
PEPTID-REINIGUNG IM ARRAY-FORMAT

Abschlussbericht

Projekt-Kennziffer: 2834

Max-Buchner-Forschungstiftung

Betreuer: PD Dr. F. Ralf Bischoff

Stipendiat: Dipl.-Chem. Christopher Schirwitz

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg

KURZFASSUNG

Hochkomplexe Peptidarrays gewinnen in den Biowissenschaften zunehmend an Bedeutung, da mit ihnen parallelisierte Bindungsstudien an einer Vielzahl von Molekülen durchgeführt werden können. Ab einer bestimmten Peptidvielfalt ist es üblich die Peptide des Arrays direkt auf dem Trägermaterial durch *in situ* Synthese herzustellen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass neben den gewünschten Peptiden auch Abbruchprodukte entstehen, die ebenfalls an den Träger gebunden sind und bei der Auslese von Bindungsereignissen stören können.

Im Rahmen dieses Projekts wurde daher eine Methode entwickelt, mit welcher Artefakte vollständig vom Array entfernt werden, ohne dabei die Ortsinformation der einzelnen Peptide bzw. die Auflösung des Arrays zu verlieren. Grundprinzip ist die Synthese aller Peptide an einem spaltbaren Linker und der Übertrag des gesamten Arrays auf eine Membran, wobei nur vollständig synthetisierte Peptide wieder kovalent an die Membran binden können. Abbruchprodukte sowie Verunreinigungen werden durch Waschen vollständig entfernt.

EINLEITUNG

Die von BRUCE MERRIFIELD entwickelte Festphasensynthese ermöglicht heute die effiziente und vollständig automatisierte Herstellung von Peptiden, wobei die

Sequenz der einzelnen Peptide genau kontrollierbar ist.¹⁻³ Grundprinzip ist der schrittweise Aufbau des Peptids an einem Polymerharz, indem Aminosäure an Aminosäure gekoppelt wird. Für die Hochdurchsatz-Analyse von Bindungsereignissen an Peptiden wurden darüber hinaus Techniken entwickelt, mit denen sich eine Vielzahl von Peptiden auf einer Trägeroberfläche unterbringen lassen. Im Vergleich zu den in den Biowissenschaften bereits etablierten DNA-Arrays waren die Ansprüche an eine Synthese von Peptiden im Array-Format jedoch wesentlich komplexer: An Stelle von 4 verschiedenen Bausteinen bei der DNA-Synthese kommen in der Peptidsynthese mindestens 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren zum Einsatz, was zu einer höheren kombinatorischen Vielfalt führt. Um hochkomplexe Peptidarrays herzustellen, wären nach für die DNA-Synthese gängigen Verfahren wie der lithographischen Synthese eine Vielzahl von Kopplungsschritten notwendig.⁴ Aus diesem Grund entwickelte RONALD FRANK die SPOT-Synthese, welche den ersten kombinatorischen Ansatz für die Herstellung von Peptidarrays darstellte.⁵⁻⁷ Anstatt jedes Peptid eines Arrays einzeln zu synthetisieren und dann ins Array-Format zu bringen, werden bei der SPOT-Synthese ganze Arrays aus verschiedenen Peptiden Sequenz für Sequenz *in situ* aufgebaut. Die Aminosäuren werden dazu in einem Lösungsmittel auf die Syntheseoberfläche gespottet, wo sie an die Oberfläche bzw. die zuvor aufgebrauchte Aminosäure koppeln können. Die Verwendung eines Lösungsmittels birgt jedoch den Nachteil, dass die Auflösung der auf diese Weise hergestellten Arrays stark limitiert ist. Ein Verlaufen der Spots und das Verdampfen des Lösungsmittels erlauben maximale Auflösungen von 25 verschiedenen Peptiden pro cm². Durch ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Verfahren, das auf der Einbettung der Aminosäure-Bausteine in festen Mikropartikeln basiert, welche dann mit einem Laserdruckers oder Mikrochip punktgenau adressiert werden können, konnte die Auflösung auf bis zu 10,000 verschiedenen Peptide pro cm² gesteigert werden.^{8,9}

