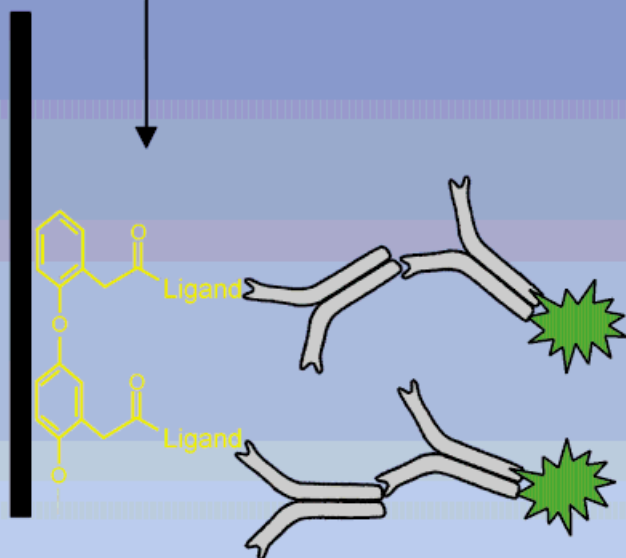
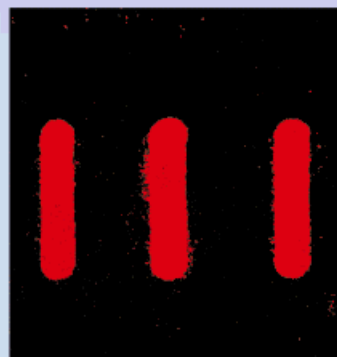
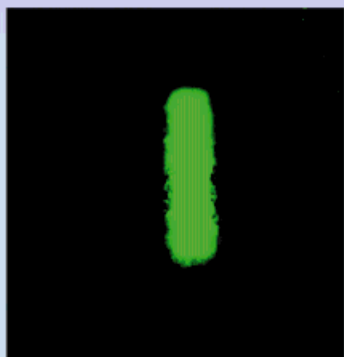


Eine innovative Methode zur orts aufgelösten Funktionalisierung ist die elektrochemische Polymerisation nach photolytischer Abspaltung einer Schutzgruppe.

+ 1.0 V



Fluoreszenzmarkierte Antikörper machen die Belegung sichtbar. Siehe folgende Seiten.



Ortsaufgelöste Immobilisierung von Peptiden durch elektrochemische Polymerisation nach photolytischer Abspaltung einer Schutzgruppe**

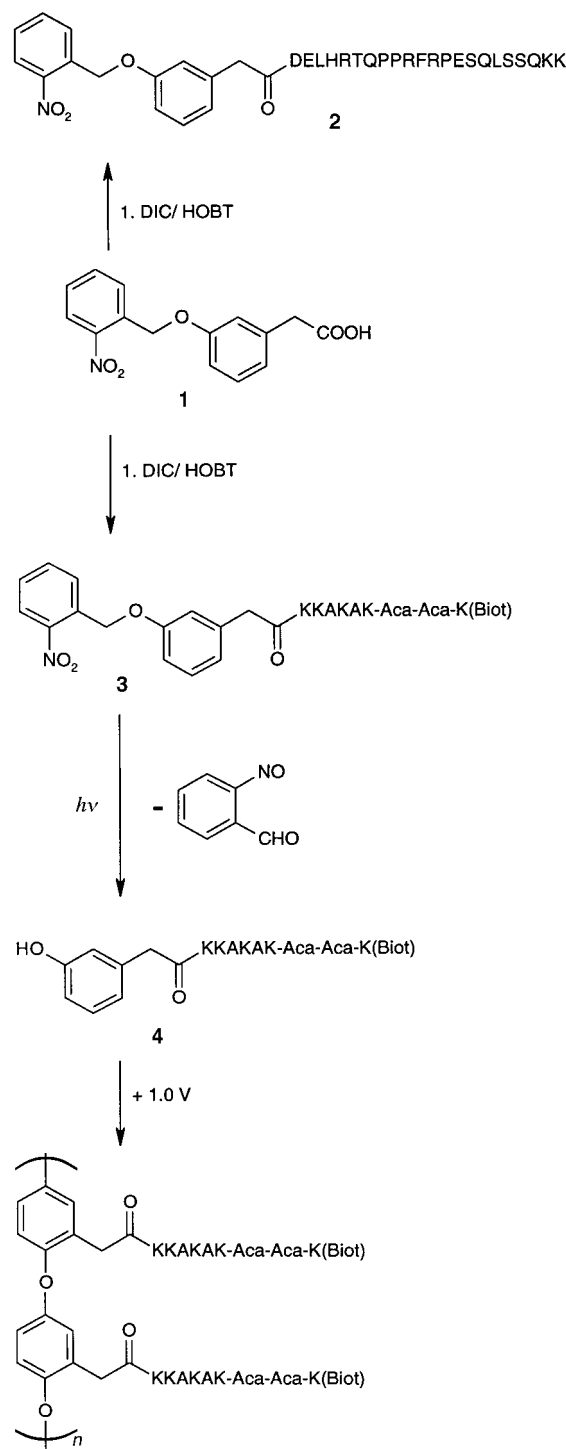
Dietmar Leipert, Peter Heiduschka, Jürgen Mack, Hans-Joachim Egelhaaf, Dieter Oelkrug und Günther Jung*

