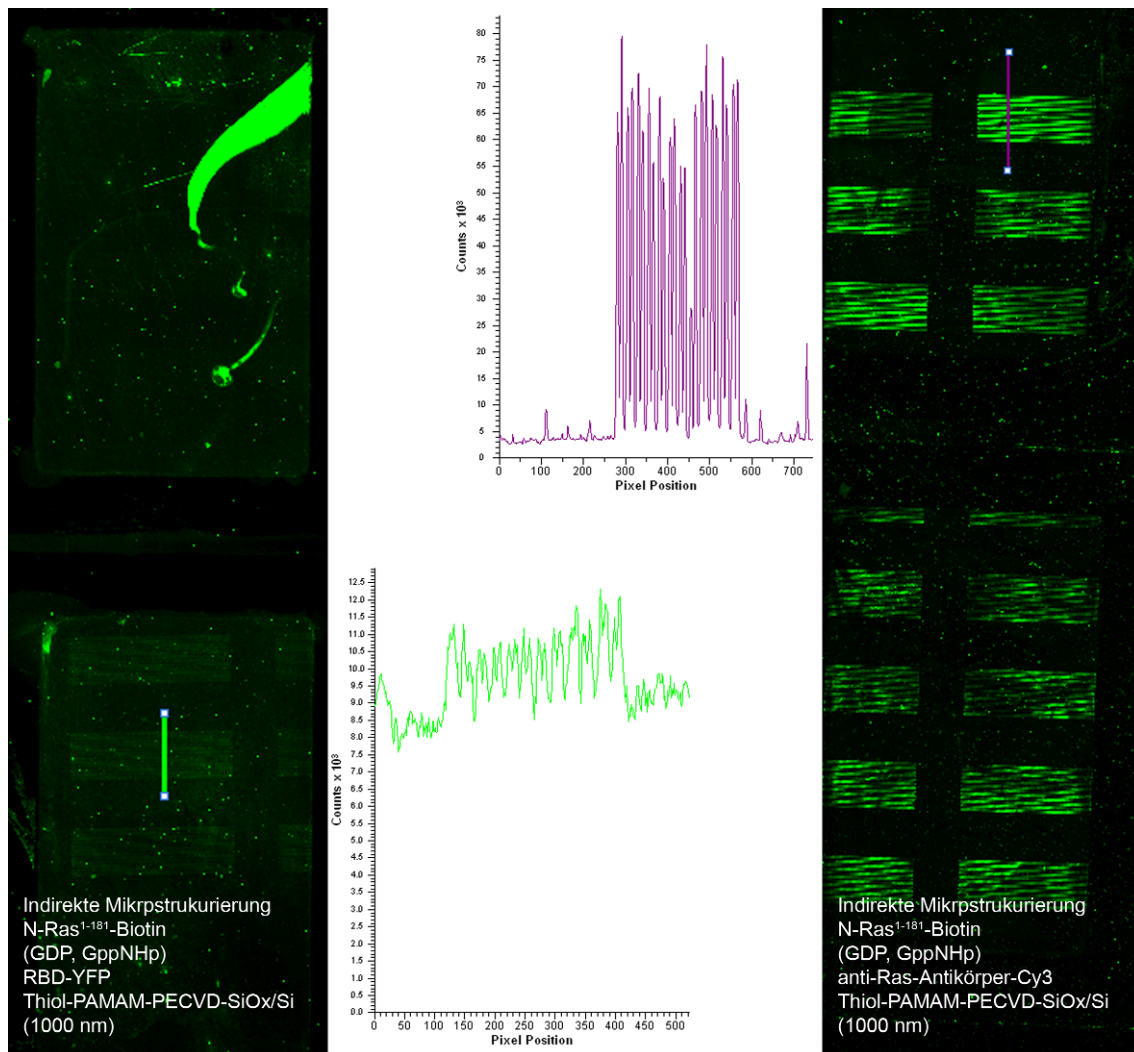


Abbildung A15: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.4.5.