Allerdings haben sowohl die Spot-Synthese als auch die Mikropartikel-basierte Synthese den Nachteil, dass trotz hoher Kopplungsausbeuten zwangsläufig Abbruchprodukte entstehen, die ebenso wie die vollständigen Peptide an das Trägermaterial gebunden sind. Je länger die einzelnen Peptide werden, desto höher wird auch der Anteil an unvollständigen Produkten. Im Rahmen der Synthese werden diese Fragmente zwar routinemäßig geblockt, so dass keine „falschen“ Sequenzen entstehen, jedoch können auch unvollständige Peptide in Bindungsstudien zu

fehlerhaften Ergebnissen führen. Die im Rahmen dieses Projekts entwickelte Methode zur Peptid-Reinigung im Array-Format erlaubt es, ganze Peptidarrays mittels Abspaltung und Übertrags auf eine Membran zu reinigen.

ERGEBNISSE

Methode

Das Konzept für die Peptid-Reinigung im Array-Format sieht vor, den gesamten Array auf eine zweite Oberfläche zu übertragen, wobei nur vollständig synthetisierte Peptide über ein „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ wieder kovalent an den neuen Träger binden sollen (Abbildung 1). Dafür werden alle Peptide an einem spaltbaren Linker synthetisiert, der in die Oberflächenbeschichtung integriert wird. Im letzten Schritt der Peptidsynthese wird ein „Schlüssel“-Molekül an die vollständig synthetisierten Peptide gekoppelt. Durch die Schutzgruppenstrategie ist gewährleistet, dass nur vollständig synthetisierte Peptide diese Modifikation erhalten. Werden die Peptide nun abgespalten, können alle vollständig synthetisierten Peptide über ein auf der Rezeptor-Oberfläche immobilisiertes „Schloss“-Molekül binden, wohingegen Syntheseartefakte durch Waschen entfernt werden.

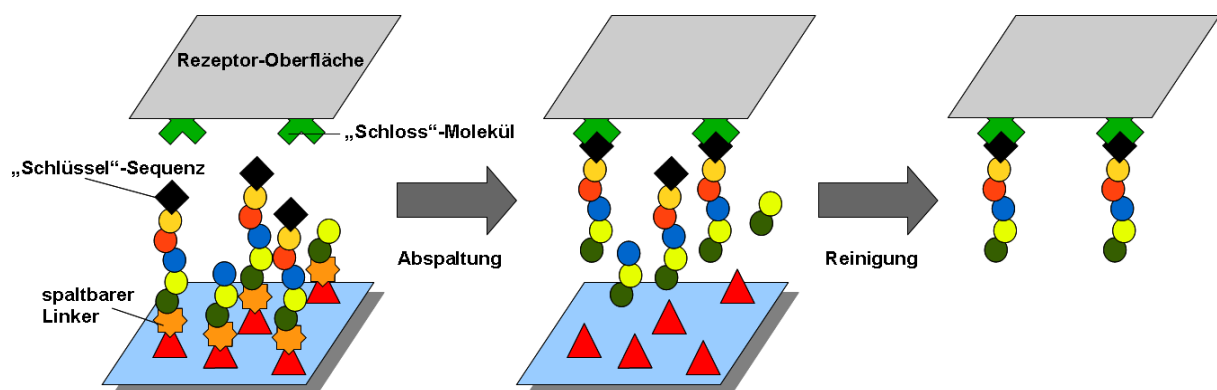


Abbildung 1 | Konzept für die Peptid-Reinigung im Array-Format. Peptide werden an einem spaltbaren Linker synthetisiert. Mit Hilfe eines „Schlüssel-Schloss-Prinzips“ können nur vollständig synthetisierte Peptide nach der Abspaltung wieder an eine Rezeptor-Oberfläche binden.

