

Abschlußbericht zu

FKZ 2396: „Erhöhung der Komplexität von Peptid-Bibliotheken“

Kurzbeschreibung des Vorhabens

Ziel des Vorhabens ist die Fertigung hochkomplexer Peptidarrays unter Zuhilfenahme der Laserdrucktechnik (Xerographie) und der Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield. Zu diesem Zweck werden sogenannte Aminosäure-Tonerpartikel im Mikrometermaßstab entwickelt, die aktivierte Fmoc-Aminosäuren in einer bei Raumtemperatur festen Matrix enthalten. Durch ortsgenaues Aufbringen und anschließendes Schmelzen der Partikel auf einem Träger werden die aktivierten Fmoc-Aminosäuren freigesetzt. Das ursprünglich feste Matrixmaterial fungiert dabei nach dem Schmelzen als geeignetes Lösungsmittel für die Peptidsynthese. Ein Schwerpunkt der Arbeiten ist daher die Optimierung der Tonerpartikel hinsichtlich Zusammensetzung, Größe bzw. Größenverteilung und ihrer Ladungseigenschaften. Weiterhin werden geeignete derivatisierbare Trägermaterialien (Papier, Kunststoff-Folien, Glas) untersucht, die sowohl eine optimierte Festphasen-Peptidsynthese erlauben, als auch mit einem parallel entwickelten Peptidlaserdrucker handhabbar sind.

Ergebnisse

1. Partikelherstellung

Die Wahl des Aminosäure-Derivats als wichtigster Bestandteil des Aminosäuretoners fiel auf die Fmoc-geschützten Aminosäure-Pentafluorphenylester (OPfp-Ester). Ein entscheidender Vorteil dieser kommerziell erhältlichen Substanzen liegt in der Voraktivierung des C-Terminus` durch die gute Pentafluorphenol-Abgangsgruppe. Dadurch ist gewährleistet, daß die Anzahl an Tonerbestandteilen durch den Wegfall von üblichen Aktivierungsreagenzien für die Peptidsynthese möglichst gering gehalten wird. Je mehr Bestandteile ein Toner enthält, desto schwieriger ist dessen Anpassung an die Anforderungen des dazugehörigen Laserdruckers.

Die Aminosäure-Tonerpartikel enthalten neben den voraktivierten Aminosäuren das Lösungsmittel für die spätere chemische Umsetzung in fester Form (Diphenylsulfoxid, DPSO) sowie Additive, die eine triboelektrische Aufladung der Partikel in der Tonerkartusche gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere „charge control agents“ (CCAs). Die Generierung von Monomerpartikeln im Mikrometermaßstab mit einer möglichst engen Größenverteilung wurde mit Hilfe einer Luftstrahlmühle durchgeführt.

Es konnten dabei mit allen zwanzig proteinogenen L-Aminosäuren aus dessen Fmoc- und Seitengruppen-geschützten OPfp-Estern Tonerpartikel unter Zusatz eines „festen“ Lösungsmittels (DPSO)