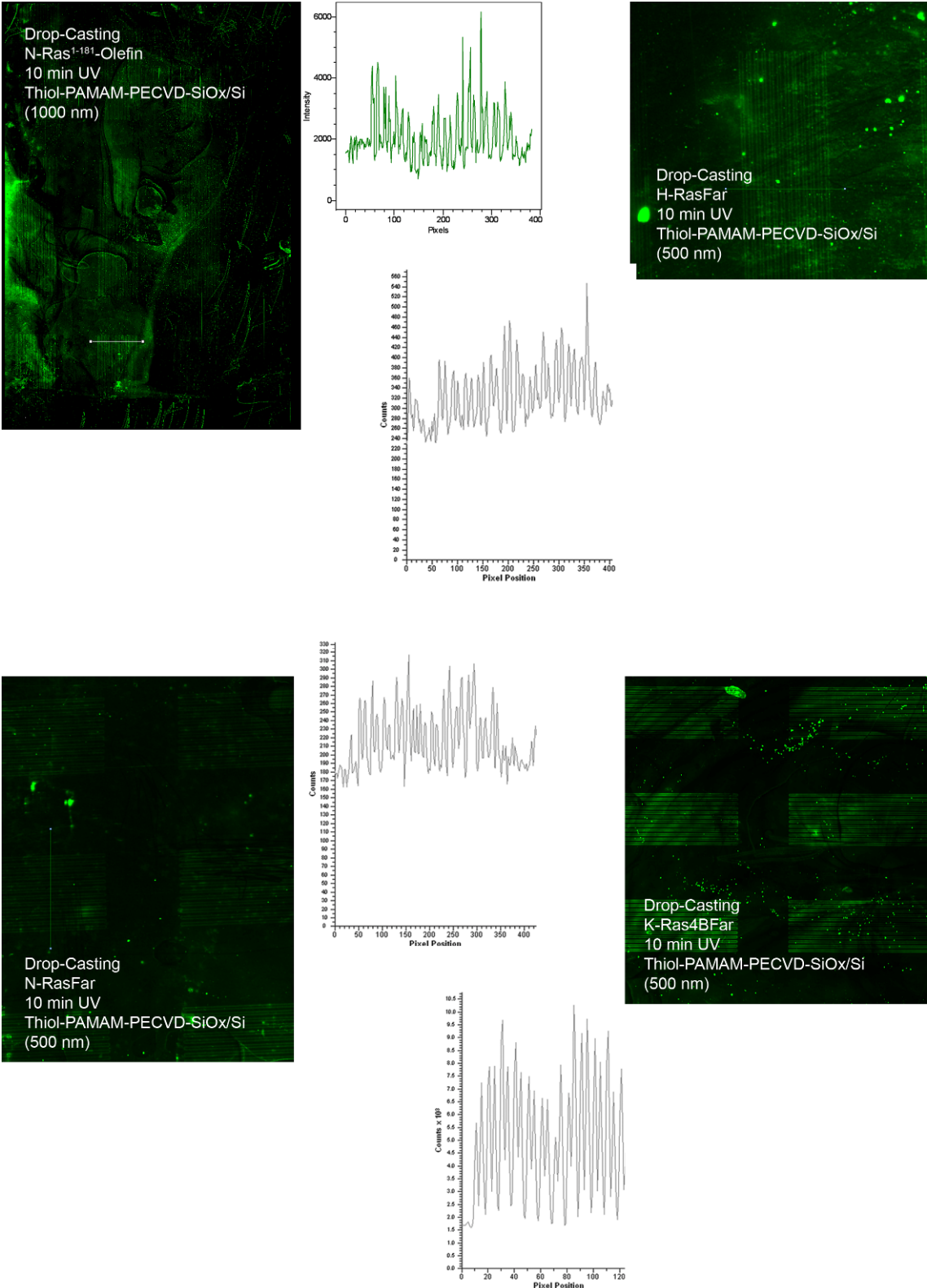


Abbildung A16: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.5.1 und AV 5.3.5.2.