Biopolymermodifizierte Oberflächen finden Anwendungen in der Biosensorik, der Diagnostik, der Zellanbindung und der Nanotechnologie.^[1, 2] Die mikrostrukturierte Immobilisierung von Makromolekülen an festen Trägern gelingt mit der Photolithographie über photoaktivierbare Gruppen. Mit der Maskentechnik konnten z.B. Peptide und Nucleotide ortsaufgelöst auf einer Glasoberfläche synthetisiert werden.^[3] Mit photoaktivierbaren Benzophenonen, Diazirinen^[4] und Phenylazidderivaten^[5] wurden Proteine gezielt auf Oberflächen angebunden, oder photoaktive Gruppen wurden über selbstorganisierte Monolagen von Alkanthiolen auf Gold immobilisiert.^[6] „Caged“ Biotin, ein Biotinderivat, das Avidin nicht bindet, kann kovalent an ein Substrat gebunden und photochemisch über die Maskentechnik zu einer Bindung an Avidin angeregt werden.^[7] Morgan et al.^[2] immobilisierten Avidin auf ein mit Thiolgruppen bedecktes Goldsubstrat und inkubierten es mit Photobiotin (einem Nitroarylazidderivat von Biotin). Mit der Photolithographie wurde das Photobiotin für die kovalente Anbindung von Antikörpern aktiviert. Auf dem gleichen Prinzip beruht die direkte Anbindung von Photobiotin auf ein Kohlenstoffsubstrat.^[1]

Wir berichten hier über eine neuartige, allgemein anwendbare Methode zur Immobilisierung von Antikörpern, Rezeptoren, Makromolekülen und niedermolekularen Verbindungen an lichtadressierbare Orte eines leitfähigen Substrates. Dazu kombinieren wir photolithographische Techniken mit der Elektropolymerisation eines Biopolymers auf einer leitfähigen Oberfläche. In vorangehenden Arbeiten haben wir gezeigt, daß Peptide mit N-terminaler 3-Hydroxyphenyllessigsäure (HPA) anodisch über diese Phenolgruppe polymerisiert werden können und dann fest auf der Oberfläche haften.^[8] Die Peptidfunktionalisierung der Oberflächen von Glaskohlenstoffelektroden (GCE) und Platinelektroden wurde durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen.^[8] Besonders vorteilhaft ist dabei, daß keine weiteren Reagentien notwendig sind und die Polymerisation

nur vom angelegten Potential und vom Elektrolyten abhängig ist.

Das Innovative des neuen Verfahrens liegt darin, durch Einsatz der 2-Nitrobenzyl(Nbz)-Gruppe (Schema 1) die phenolische Hydroxygruppe gegen oxidative Polymerisation temporär zu schützen und nur nach Belichtung polymerisierbare Monomere freizusetzen. Nbz ist selektiv photolytisch abspaltbar, chemisch inert, genügt den Bedingungen der



Schema 1. Synthese der Nbz-HPA-Peptide **2** und **3** sowie photolytische Entschützung von **3** zu **4** und dessen elektrooxidative Polymerisation. Aca = 6-Aminocapronsäure.

