

DNA-vermittelte Immobilisierung spezifischer Zelloberflächenliganden zur Herstellung von Mikroarrays mit lebenden Zellen**

Hendrik Schroeder, Bernhard Ellinger, Christian F. W. Becker, Herbert Waldmann und Christof M. Niemeyer*

Mikroarrays sind zu einer der grundlegenden Plattformtechniken für die Hochdurchsatzanalyse biologischer Systeme geworden.^[1] Dies begann mit der Entwicklung von DNA-Mikroarrays in den 1990er Jahren sowie der Erschließung von Peptid- und Proteinmikroarrays zur Identifizierung von Wechselwirkungspartnern, Modifikationsstellen und Enzymsubstraten.^[2,3] Heute geht diese Technik weiter in Richtung der Herstellung von Mikroarrays mit fixierten Gewebeproben^[4] und lebenden Zellen.^[5] Es ist anzunehmen, dass letztere wesentlich zur Aufklärung komplexer zellulärer Eigenschaften von gesunden und erkrankten Zellen beitragen können, denn Zellmikroarrays ermöglichen die Isolierung bestimmter Charakteristika individueller Zellen aus komplexen Mischungen. Durch eine Immobilisierung von Reagentien, die sich zum Einfangen von Zellen auf einem festen Träger eignen, können Zellgemische schnell bezüglich ihrer Zusammensetzung und ihres Phänotyps analysiert werden. Dies hilft sowohl bei der Identifizierung und Analytik von Zelltypen, die bestimmte Oberflächenmoleküle exprimieren, als auch bei der Untersuchung ihrer Antworten auf bestimmte exogene Stimuli, indem die Sekretion von spezifischen Fak-

toren oder anderen messbaren Zellaktivitäten bestimmt wird.^[5]

Zur Immobilisierung zellfangender Gruppen werden häufig Proteine, Peptide oder andere Liganden über kovalente Verknüpfung, Chemisorption oder Physisorption in Kombination mit automatisierten Spotting-Techniken auf Trägeroberflächen aufgebracht.^[1,5,6] Angeregt durch die vielversprechenden Ergebnisse der DNA-vermittelten Immobilisierung (DDI = DNA-directed immobilization) von Proteinen und anderen molekularen und kolloidalen Komponenten^[7] beschreiben wir hier den Einsatz der DDI-Technik für die Herstellung mikrostrukturierter Arrays bestimmter Zelloberflächenliganden (Abbildung 1). Die daraus resultierenden Oberflächen sind geeignete Substrate für das Wachstum von Fibroblasten. Dieser Ansatz sollte signifikante Vorteile gegenüber konventionellen Spotting-Methoden haben, da er die Implementierung der Dekodierungseigenschaften von DNA-Mikroarrays aus der kombinatorischen Synthese und dem Ligandenscreening^[8] in die zellbiologische Forschung ermöglicht. Zur Überprüfung dieser Hypothese wählten wir die gut untersuchte Erkennung von RGD-Peptidliganden durch Integrin-Oberflächenrezeptoren von Fibroblasten.^[9–11]

Wie in Abbildung 1 dargestellt, wurden kovalente Konjugate aus Streptavidin (STV) und einzelsträngiger DNA (ssDNA) als molekulare Adapter für die DNA-vermittelte Immobilisierung von biotinylierten Peptiden eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden drei DNA-STV-Konjugate hergestellt (**F1**, **F5** und **F10**; schematisch in Abbildung 1), die jeweils eines der Oligonucleotide **tF1**, **tF5** bzw. **tF10** (bestehend aus je 22 Nucleotiden) enthielten.^[12,13] In getrennten Reaktionsgefäßern wurden anschließend die Konjugate **F1** und **F5** mit einem Moläquivalent der biotinylierten Peptide **bRGDF** (Biotin-Gly₅-Arg-Gly-Asp-Phe-COOH)^[10] bzw. als Kontrolle mit **bG5** (Biotin-Gly₅-COOH) gekuppelt, was zu den Konjugaten **F1-bRGDF** bzw. **F5-bG5** führte. Zur Visualisierung der immobilisierten Konjugate durch Fluoreszenzanalyse wurden nach Kupplung der Peptide fünf Moläquivalente des biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffes Cy5 zu den Konjugaten **F1-bRGDF** und **F5-bG5** gegeben. Ausgehend von **F10** wurde ein weiteres Kontrollkonjugat hergestellt, um die Spezifität der vorgeschlagenen Zellbindung abschätzen zu können. Dazu wurden sechs Moläquivalente biotinyliertes Cy5 an **F10** gekuppelt (Konjugat **F10-Cy5**) und noch vorhandene Biotin-Bindungsstellen mit freiem D-Biotin abgesättigt.^[14] Die Konjugate wurden durch Hybridisierung auf einem DNA-Mikroarray immobilisiert, der die komplementären Fänger-Oligonucleotide **cF1**, **cF5** und **cF10** enthielt. Die Fänger-Oligonucleotide waren zuvor kovalent auf kommerziell erhält-