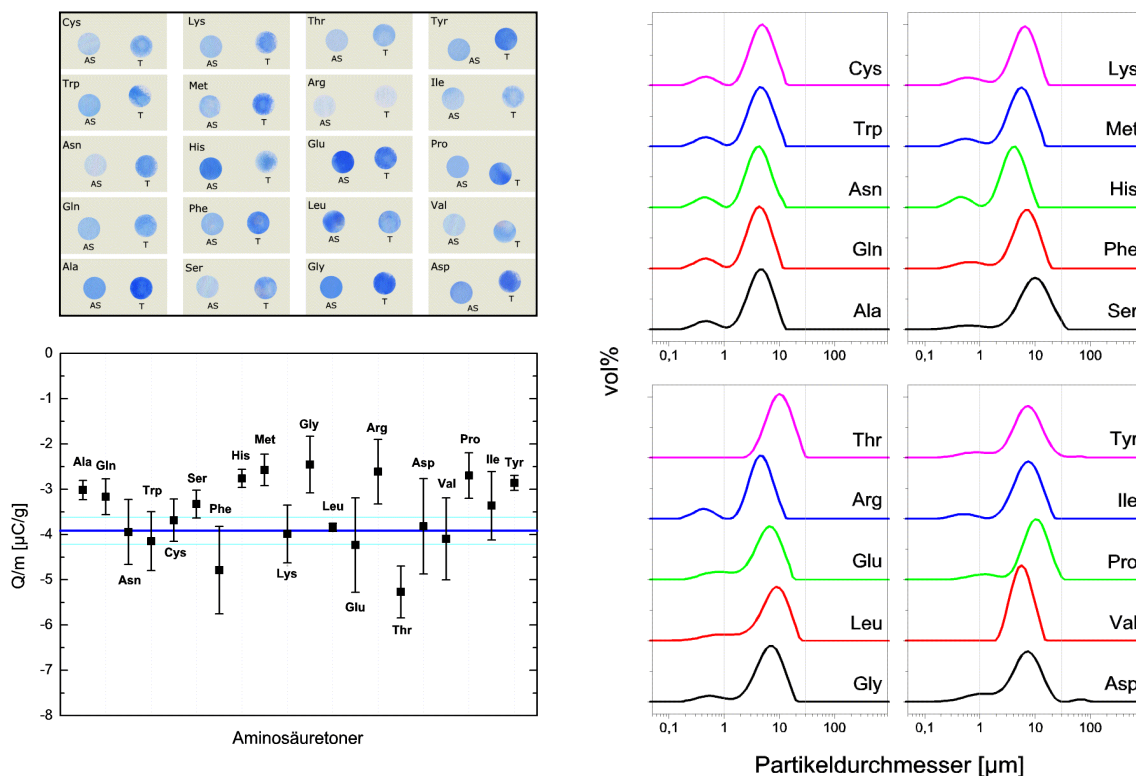


Abb. 1 Übersicht über die Kopplungsfähigkeit der Aminosäuretoner (T) und Aminosäure-OPfp/DPSO-Mischungen (AS) durch Anfärben entschützter Aminogruppen mit Bromphenolblau nach erfolgter Kopplung (links oben); Größenverteilung der zwanzig Aminosäure-Tonerpartikel (rechts); Q/m-Verhältnis der Aminosäuretoner mit dem Eisen(III)-Komplex als CCA in Relation zum OKI-Toner (links unten)

und üblicher Tonerbestandteile (CCA, Harze) hergestellt und charakterisiert werden. Die Toner stimmen in ihrer Größenverteilung und Ladungseigenschaften mit ihrem Vorbild, dem Farbtoner eines OKI-Vierfarb-Laserdruckers (\varnothing ca. 9 μm ; $Q/m = -3,92 \mu\text{C/g}$), gut bis sehr gut überein (Abbildung 1, rechts bzw. links unten). Außerdem erlauben sie die Freisetzung der Aminosäure beim Schmelzen und deren Kopplung an den aminoterminierten Träger (Abbildung 1, links oben).

Die gegenüber der Peptidsynthese inerten, ladungsgebenden Additive (CCAs) müssen mangels geeigneter, kommerziell verfügbarer Produkte selbst synthetisch hergestellt werden. Für diese Zwecke haben sich nach eingehender Literatur- und Patentrecherche mit einem Fe(III)-naphthonsäurekomplex und einem Al(III)-Azokomplex zwei verschiedene, metallorganische Komplexe als geeignet erwiesen^a (Abbildung 2).

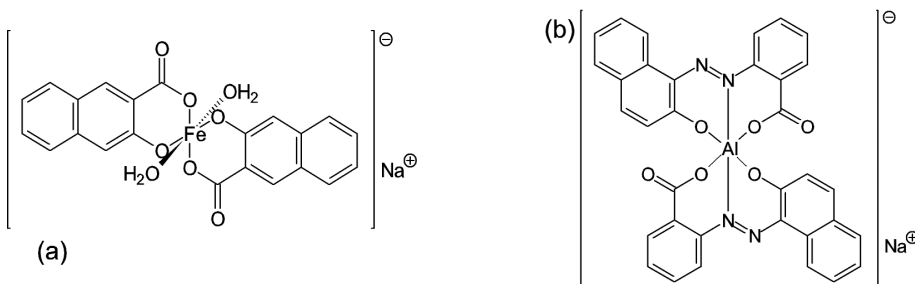


Abb. 2 Synthetisierte CCAs: Natrium-diaquobis(3-hydroxy-2-naphthonsäure)ferrat(III) (a) und Natrium-bis[2-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzoessäure]aluminat(III) (b) für den Einsatz als ladungsgebende Additive

Diese wurden synthetisiert und mittels gängiger Methoden (NMR-Spektroskopie, Massenspektroskopie) charakterisiert.