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Chem. D. Leipert, Dipl.-Chem. J. Mack
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Fax: (+49) 7071-29-6925
E-mail: Guenther.Jung@uni-tuebingen.de

Dr. P. Heiduschka
Augenklinik der Universität
Abt. für Experimentelle Ophthalmologie
Domagkstraße 15, D-48149 Münster
Prof. Dr. D. Oelkrug, Dr. H.-J. Egelhaaf
Institut für Physikalische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (Projekt 0310853) gefördert. Herrn E. Braun danken wir für die Herstellung der Flußzelle.

Festphasensynthese und wurde zur Maskierung von Tyrosin verwendet.^[9, 10] Die Peptidsequenzen werden in Automaten zur multiplen Synthese an fester Phase synthetisiert und im letzten Schritt mit der photolabil geschützten 3-Hydroxyphenyllessigsäure (Nbz-HPA) **1**^[11] N-terminal gekuppelt.

Um die orts aufgelöste elektrochemische Polymerisation zu verwirklichen, wurde eine elektrochemische Flußzelle konstruiert (Abb. 1). Die Lösung der Nbz-geschützten Peptide **2**

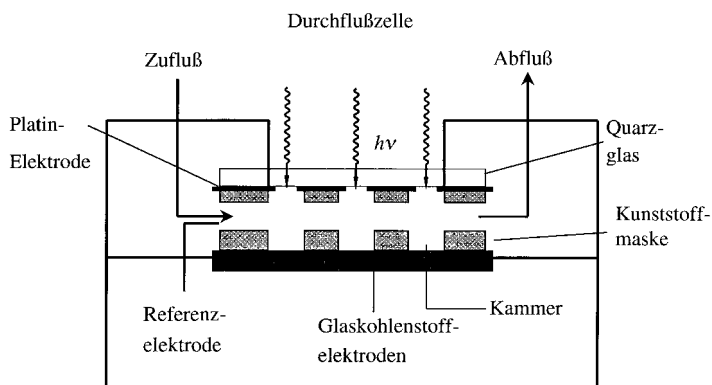


Abb. 1. Durchflußzelle für die orts aufgelöste Elektropolymerisation nach photolytischer Abspaltung der Nbz-Schutzgruppe. Die einzelnen Kammern haben eine Breite von 250 µm.

und **3** wird durch Spülen in die Kammern einer Kunststoffmaske gefüllt, durch die die Diffusion des entschützten Monomers in angrenzende Bereiche verhindert wird. Durch Aussparungen in der Platingenelektrode wird festgelegt, welche Kammern belichtet werden. An die GCE wird ein Potential von 1.0 V angelegt. Der Ablauf des Prozesses ist in Abbildung 2 dargestellt: Das mit einer photolabilen Schutzgruppe versehene Nbz-HPA-Peptid **2** befindet sich zwischen beiden Elektroden. Durch unterschiedliche Aussparungen in