Spaltbare Linker

Um Peptide und Artefakte von der Trägeroberfläche abspalten zu können, wurden Linker benötigt, die sich in die Synthesestrategie integrieren lassen und nach erfolgter Synthese alle Array-Komponenten mit möglichst mit hoher Effizienz und unter selektiven Bedingungen freisetzen. Mit dem Hydrazin-Linker (Hydrazinobenzoesäure) sowie dem RINK-Amid-Linker wurden zwei Kandidaten identifiziert, die kommerziell erhältlich und kompatibel zur verwendeten N^α -Fmoc-Strategie (Fmoc=Fluorenylmethoxycarbonyl) sind.¹⁰⁻¹³

Für die Array-Synthese mittels Laserdrucker oder Mikrochip kommen Oberflächen zum Einsatz, die mit einem Poly(ethylen glykol)methylmethacrylat (PEGMA)-haltigen Polymerfilm beschichtet sind.¹⁴⁻¹⁶ Die Seitenketten des Polymers sind dabei mit β -Alanin modifiziert, um die für die Peptidsynthese benötigten Aminogruppen bereitzustellen.¹⁴ Es zeigte sich, dass sowohl der Hydrazin-Linker (60-70%) als auch der RINK-Amid-Linker (80-90%) mit guter Kopplungsausbeute an diese Syntheseoberflächen angebunden werden können, wobei die Kopplungsausbeuten mittels spektrophotometrischer Quantifizierung des Piperidin-Dibenzofulven-Adduktes (PDFA-Methode) bei der Fmoc-Abspaltung ermittelt wurden.¹⁴

Während es sich beim RINK-Amid-Linker um einen säurelabilen Linker handelt, der unter schwach sauren Bedingungen Peptide als Säureamid freisetzt, handelt es sich beim Hydrazin-Linker um einen sogenannten „Safety-Catch-Linker“, der in zwei Stufen gespalten wird. Zunächst wird die Hydrazinbindung mit einem Oxidationsmittel oxidiert, dann kann mit einem Nukleophil wie beispielsweise Wasser

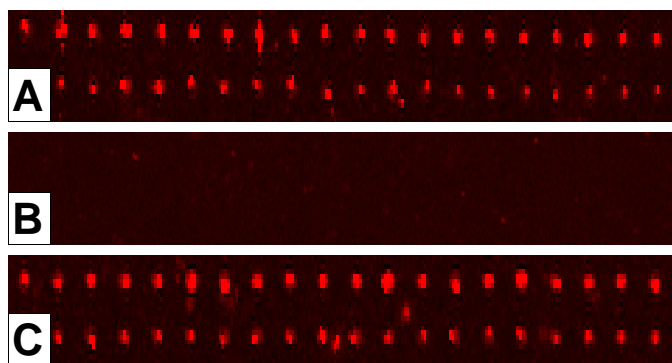


Abbildung 2 | Abspaltexperiment mit dem Hydrazin-Linker. (A) Referenzarray aus gespotteten Peptiden vor Spaltung des Linkers nach Immunfärbung. (B) Immunfärbung nach Oxidation des Linkers und Inkubation in Phosphatpuffer. (C) Nachfärbung mit fluoreszenz-markiertem Streptavidin nach Oxidation des Linkers und Inkubation in Phosphatpuffer.

gespalten werden. Physiologische Abspaltbedingungen in wässrigen Puffern wären für die Peptid-Array-Reinigung insbesondere im Hinblick auf die Auswahl möglicher „Schlüssel-Schloss-Systeme“ erwünscht.