2. Trägerentwicklung und Oberflächenchemie^b

Eigene Versuche an derivatisierten Zellulosemembranen und an Laserdruckerfolien ergaben, daß diese Materialien den verwendeten Reagenzien während der Peptidsynthese (Wasch- und Entschützungszyklen) und den Temperaturschwankungen im Laserdruckprozeß (Hitze zum Schmelzen der Aminosäuretoner) nicht in ausreichendem Maße standhalten. Es war daher naheliegend, chemisch inertes und mechanisch stabileres Glas als Trägermaterial zu verwenden, welches zudem noch über eine geringe Eigenfluoreszenz verfügt. Das Glas soll durch den Einsatz wasserlöslicher, graftpolymerisierter Poly(ethylglykol)-methacrylate (PEGMA) weitgehend resistent gegenüber einer unspezifischen Adsorption von Proteinen auf dem Träger sein und somit zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis beitragen. Das dabei erzeugte dreidimensionale Acrylatpolymer stellt zudem eine hohe Funktionalitätsdichte der reaktiven Gruppen für die sich anschließende Peptidsynthese sicher.

Die Präparationsschritte (Abbildung 3) zur Erzeugung solch eines Glasträgers sind: **1.** Die Silanisierung der Glasoberfläche, **2.** die Ozonisierung dieser Silanmonoschicht zur Einführung reaktiver Hydroperoxidgruppen, **3.** eine UV-induzierte Graftpolymerisation und **4.** schließlich die Anbindung von β -Alanin zum Einfügen von primären Aminogruppen zur Peptidsynthese. Die Untersuchung und gleichzeitige Optimierung der einzelnen Schritte erfolgte mittels XP- und IR-Spektroskopie bzw. Kontaktwinkelmessungen.

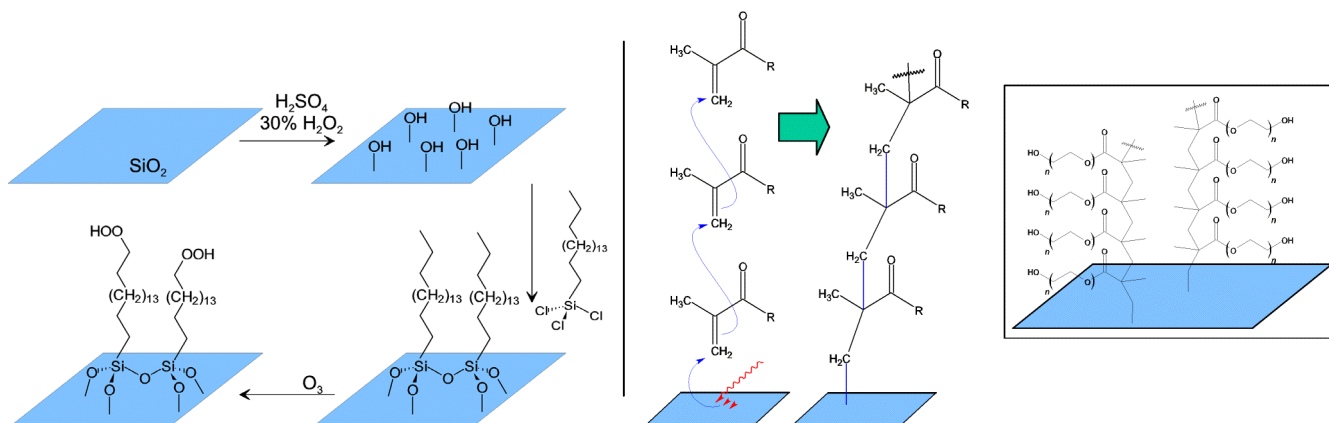


Abb. 3 Ozonisierung einer Octadecyltrichlorosilan-(C₁₈TCS)-Monoschicht auf Glas (links) und UV-induzierte Graftpolymerisation mit PEGMA₅ (rechts)