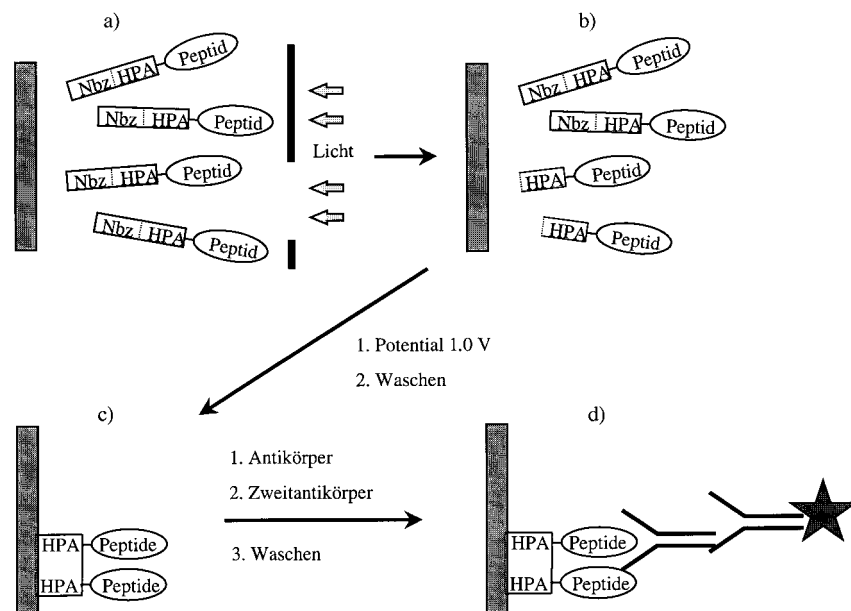


Abb. 2. Orts aufgelöste Immobilisierung von Antikörpern durch Elektropolymerisation. a, b) Die photolabile Nbz-Gruppe wird gezielt entschützt. c) Das Anlegen des Potentials von 1.0 V führt zur Elektropolymerisation der HPA-Peptide. d) Erkennung der orts aufgelöst immobilisierten Peptide über Anti-Peptid-Antikörper und fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper.

den Platinelektroden lassen sich die Kammern einzeln belichten, um die Nbz-Schutzgruppe abzuspalten. Wird ein konstantes Potential von 1.0 V angelegt, so kann das entschützte HPA-Peptid elektrochemisch an der GCE über die HPA-Gruppe polymerisiert werden.

Die orts aufgelöste Immobilisierung von **2** wird durch aufeinanderfolgende Inkubation mit Anti-Peptid-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Abb. 3). Für das

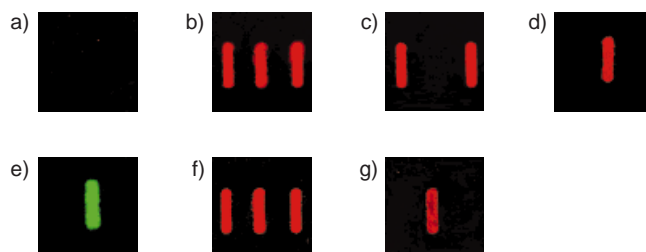


Abb. 3. Orts aufgelöste Immobilisierung von Peptiden auf einer GCE durch Elektropolymerisation. Die Kammern der Durchflußzelle wurden mit Lösungen der Nbz-HPA-Peptide **2** und **3** gefüllt, 5 min ein Potential von 1.0 V angelegt und die einzelnen Kammern (250 µm × 1200 µm) entsprechend dem gewünschten Muster 1 min mit UV-Licht bestrahlt (280 nm, 13 W cm⁻²). Die elektropolymerisierte Schicht wurde durch fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Streptavidin unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Ohne Belichtung ist keine Immobilisierung auf der Elektrode nachzuweisen (a). Photolytische Abspaltung der Nbz-Schutzgruppe und Elektropolymerisation von Peptid **4** mit unterschiedlichem Muster. Nachweis mit rhodaminmarkiertem Streptavidin (b, c, d) und mit fluoresceinmarkiertem Streptavidin (e). Lösung von **2** bei Belichtung aller drei Kammern bzw. der mittleren Kammer, Nachweis über Antikörper und rhodaminmarkierte Zweitantikörper (f, g).

biotinylierte Nbz-HPA-Peptid **3** konnte die orts aufgelöste Beschichtung mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen werden. Um die orts aufgelöste Elektropolymerisation

nachzuweisen, wurden die drei Kammern der Durchflußzelle mit Lösungen von **2** oder **3** gefüllt, 5 min ein Potential von 1.0 V angelegt und die jeweiligen Kammern je nach gewünschtem Muster 1 min mit UV-Licht bestrahlt. Die GCEs wurden mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin oder Antikörpern versetzt, nach 90 min gespült und getrocknet. Als Negativkontrolle wurde das Produkt **3** in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) in die Durchflußzelle gefüllt und eine Spannung angelegt (1.0 V, 5 min). Um zu zeigen, daß das geschützte Nbz-HPA-Peptid **3** elektrochemisch nicht polymerisierbar ist, wurden die nicht belichteten Kammern direkt mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde wie erwartet keine Beschichtung nachgewiesen (Abb. 3a). Die orts aufgelöste Beschichtung durch das HPA-Peptid **4** zeigt sich demgegenüber eindeutig in den Bereichen, wo mit Licht die Abspaltung der Schutzgruppe vom Nbz-HPA-Peptid in

den entsprechenden Kammern ausgelöst und die Elektropolymerisation ermöglicht wurde. Das Produkt **2** wurde ebenfalls ortsaufgelöst auf die GCE aufgebracht. Hierbei wurden zum einen alle drei Kammern (Abb. 3 f) und zum anderen Fall nur die mittlere Kammer belichtet (Abb. 3 g).