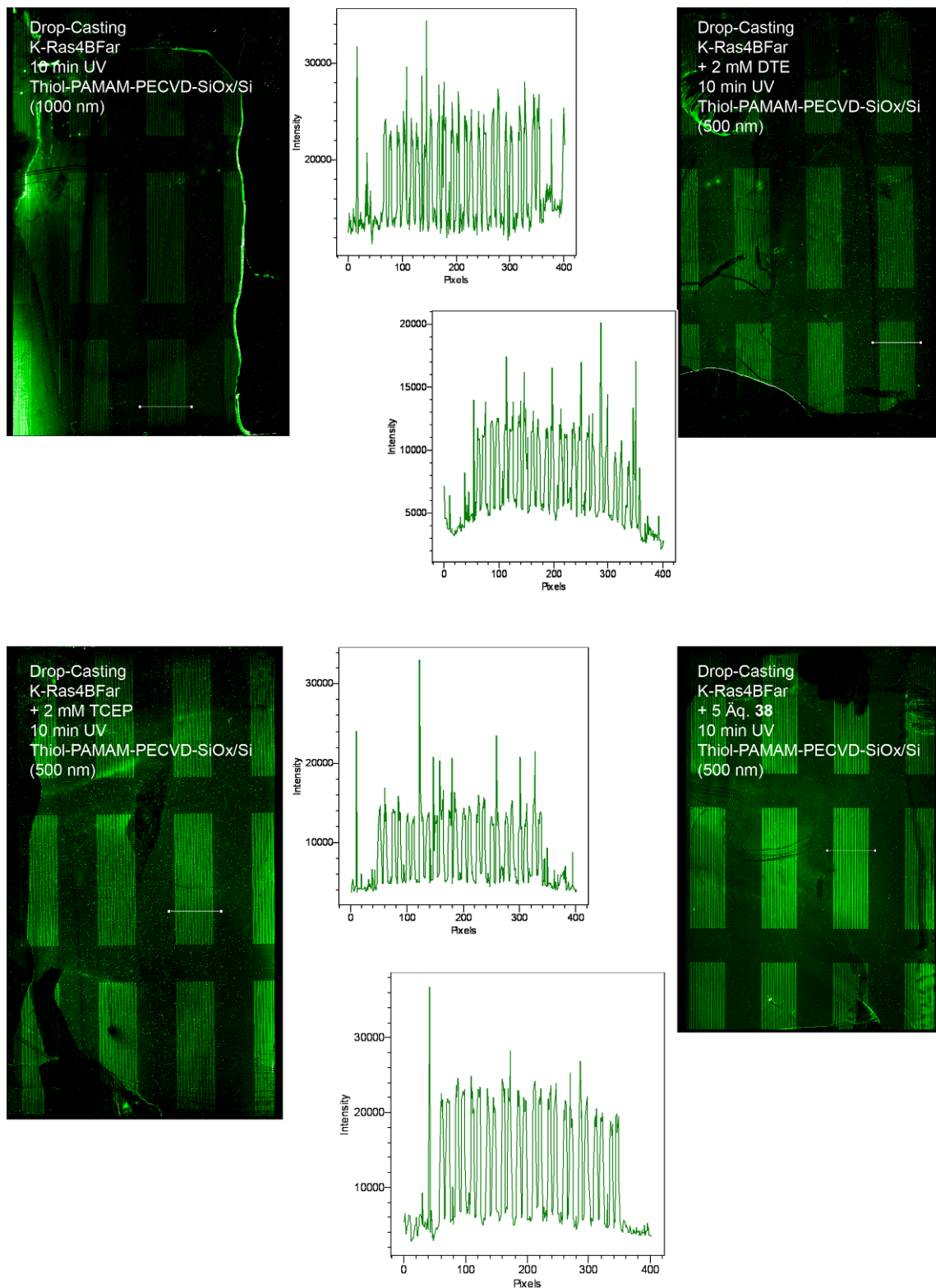


Abbildung A17: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.5.4.