[*] Dr. H. Schroeder, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Fachbereich Chemie
Universität Dortmund
Otto-Hahn Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-Mail: christof.niemeyer@uni-dortmund.de
Dipl.-Biochem. B. Ellinger, Prof. H. Waldmann
Abteilung Chemische Biologie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Chemische Biologie
Fachbereich Chemie
Universität Dortmund
44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. C. F. W. Becker
Abteilung Physikalische Biochemie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch das Zentrum für Angewandte Chemische Genomik (ZACG), eine gemeinsame Forschungsinitiative der Europäischen Union und des Ministeriums für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen, unterstützt. Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprogramms „Molekulare Aspekte der Biowissenschaften“ der Universität Dortmund.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

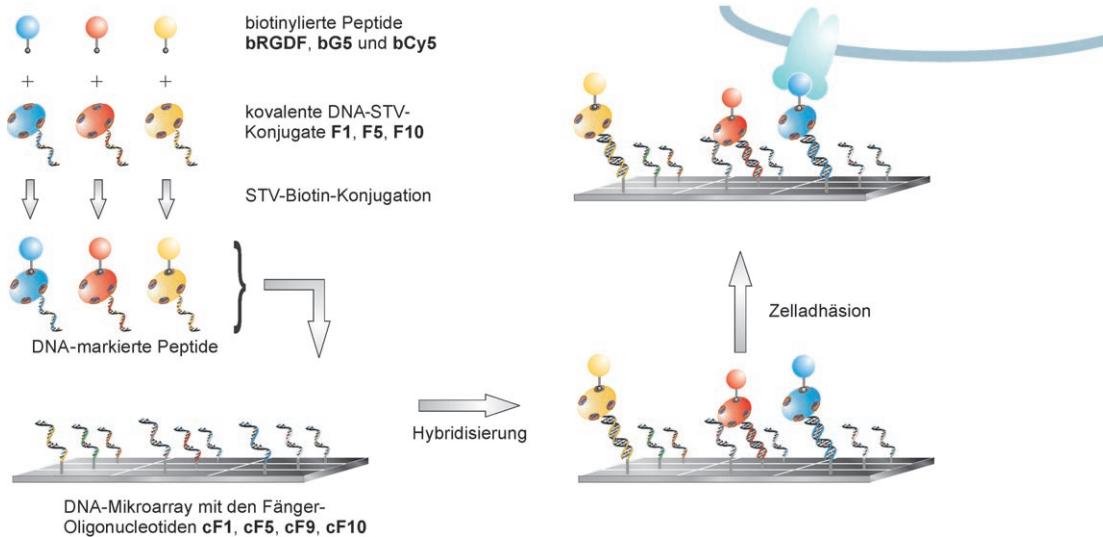


Abbildung 1. Generierung von Arrays lebender Zellen durch DNA-vermittelte Immobilisierung zellspezifischer Liganden. Die biotinylierten Liganden **bRGDF**, **bG5** und **bCy5** werden an kovalente Konjugate aus Streptavidin und einzelsträngiger DNA gebunden (DNA-STV **F1**, **F5** und **F10**) und mit einem Mikroarray, der komplementäre Fänger-Oligonucleotide enthält, hybridisiert. Der daraus resultierende Array wird dann für die Adhäsion von NIH-3T3-Fibroblasten genutzt.