Die Spaltbarkeit beider Linker auf den Synthese-Oberflächen wurde zunächst anhand eines Modellsystems untersucht: Ein vorsynthetisiertes Peptid wurde mit

einem Spot-Roboter auf die mit Linker modifizierte Oberflächen aufgebracht. Im Falle des Hydrazin-Linkers wurde nach Oxidation mit *N*-Bromsuccinimid/Pyridin sowie Abspaltung in Phosphatpuffer (pH 8.0) mit dem fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurde ein in die Peptidseitenkette integriertes Biotin mit einem fluoreszenzmarkierten Streptavidin nachgefärbt. Es zeigte sich, dass nach Inkubation des Arrays in Phosphatpuffer das Epitop auf dem Array zwar nicht mehr erkannt wurde, jedoch keine signifikante Abspaltung des Peptids erfolgt war, da das Biotin nach wie vor gefärbt werden konnte (Abbildung 2). Da die Menge an Oxidationsmittel bei den Peptidarrays nicht exakt an die Menge an Oberflächen gebundenem Hydrazinlinker angepasst werden kann, tritt vermutlich eine Oxidation an anderer Stelle im Peptid auf, die für die spezifische Erkennung durch den Antikörper wichtig ist. Aufgrund dieser Nebenreaktionen schied der Hydrazin-Linker zunächst für weitere Versuche aus. Die Methode wurde deshalb mit dem RINK-Amid-Linker weiter entwickelt, welcher in ähnlichen Vorversuchen quantitative Abspaltung innerhalb von 90 min mit 50% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) gezeigt hatte.

Rezeptor-Oberfläche

Um die Peptide in Array-Auflösung und in Gegenwart eines Abspaltmediums auf eine Rezeptor-Oberfläche transferieren zu können, musste diese Oberfläche speziell an das verwendete Linker-System angepasst werden. Für die Abspaltung des RINK-Amid-Linkers wird in der Festphasenpeptidsynthese Trifluoressigsäure (TFA) in einem organischen Lösungsmittel verwendet. Da sich ein Aufbringen dieses Abspaltmediums zwischen zwei starre Trägeroberflächen für den Übertrag als schwierig erwies, fiel die Wahl bei der Rezeptor-Oberfläche auf eine saugfähige und gegenüber TFA stabile Blotting-Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF). Dies war insbesondere im Hinblick auf ein Minimieren von lateraler Diffusion wichtig. Des Weiteren musste die Membran so modifiziert werden, dass ein spezifischer Übertrag von vollständig synthetisierten Peptiden und ein Entfernen aller Abbruchprodukte möglich war. Als „Schlüssel-Schloss-System“ erwies sich hier die Thiol/Gold-Bindung als geeignet. Zwischen Cystein-haltigen Peptiden und Goldoberflächen lässt sich säurekatalysiert eine kovalente Bindung ausbilden. Die PVDF-Membran wurde mit einem 15-20 nm dicken Goldfilm beschichtet. Um nur vollständig synthetisierte Peptide an die Membran binden zu lassen, wurde Cystein erst als letzte Aminosäure eingeführt. Durch die Schutzgruppenstrategie in der N^α -Fmoc-Synthese ist damit

sichergestellt, dass nur vollständige Peptide eine Thiol-Seitenkette zur kovalenten Bindung an die Goldoberfläche erhalten.

Transfer-Experiment und Peptid-Reinigung

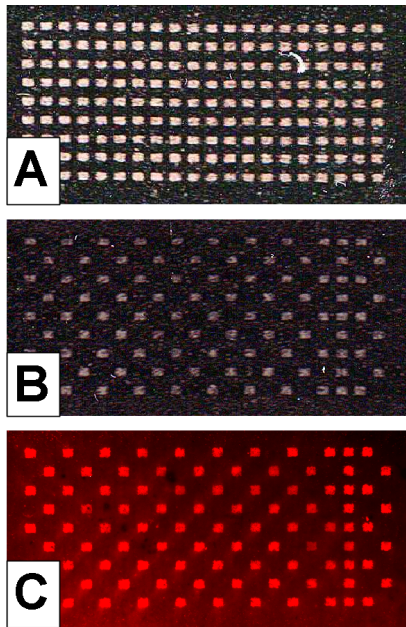


Abbildung 3 | Übertragungsexperiment. (A) Vorstrukturierung mit Glycin-Mikropartikeln. (B) Terminierung mit Cystein-Mikropartikeln. (C) Fluoreszenzmuster nach Übertragung auf die Zielmembran und Immunfärbung.