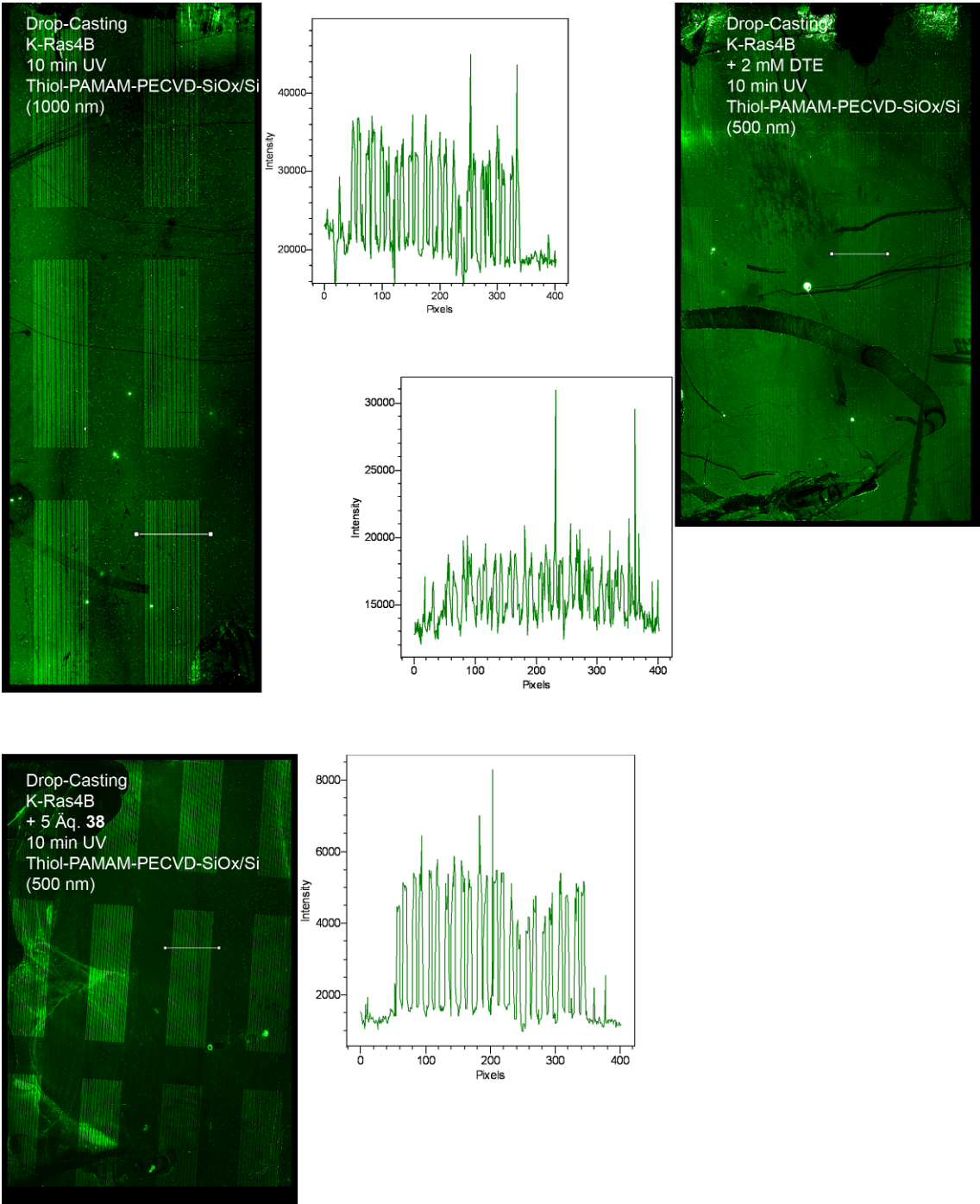


Abbildung A18: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.5.4 (Fortsetzung).