Bei der Silanisierung konnten besonders dicht gepackte Filme generiert werden, wenn das eingesetzte Alkylsilan möglichst reaktiv ist (Trichlorosilan), in geringer Konzentration in einem apolaren Lösungsmittel vorliegt (1 mM in Cyclohexan) und der Glasträger zuvor mit heißer „CAROScher Säure“ (H₂SO₄ : H₂O₂ 70:30) behandelt wurde.

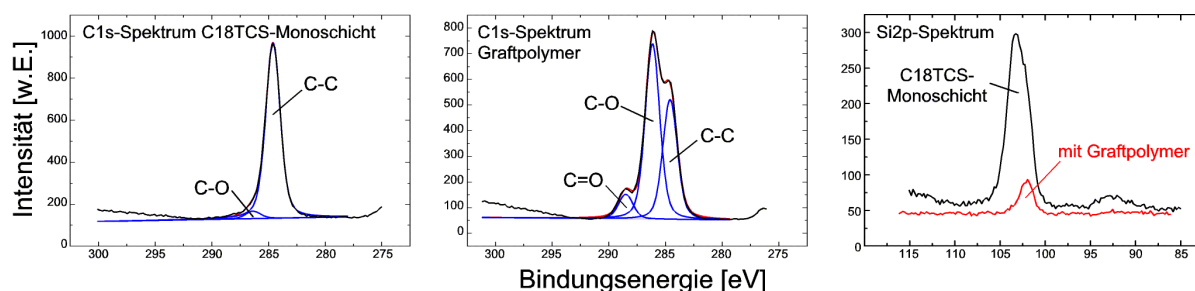


Abb. 4 C1s- und Si2p-Detailspektren vor und nach Graftpolymerisation

Abbildung 4 zeigt die C1s-XP-Detailspektren einer C₁₈TCS-Monoschicht vor und nach der Graftpolymerisation, wobei die starken Zunahmen der Signale bei 286,1 eV (für C-O-Gruppen) bzw. bei 288,4 eV (für Carboxygruppen) eindeutig dem Polymer zugeordnet werden können. Das Si2p-Signal nach Graftpolymerisation (**rot**) weist eine starke Abschwächung gegenüber der unbehandelten C₁₈TCS-Monoschicht (**schwarz**) auf, was auf eine Zunahme der Filmdicke auf dem Glasträger durch das Polymer zurückzuführen ist.

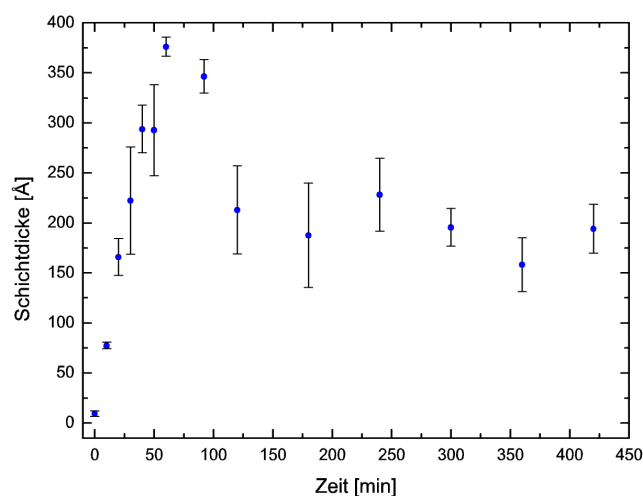


Abb. 5 Ellipsometrische Bestimmung der Dicke des Graftpolymerfilms in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer

Optimiert wurde die Graftpolymerisation hinsichtlich maximaler Schichtdicke unter Variation der Parameter Bestrahlungsdauer (Abbildung 5) und Monomerkonzentration. Beste Ergebnisse (ca. 37 nm Filmdicke) erhielt man nach einer ca. einstündigen Reaktionsdauer bei einer Monomerkonzentration von 5 v%. Höhere Konzentrationen führen zu einer nahezu kompletten Polymerisation der Reaktionslösung, erkennbar an der Ausbildung des

Homopolymers in Form einer geleeartigen Ablagerung auf der Glasoberfläche.