Wir können somit mit der Elektropolymerisation nach photolytischer Abspaltung der Nbz-Schutzgruppe ortsaufgelöst Peptide auf leitfähige Substrate aufbringen (Abb. 3). Die Kammern mit ihrer bisher erreichten Abmessung von 250 µm in einer Dimension sollen durch weitere Verfeinerung des Verfahrens miniaturisiert werden. Die Immobilisierung von Makromolekülen oder Chemorezeptoren kann zu einer Integration in analytische Routineverfahren führen. Außerdem ist ein Einsatz als Multianalyt-Sensor mit Fließinjektionssystem geplant. Insbesondere in der Chemosensorik im Verbund mit hochdiversen Cyclopeptidbibliotheken,^[12] die ebenfalls elektrochemisch immobilisiert werden können, bietet das Verfahren Möglichkeiten zur schnellen Analytik über eine Mustererkennung. Mit von Laminin abgeleiteten Peptiden, welche unter Erhaltung ihrer biologischen Funktion ebenfalls elektrochemisch polymerisierbar sind,^[13] ist die ortsaufgelöste Adhäsion von Nervenzellen und das Wachstum von Neuriten möglich.

Experimentelles

2, 3: Multiple parallele Peptidsynthesen (je 15 µmol) an Wang-Harz mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Aminosäuren und Diisopropylcarbodiimid(DIC)-Aktivierung. Produkt **1**^[11] (8.6 mg, 0.03 mmol) mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (4.6 mg, 0.03 mmol) in DMF (200 µL) wird mit 1.5 M DIC in DMF (20 µL, 0.03 mmol) 4 h gekuppelt.

Abspaltung vom Harz: 500 µL Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (95/2.5/2.5) (3 h), Nbz-HPA-Peptide mit Diethylether fällen, abzentrifugieren, in *tert*-Butylalkohol/Wasser (4/1) lösen und lyophilisieren. **2:** ESI-MS: *m/z*: 1467.7 [*M*+2H]²⁺; **3:** ESI-MS: *m/z*: 1523.6 [*M*+H].

Die photochemische Freisetzung von **3** wurde UV-spektroskopisch und HPL-chromatographisch untersucht. Zu Beginn der Reaktion liegen ein Absorptionsmaximum des Peptids bei 214 nm und eines der Schutzgruppe bei 275 nm vor. Im Laufe der Photoreaktion tritt ein weiteres Maximum der abgespaltenen Schutzgruppe bei 315 nm auf. Bereits nach 1 min ist das geschützte Peptid **3** zu 70% zerfallen und nach 5 min ist eine vollständige Umsetzung zur freien phenolischen Kopfgruppe eingetreten. Diese Ergebnisse weisen auf eine stöchiometrische Bildung von **4** hin (Schema 1). Auch bei **2** wurde ein einheitliches Produkt erhalten, d.h., die Aminosäuren gehen keine detektierbaren Nebenreaktionen ein. Bei der Elektropolymerisation können allerdings Trp-, Tyr- und His-Reste teilweise oxidiert werden, was jedoch für den praktischen Einsatz der peptidfunktionalisierten Oberflächen z.B. für den ELISA keine Auswirkungen hat. Um sicher zu sein, daß die Nbz-HPA-Peptide **2** und **3** und die bei der Photolyse freigesetzten Nebenprodukte elektrochemisch nicht oxidiert werden können, wurden die Peptide **2–4** durch Differential-Puls-Voltammetrie vermessen. Dabei hat sich gezeigt, daß beim photochemisch entschützten HPA-Peptid **4** bei 0.6 V die elektrochemische Oxidation stattfindet, während **2** und **3** in diesem Spannungsbereich elektrochemisch inert sind.