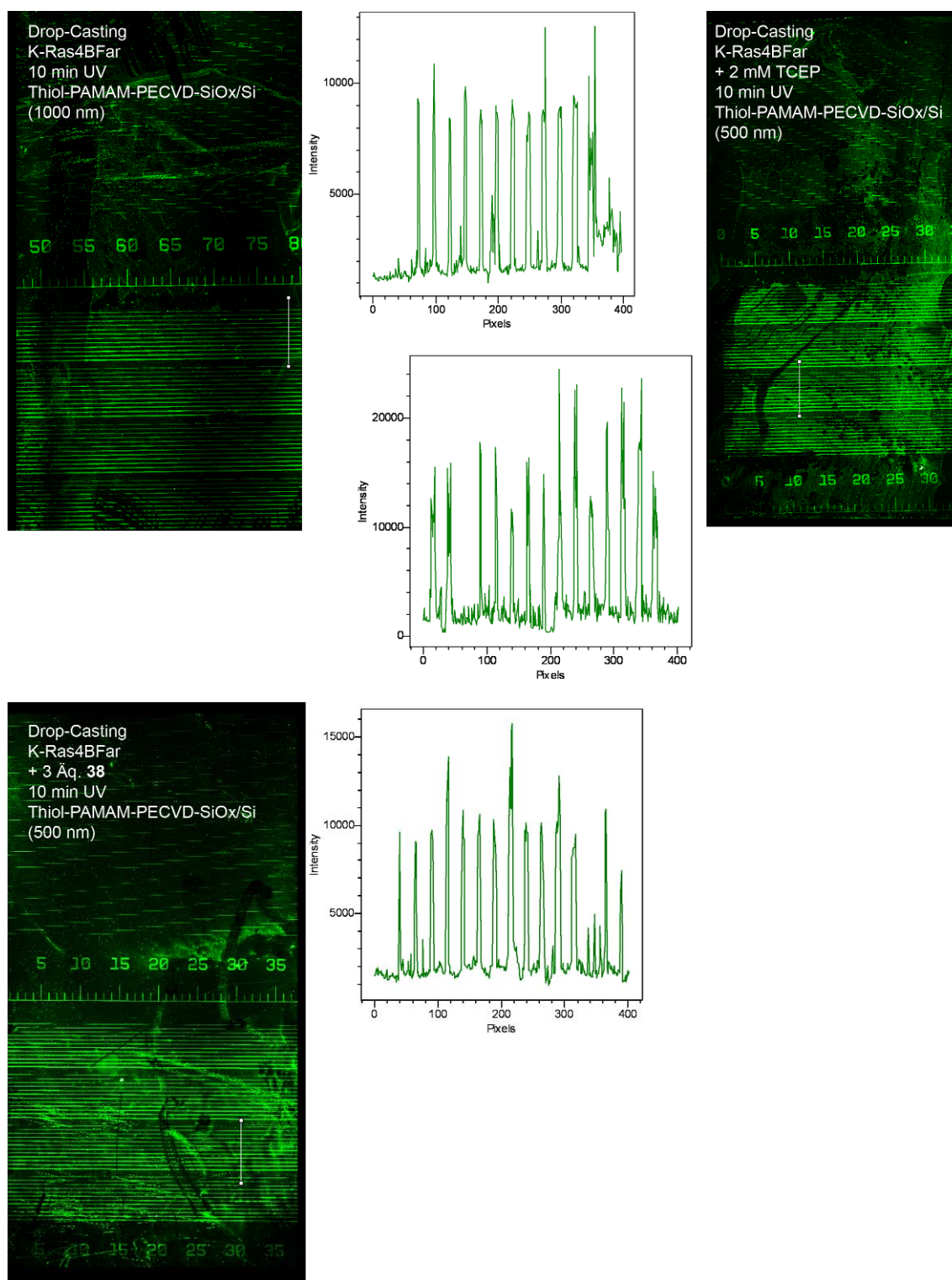


Abbildung A19: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.5.4 (Fortsetzung).

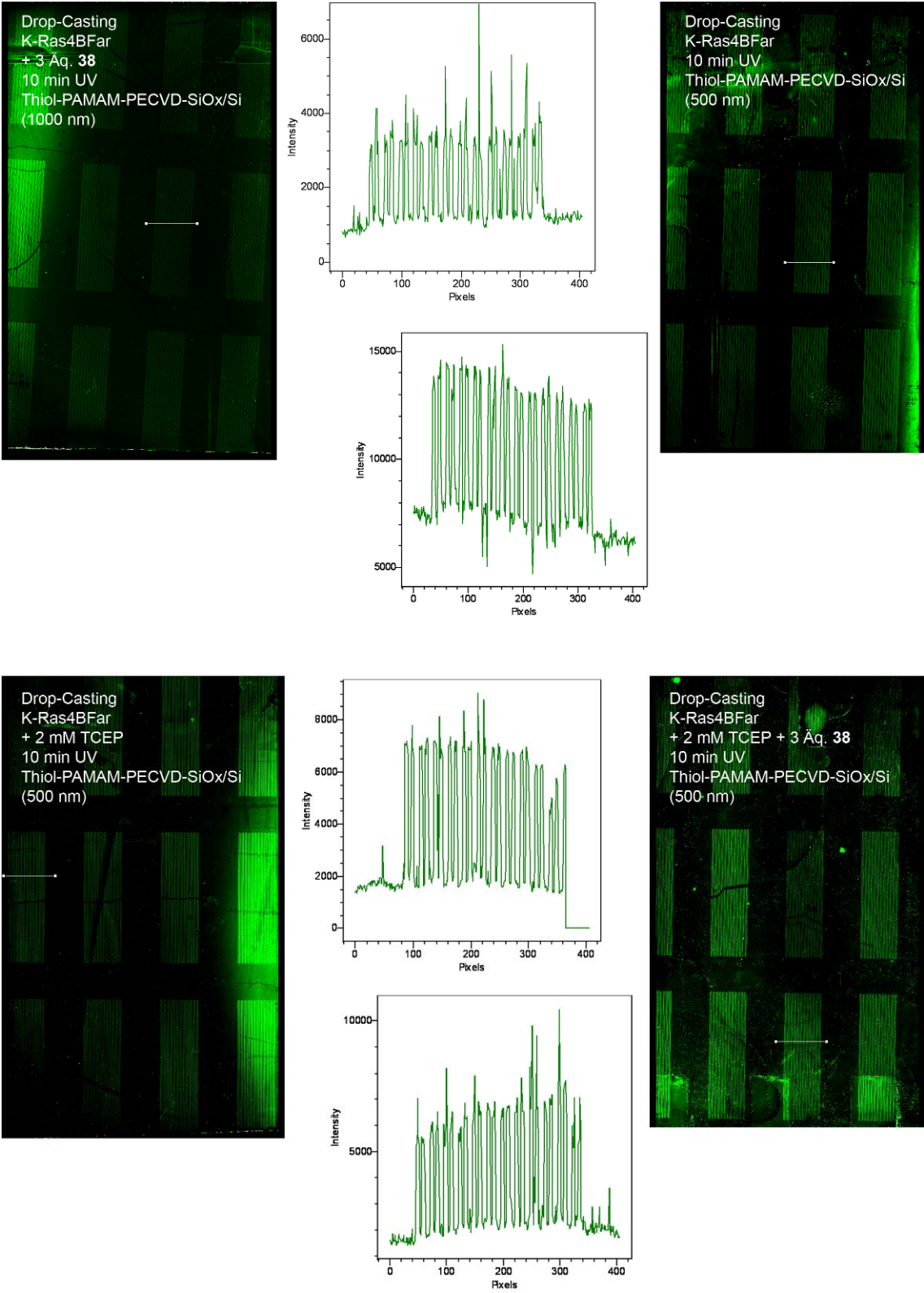


Abbildung A20: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.5.4 (Fortsetzung).