Die Einführung von primären Aminogruppen gelang standardmäßig durch eine Veresterung der OH-Gruppen mit Dicyclohexylcarbodiimid-(DCC)-aktiviertem Fmoc-β-Alanin in Anwesenheit von N-Methylimidazol (NMI) als Base. Die Aminogruppen wurden anschließend mit Piperidin in DMF entschützt. Durch Variation der Reaktionszeit lassen sich verschiedene Funktionalitätsdichten bis zu ca. 30 nmol/cm² erzeugen (Abbildung 6).

Ein derartig funktionalisierter Träger ist in der Lage, die unspezifische Adsorption von gelösten Proteinen zu verhindern. Erkennbar ist dies zum Beispiel an aufgenommenen Fluoreszenzmikroskopiebildern von Glasträgern, die vorher mit farbstoffmarkierten Proteinen (z.B. Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Fibrinogen, Abbildung

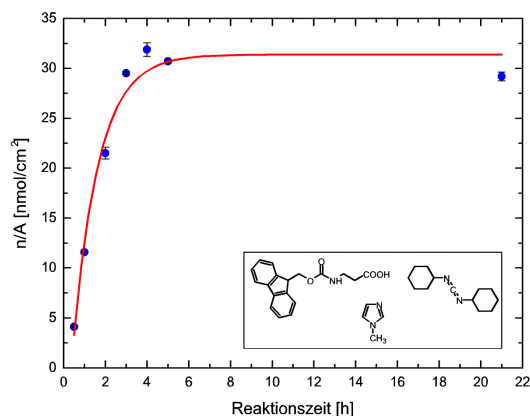


Abb. 6 Zeitlicher Verlauf der Veresterung von Fmoc-β-Alanin mit DCC/NMI an PEG-OH-Oberflächen

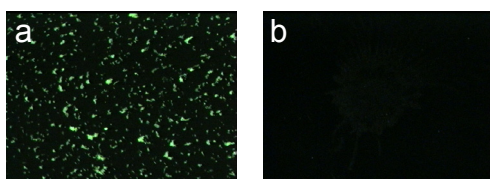


Abb. 7 Glasträger unbehandelt (a) und PEG-graftet (b) nach der Inkubation mit FITC-markiertem Fibrinogen

7) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) inkubiert wurden. Der unbehandelte Träger (7a) adsorbiert das Protein in zufällig angeordneten, grün fluoreszierenden Punkten unterschiedlicher Größe. Der PEG-graftete Glasträger zeigte keinerlei Fluoreszenzsignal (7b). Einen zuverlässigeren Befund liefern XP-Spektren von Trägern, die mit denselben, allerdings unmarkierten Proteinen in PBS-Puffer inkubiert wurden.

Abbildung 8 zeigt aufgenommene XP-Detail-spektren des Stickstoff-N1s-Signals von PEG-gegrafteten Glasoberflächen nach Inkubation mit unterschiedlichen Proteinlösungen (Lysozym, Fibrinogen, BSA und γ -Globulin; jeweils 2 mg/ml). Als Referenz diente unbehandeltes Glas nach Kontakt mit einer Fibrinogen-PBS-Lösung („Fibrinogen auf Glas“). Das Fehlen eines N1s-Signals für die PEG-gegrafteten Gläser ist ein eindeutiger Befund dafür, daß kein Protein auf dem Träger unspezifisch gebunden ist.