Nach der elektrochemischen Polymerisation durch photolytische Abspaltung der Schutzgruppe der Nbz-HPA-Peptide (bei 1.0 V, 5 min) wird die GCE mit Wasser gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird 1% BSA/PBS (BSA = Rinderserumalbumin aufgetragen (500 µL pro Elektrode). Nach 2 h wird eine Lösung von Streptavidin (rhodamin- oder fluoresceinmarkiert) mit 0.1 mg mL⁻¹ PBS aufgetragen. Nach 2 h Inkubation wird die Elektrode gewaschen. Die mit Antikörper beschichtete Elektrode wird mit einem Zweitantikörper (rhodaminmarkiert) in 0.1 mg mL⁻¹ PBS versetzt und nach 2 h gewaschen.

Eingegangen am 8. April 1998 [Z11707]

Stichwörter: Biosensoren • Elektrochemie • Peptide • Oberflächen • Photochemie

- [1] N. Dontha, W. B. Nowall, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2619–2625.
- [2] H. Morgan, D. J. Pritchard, J. M. Cooper, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 841–846.
- [3] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. L. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [4] a) L. Rozsnay, D. Benson, S. Fodor, P. Schultz, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 801–802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 759–761; b) H. Sigrist, A. Collioud, J. F. Clemence, H. Gao, R. Luginbühl, G. Sunderababu, *Opt. Eng.* **1995**, *34*, 2339–2348; c) G. Sunderababu, H. Gao, H. Sigrist, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 540.
- [5] T. Matsuda, T. Sugawara, *Langmuir* **1995**, *11*, 2272.
- [6] a) L. F. Rozsnay, M. S. Wrighton, *Langmuir* **1995**, *11*, 3913–3920; b) E. Delamarche, G. Sunderababu, H. Biebuyck, B. Michel, C. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, *Langmuir* **1996**, *12*, 1997–2006.
- [7] S. A. Sundberg, R. W. Barrett, M. Pirrung, A. L. Lu, B. Kiangsoontra, C. P. Holmes, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12050–12057.
- [8] P. Heiduschka, W. Göpel, W. Kraas, S. Kienle, G. Jung, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 667–672.
- [9] B. Amit, E. Hazum, M. Fridkin, A. Patchornik, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1977**, *9*, 91–96.
- [10] V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, *1*, 1–26.
- [11] Erhältlich bei ECHAZ microcollections EMC, Sindelfingerstraße 3, D-72070 Tübingen.
- [12] a) *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), Röntgenstrukturanalyse VCH, Weinheim, **1996**; b) G. Jung, H. Hofstetter, S. Feiertag, D. Stoll, O. Hofstetter, K.-H. Wiesmüller, V. Schurig, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2261–2263; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2148–2150.
- [13] M. Huber, P. Heiduschka, S. Kienle, C. Pavlidis, J. Mack, T. Walk, G. Jung, S. Thanos, *J. Biomed. Mater. Res.*, im Druck.

Lösung der Kristall- und Molekülstruktur komplexer niedrigsymmetrischer organischer Verbindungen durch Pulver: Fluoresceindiaceat**

Kenneth D. Knudsen,* Philip Pattison, Andrew N. Fitch und Robert J. Cernik

Die mit modernen Röntgen- und Neutronendiffraktometern erhaltbaren Daten und die Verbesserungen der Rechenverfahren machen es möglich, daß zunehmend komplexere Kristallstrukturen aus der Messung an Pulvern gelöst werden können. Die Verwendung von Synchrotronstrahlung

[*] Dr. K. D. Knudsen, Dr. P. Pattison
Swiss-Norwegian Beamline
European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)
BP 220, F-38043 Grenoble Cedex (Frankreich)
Fax: (+33)4-76882694
E-mail: knudsen@esrf.fr
Dr. A. N. Fitch, Dr. R. J. Cernik
CCLRC Daresbury Laboratory, Warrington WA44AD
(Großbritannien)

[**] Die Autoren danken Henrik Birkedal und Angela Altomare für hilfreiche Diskussionen, Hermann Emerich für technische Hilfe während des Experiments und Giuseppe Cruciani für Ratschläge zum Rietveld-Verfahren. K.D.K. wurde vom norwegischen Forschungsrat (Projekt Nummer 100822/431) gefördert.