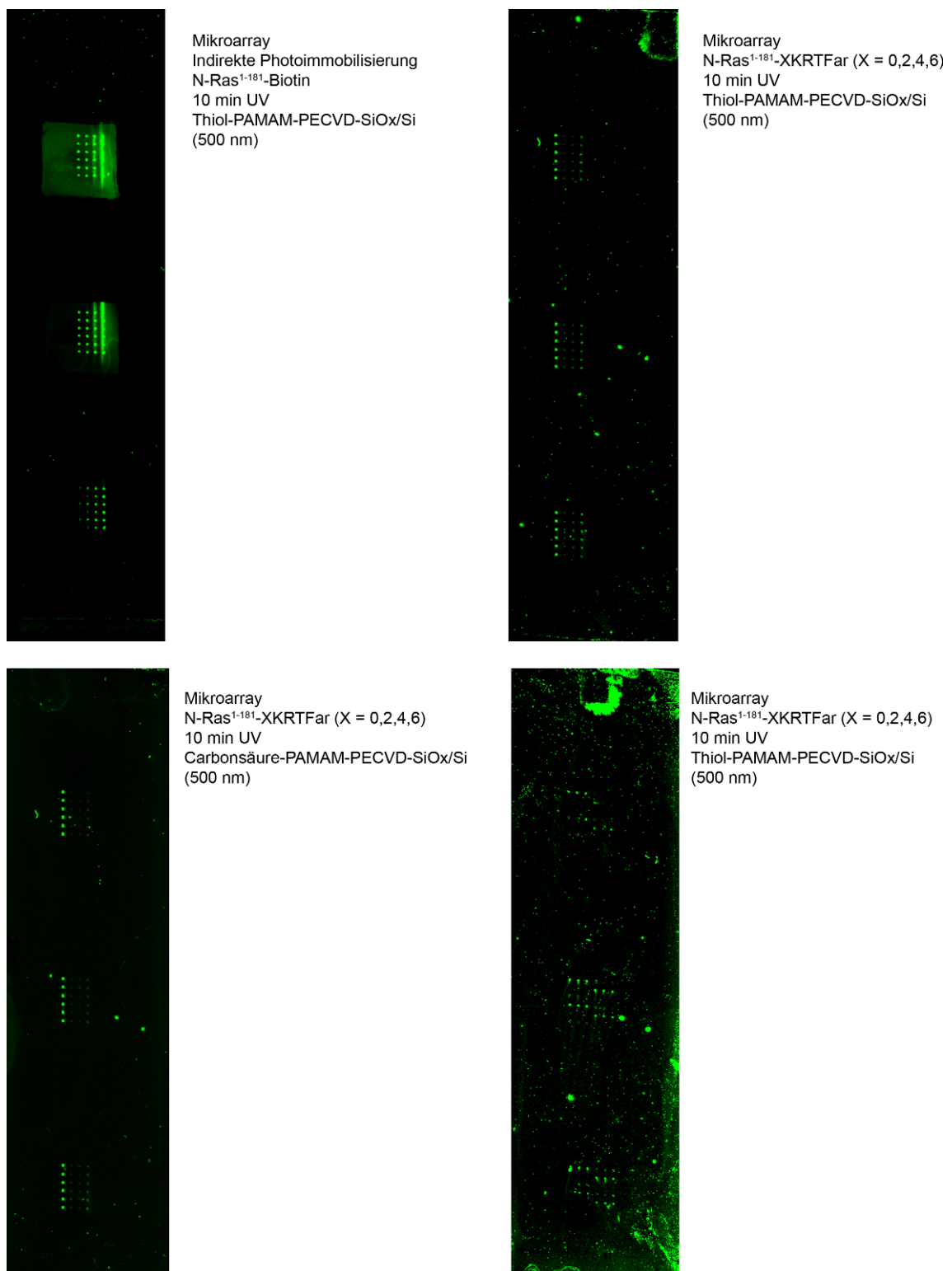
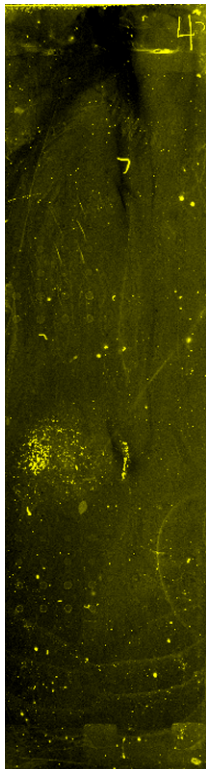
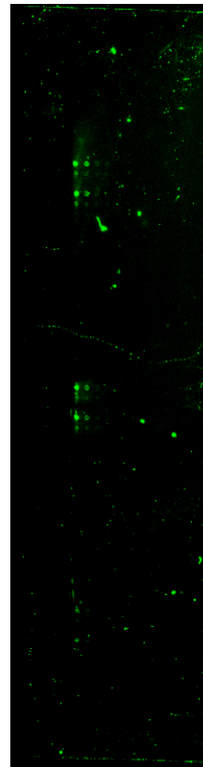


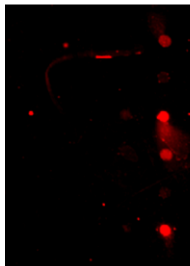
Abbildung A21: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.6.1 und AV 5.3.6.4.