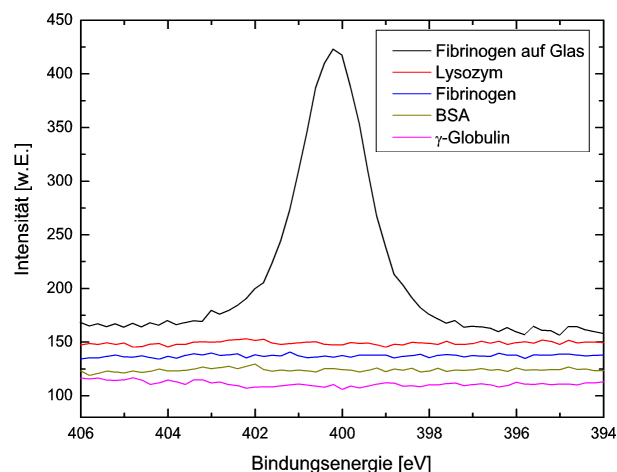


Abb. 8 N1s-XP-Detailspektren eines PEG-Graftpolymer auf Glas nach Inkubation mit unterschiedlichen Proteinen und einem Referenzspektrum (Fibrinogen auf Glas)

3. Aufbau und Leistungsfähigkeit des Peptidlaserdrucker-Prototyps

Der Peptidlaserdrucker zum Verdrucken der Aminosäuretoner wurde in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung (IPA) in Stuttgart entwickelt.^c Er ist eine Erweiterung eines kommerziell erhältlichen OKI-Vierfarb-LED-Druckers (Modell C7200) um weitere 16 auf insgesamt 20 Druckwerke. Ein Vorteil des in diesem Druckersystem verwendeten Tandemprinzips ist die lineare Anordnung der einzelnen Druckwerke, die sich durch überschaubaren technischen Aufwand erweitern läßt. Zudem erlaubt die planare Führung des Druckmediums den Einsatz starrer Trägermaterialien wie z.B. Glas, wenn man auf die Umkehrwalzen vor und nach der Tonerkartuschen-Einheit verzichtet.

Der Peptidlaserdrucker ist in eine Rahmenkonstruktion aus Aluminium integriert und ist vor Licht durch verschiebbare Seiten- und Deckenwände geschützt (Abbildung 9, links). Er besitzt einen Anschluß für Schutzgas, so daß der gesamte Druckprozeß in einer inerten Atmosphäre ablaufen kann. Die Tonerkartuschen sind hintereinander angeordnet und werden mechanisch durch eine Königswelle parallel angetrieben. Das zu bedruckende Trägermaterial läßt sich durch Unterdruck auf einem Probenschlitten mit Linearantrieb mikrometergenau über Anschläge positionieren. Der Schlitten besitzt einen Hochspannungsanschluß (1 bis 10 kV) und bewegt sich präzise auf einer mittigen Stahlschiene (Ab-

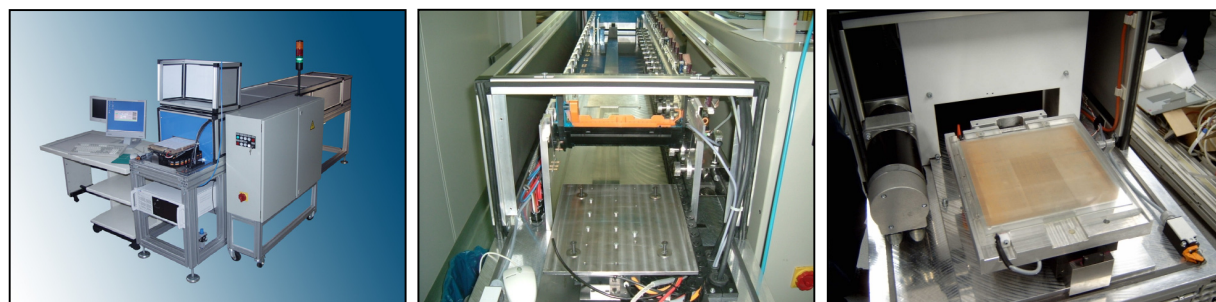


Abb. 9 Peptidlaserdrucker mit Schaltschrank, Probenschlitten, Signalampel und Bedienpult (links); Blick entlang der Druckstraße mit ausgebauten Tonerkartuschen (Mitte); Probenschlitten mit bedrucktem Glasträger (rechts)