Anhand eines Modellsystems wurde die Reinigungsmethode getestet. Ein Standard-Syntheseträger mit RINK-Amid-Linker wurde am Laserdrucker mit einem Muster von 9 x 20 Glycin-Spots vorstrukturiert (siehe Abbildung 3). An alle 180 Spots wurde aus Lösung ein vorsynthetisiertes HA-Peptid gekoppelt. Anschließend erhielten nur 95 der 180 Spots ein N-terminales Cystein. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Seitenketten des Peptids noch durch die säurelabilen Standard-Seitenschutzgruppen geschützt. Der Übertrag erfolgte in direktem Kontakt zur Membran, welche in 50% (v/v) TFA getränkt war, was gleichzeitig zu einer Abspaltung der Seitenschutzgruppen führen sollte. Die anschließende Immunfärbung mit dem fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörper zeigte, dass nur die mit Cystein versehenen Peptide an die Membran binden können. Es war eine deutliche

Färbung vor nur geringem Hintergrund zu beobachten. Laterale Diffusion war bei den im Schnitt 512 µm großen Spots nicht zu beobachten.

ERGEBNISSE UND ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des geförderten Projekts konnte eine einfache und effiziente Methode entwickelt werden, mit der hochkomplexe Peptidarrays von Syntheseartefakten gereinigt werden können. Durch den spezifischen Übertrag des gesamten Arrays auf eine Gold-beschichtete Membran werden nur vollständig synthetisierte Peptide angereichert, wohingegen Abbruchprodukte entfernt werden. Auf diese Weise können hochreine Peptidarrays hergestellt werden, die auch für sehr empfindliche Nachweissysteme geeignet sein sollten. Die Rezeptormembran ist kompatibel zu gängigen Methoden der Immunfärbung und diversen Fluoreszenzfarbstoffen. Darüber hinaus zeichnet sie sich durch eine hohe Stabilität gegenüber Chemikalien und Lösungsmitteln aus.

LITERATUR

1. R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **85** (14), 2149 (1963).
2. R. B. Merrifield, *Science* **150** (3693), 178 (1965).
3. R. B. Merrifield and J. M. Stewart, *Nature* **207** (4996), 522 (1965).
4. J. P. Pellois, X. Zhou, O. Srivannavit et al., *Nature Biotechnology* **20** (9), 922 (2002).
5. R. Frank and H. Overwin, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **66**, 149 (1996).
6. R. Frank, *Journal of Immunological Methods* **267** (1), 13 (2002).
7. R. Frank, *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **5** (6), 429 (2002).
8. M. Beyer, A. Nesterov, I. Block et al., *Science* **318** (5858), 1888 (2007).
9. V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer et al., *Angewandte Chemie - International Edition* **47** (37), 7132 (2008).
10. H. Rink, *Tetrahedron Letters* **28** (33), 3787 (1987).
11. M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, and H. Köster, *Tetrahedron Letters* **30** (35), 4645 (1989).
12. C. Peters and H. Waldmann, *Journal of Organic Chemistry* **68** (15), 6053 (2003).
13. J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. De Yoreo et al., *Journal of Organic Chemistry* **69** (12), 4145 (2004).
14. M. Beyer, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff et al., *Biomaterials* **27** (18), 3505 (2006).
15. V. Stadler, M. Beyer, K. König et al., *J Proteome Res* **6** (8), 3197 (2007).
16. V. Stadler, R. Kirmse, M. Beyer et al., *Langmuir* **24** (15), 8151 (2008).