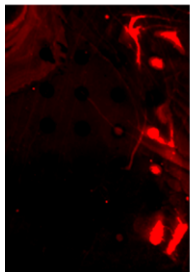
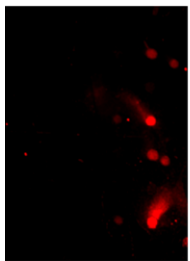
Mikroarray
N-Ras¹⁻¹⁸¹-6KRTFar
(GDP und GppNHp)
RBD-YFP
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiOx/Si
(500 nm)



Mikroarray
H6-mCherry-4KRTFar,
H6-mCherry-4KRT,
H6-mCherry
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiOx/Si
(500 nm)

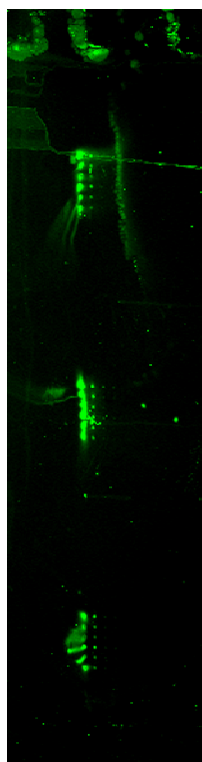


Mikroarray
Rab6A-6KRTFar,
Rab6A-6KRT,
Rab6A
EGFP-Bicaudal-D2
(0,089 μ M, 0,43 μ M, 2,2 μ M)
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiOx/Si
(500 nm)

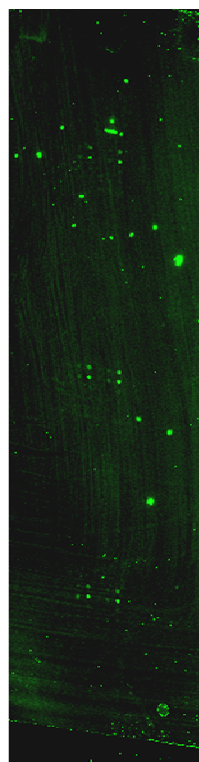


Mikroarray
H6-mCherry-4KRTFar,
H6-mCherry-4KRT
(pH 4,5, 6,3, 7,2, 8,2;
+ 500 mM LiCl)
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiOx/Si
(500 nm)

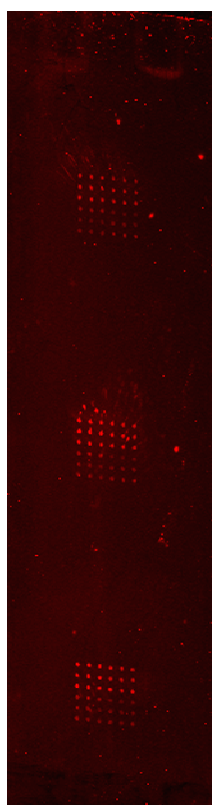
Abbildung A22: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.6.5, 5.3.6.10, 5.3.6.11, 5.3.6.12.



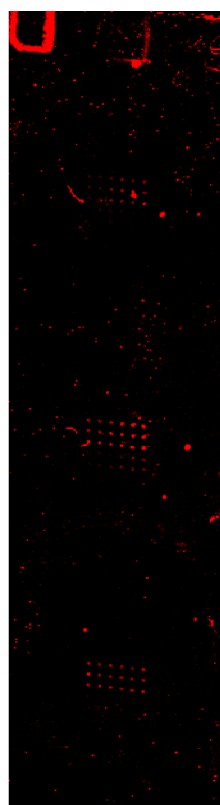
Mikroarray
Lysat von H6-mCherry-4KRT
(farnesyliert),
H6-mCherry-4KRTFar,
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiO_x/Si
(500 nm)



Mikroarray
Coexpressionslysat von
H6-mCherry-4KRT und FTase
(teilweise Zusatz Fpp, FTase)
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiO_x/Si
(500 nm)



Mikroarray
Coexpressionslysat von
H6-mCherry-4KRT und FTase,
Lysat von H6-mCherry-4KRT
(teilweise Zusatz DTT, TCEP,
38)
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiO_x/Si
(500 nm, langer Linker)



Mikroarray
Coexpressionslysat von
H6-mCherry-4KRT und FTase,
Lysat von H6-mCherry-4KRT
+ 10 mM DTT
10 min UV
Thiol-PAMAM-PECVD-SiO_x/Si
(500 nm, langer Linker)

Abbildung A23: Fluoreszenzaufnahmen zu AV 5.3.7.3, 5.3.7.5, 5.3.7.10.