bildung 9, Mitte) unter den einzelnen Kartuschen hinweg. Die Abweichung auf einer Länge von ungefähr 3 m beträgt dabei ca. 10 μm . Die Steuerung der LED-Zeilen der Druckwerke übernimmt ein sogenannter FPGA¹. Dieser ist notwendig, da durch die hohe Anzahl an ansteuerbaren LEDs pro Entwicklereinheit (ca. 10 000) große Datenmengen schnell verarbeitet und an die jeweilige, am Druckprozeß teilnehmende Tonerkartusche adressiert weitergeleitet werden müssen. Sonstige Steuerungsaufgaben, wie z.B. für die Spannungsversorgung der Netzteile, für die Schalter zur Positionsüberwachung des Probenschlittens etc. werden von PLC-Baugruppen² übernommen.

Momentan ist der Peptidlaserdrucker in der Lage, Punktraster in einer Auflösung von ca. 400 cm^{-2} zu drucken (Abbildung 10, rechts). Die Punkte haben dabei einen Durchmesser von 250 μm und sind zu den benachbarten Punkten innerhalb einer Zeile 500 μm (Mittelpunkt zu Mittelpunkt) entfernt. Ein kompletter Druckvorgang dauert ca. 70 Sekunden. Momentan laufen Optimierungsarbeiten dahinge-

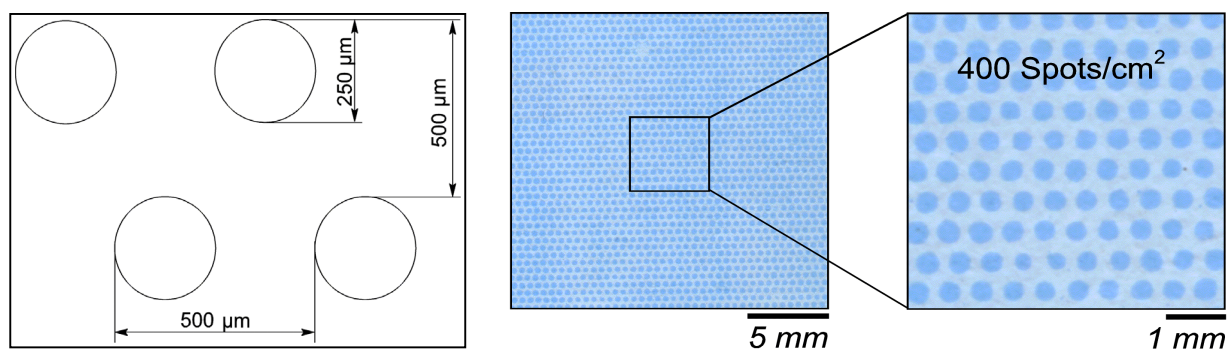


Abb. 10 Schematisches Druckmuster mit Durchmesser- und Abstandsmaßen (links); vergrößerte Ausschnitte aus einem mit Fmoc-Gly-OPfp-Toner bedruckten Glas nach Kopplung und Anfärben mit BPB (rechts)

hend, daß bei jedem Druckdurchlauf ein exaktes Übereinanderdrucken gewährleistet werden kann. Dazu müssen die einzelnen Druckwerke aufeinander abgestimmt bzw. ausgerichtet werden und eventuelle Abweichungen mechanisch oder mit Hilfe der Steuerungssoftware ausgeglichen werden. Die angeführte Auflösung soll durch weitere Verkleinerung der Druckpunkte und durch Reduzierung ihrer Abstände zueinander erhöht werden. Erkennbare theoretische Grenzen bei dieser Verbesserung sind zum einen die Größe der Tonerpartikel, die Größe der LEDs bzw. der durch sie erzeugten Lichtpunkte und zum anderen die erzielbare mechanische Genauigkeit.