Danksagungen

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung Vieler nicht möglich gewesen. Ihnen allen gilt mein sehr herzlicher Dank. Einige möchte ich an dieser Stelle explizit erwähnen.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die interessante Themenstellung, für die Bereitstellung einer ausgezeichneten Arbeitsumgebung sowie insbesondere für die Freiheit bei der Gestaltung dieses Projekts.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle außerdem bei Prof. Dr. Karola Rück-Braun, die mich über Jahre unterstützt hat und ohne die es nie zu meiner Promotion in Dortmund gekommen wäre.

Ferner danke ich unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Christof M. Niemeyer, Dr. Hendrik Schröder, Dr. Jürgen Kuhlmann, Silke Zimmermann, Dr. Leif Dehmelt, Prof. Dr. Joachim Spatz, Dr. Roberto Fiammengo und Ann-Kathrin Schmieder für die gute und produktive Zusammenarbeit sowie die vielen inspirierenden Diskussionen.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern des Mikroarrayteams der AG Waldmann, Dr. Maja Köhn, Dr. Marta Gutierrez, Dr. Thimmaiah Govindaraju, Dr. Po-Chiao Lin und Dr. Ulrika Westerlind. Vor allem gilt er aber Dr. Pascal Jonkheijm. Ohne unsere gemeinsame Freude an der Forschung und nicht zuletzt den Spaß neben der Arbeit hätte dieses Projekt weder die vielen Stolperfallen überwunden noch seinen jetzigen Erfolg erreicht.

Desweiteren möchte mich bei Dr. Kirill Alexandov und Prof. Dr. Roger Goody für die Möglichkeit der Einarbeitung in die Mikrobiologie bedanken. Ferner danke ich den Kollegen der AG Alexandrov, darunter besonders Dr. T. T. Uyen Nguyen, Dr. Aymelt Itzen, Stefan Schöbel, Nathalie Bleimling, Tina Rogowsky und Melina Terbeck für die freundliche Aufnahme in ihr Labor, die tolle Arbeitsatmosphäre und die stoische Beantwortung der vielen Fragen eines in der Mikrobiologie unbewanderten Chemikers. Melina Terbeck gilt zudem mein besonderer Dank für die geduldige Einarbeitung in das Handwerk eines Molekularbiologen.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern der Fakultät Elektrotechnik und Informationstechnik, darunter Uwe Tepe, Hans-Georg Scholz, Noël Meyer, Dr. Dirk Nüsse und Dr. Markus Flegler bedanken, die uns in Sachen Reinraum, Photolithographie und Mikrostrukturtechnik stets hilfreich zur Seite standen.

Besonderer Dank geht natürlich an meine Kollegen und Leidensgenossen der AG Waldmann für die gegenseitige Unterstützung, die immer hilfreichen Diskussionen und natürlich den Spaß neben der Arbeit, in und außerhalb des Instituts, der diese Mammutaufgabe erst erträglich gemacht hat und deshalb nie ganz außer Acht gelassen werden sollte. Ihr seid zu zahlreich, um Euch hier alle nennen zu können. Erwähnen möchte ich dennoch Sebastian Koch, Sebastian Schoof und Bernhard Ellinger für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit sowie Dr. Stefan Wetzel für die vielen hilfreichen Tipps. Mein Dank gilt außerdem unseren Angestellten,

darunter vor allem Evelyn Merten, Beate Schölermann und Dr. Petra Janning, für die oft übersehene Arbeit im Hintergrund und die vielen unschätzbaren Tipps.

Nicht in Worte zu fassender Dank gilt Maria für ihr unerschöpfliches Verständnis, ihre Unterstützung und ihre stetes Bemühen nach einem erfüllten Leben als Gegenpol zur Arbeit. Mein Dank gilt auch Familie Strominski/Woitoschek/Michalik sowie Benni, Friedrich und Carsten, durch die das Ruhrgebiet erst zu meiner zweiten Heimat wurde.

Zum Schluss geht mein tiefempfundener Dank an meine Eltern. Durch Eure rückhaltlose Unterstützung und Aufopferung über so viele Jahre wurde diese Arbeit überhaupt erst möglich.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund,

Dirk Weinrich