4. Erzeugung eines 2-Peptid-Arrays im Schachbrettmuster mit dem Laserdrucker

Für einen ersten Test einer orts aufgelösten Peptidsynthese mit Aminosäuretonern wurden zwei unterschiedliche Peptidepitope (YPYDVPDYA und DYKDDDDK) aus Tonerpartikeln aufgebaut, die vorher mit einem herkömmlichen OKI-Laserdrucker auf einer Laserdruckerfolie ausgedruckt und anschließend auf einen derivatisierten Glasträger positionsgenau transferiert wurden. Nach den Standardsynthese- und Entschützungs-schritten wurden die Peptide nacheinander mit den spezifischen Erst- und den fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern inkubiert und indirekt nachgewiesen (Abbildung 11). Die

¹ FPGA: field programmable gate array; ein frei programmierbarer Logikschaltkreis mit hoher Rechenkapazität; Die auszuführenden Operationen erfolgen parallel.

² PLC: programmable logic controller; eine speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) für Steuerungs- und Regelungsaufgaben in der Automatisierungstechnik

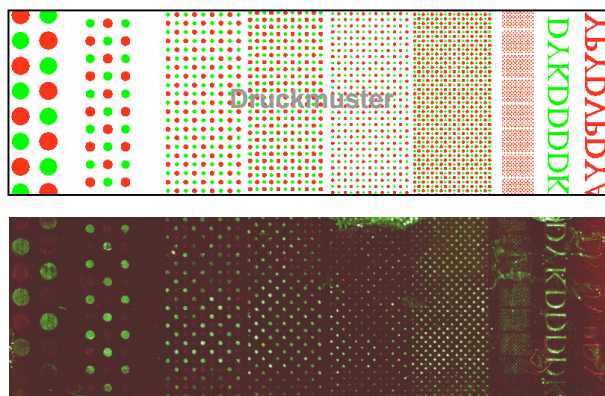


Abb. 11 Druckmuster (oben) und nach Inkubation mit spezifischem Erst- und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper erhaltenes Bild (unten)

beobachteten schwächeren Fluoreszenzsignale für Epitop **YPYDVPDYA** könnten synthesebedingt (geringere durchschnittliche Kopplungseffizienz) oder durch die Transfermethode verursacht worden sein (geringere Übertragungsmenge während des Transports des Druckmusters von der Folie auf den Glasträger).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden proteinresistente Oberflächen durch eine Graftpolymerisation von Poly(ethylenglykol)methacrylat auf zuvor silanisierten und ozonisierten Glassubstraten erzeugt. Sie ermöglichen nach einer Aminoterminierung (z.B. mit β -Alanin: ca. $30 \text{ nmol}(\text{NH}_2)/\text{cm}^2$) die Spotsynthese von Peptiden mit dafür entwickelten und hinsichtlich Größenverteilung und Ladungseigenschaften optimierten Aminosäure-Tonerpartikeln. Auf die Glasoberflächen aufgebracht wurden diese Tonerpartikel mit einem modifizierten Laserdrucker in einer Auflösung von ca. 400 Spots pro Quadratzentimeter. Erste erfolgreiche Synthesen zweier unterschiedlicher Peptidepitope mit diesen festen Aminosäure-Tonerpartikeln konnten durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen werden.

Die nächsten Schritte werden die Optimierung der Druckgenauigkeit des Peptidlaserdruckers sowie die Erzeugung von Peptidarrays unter Verwendung aller zwanzig Aminosäuretoner beinhalten. Die dabei erwartete Zeit- und Kostenersparnis bei der Produktion derart hochkomplexer Peptidarrays im Gegensatz zu herkömmlichen Peptidsynthesen mit Spotrobotern ist offensichtlich. Mögliche Anwendungen sehen wir zunächst im Einsatz als Peptidbibliotheken zur Identifizierung von Antigenen bei bekannten Krankheitsbildern (z.B. Serumanalytik bei Infektions- oder Autoimmunkrankheiten).

^a Yoji, K.; Yukihiro, I.; Kazuhiro, I. US Patent 4,404,271A1, **1981**; Lycka, A.; Lustinec, D.; Holecck, J.; Nadvornik, M.; Holcapek, M. *Dyes and Pigments* **2001**, *50*, 203-209.
^b Beyer, M.; Felgenhauer, T.; Bischoff, R.; Breitling, F.; Stadler, V. *Biomaterials* **2006** (accepted).
^c Güttler, S. *VDI-Z* **2005**, *6*, 147-149.