lichen H^P-Slides (Chimera Biotech, Dortmund) immobilisiert worden, die eine Poly(amidoamin)(PAMAM)-Dendrimer-Zwischenschicht,^[15] modifiziert mit Polyethylenglycol-Abstandhaltern und reaktiven Epoxid-Endgruppen, enthalten. Zusätzlich dazu enthielt der DNA-Array ein vierteres Oligonucleotid (**cF9**), das zu keinem der Konjugate komplementär ist (Abbildung 2a) und damit die Abschätzung der unspezifischen Hybridisierung und Zellanhafung ermöglicht. Abbildung 2b zeigt ein typisches Fluoreszenzbild eines solchen Arrays, das nach Hybridisierung mit den fluoreszenzmarkierten DNA-STV-Konjugaten erhalten wurde. Sehr intensive Cy5-Fluoreszenz wurde für die Spots beobachtet, die komplementäre Fänger-Oligomere enthielten (**cF1**, **cF5** und **cF10** in Abbildung 2a), während in Spots mit nichtkomplementärem Oligomer **cF9** ein niedriges Fluoreszenzsignal mit ca. 7% der Signalintensität des vollständig mit biotinyliertem Cy5 markierten **F10-Cy5** gefunden wird. Dieser Befund zeigt, dass die einzelnen DNA-STV-Konjugate hoch spezifisch mit ihren komplementären Fänger-Oligonucleotiden hybridisieren und bestätigt frühere Studien zur spezifischen Immobilisierung von DNA-STV-Konjugaten mithilfe der DDI-Methode.^[13,16]

Die Träger mit den Protein/Peptid-DNA-Arrays wurden im Anschluss als Substrate für die Adhäsion von NIH-3T3-Fibroblasten eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden Zellen bei Passage 5–25 trypsinisiert und auf den Array mit einer Zell-dichte von 2×10^4 Zellen mL^{-1} in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ausplattiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die Substrate mit Puffer gewaschen und die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-markiertem Phalloidin gefärbt. TRITC-Phalloidin ist eine hochaffine Sonde für F-Actin, die aus dem Pilztoxin Phalloidin hergestellt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC markiert wird. Die Analyse der Träger mit einem Mikroarray-Scanner ermöglichte die Visualisierung der Zelladhäsion mithilfe der grünen (TRITC) und roten (Cy5) Detektionskanäle. Wie in Abbildung 2c zu

sehen ist, erfolgte die Zelladhäsion bevorzugt auf Spots, die entweder das DNA-Protein-Konjugat **F1-bRGDF** oder gar

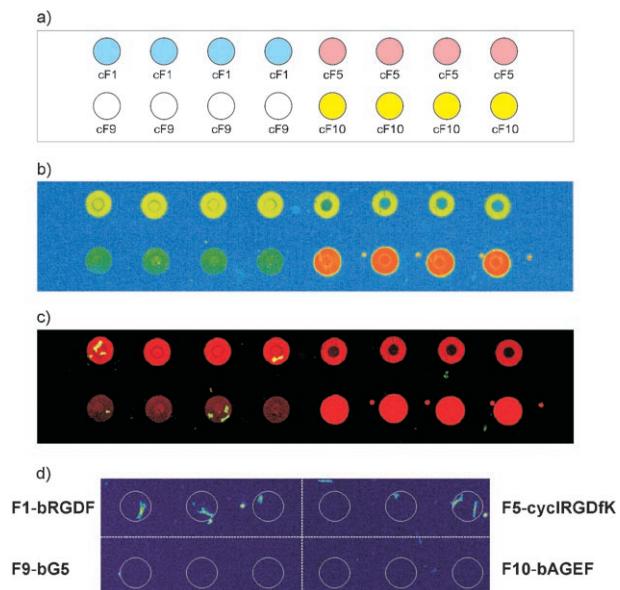


Abbildung 2. Typische Mikroarrays, die im Verlauf der Experimente gemäß Abbildung 1 erhalten wurden. a) Anordnung der Fänger-Oligonucleotide **cF1**, **cF5**, **cF9** und **cF10** auf dem DNA-Mikroarray. b) Fluoreszenzbild des DNA-Mikroarrays, hybridisiert mit einem Gemisch aus den DNA-STV-Konjugaten **F1-bRGDF**, **F5-bG5** und **F10-Cy5**. Es ist zu beachten, dass die Konjugate **F1-bRGDF** und **F5-bG5** weniger Cy5-Fluorophore enthalten und deshalb geringere Fluoreszenzsignale liefern als **F10-Cy5**. Die beobachteten ringartigen Strukturen werden durch den so genannten Doughnut-Effekt verursacht und entstehen während des Trocknens der Fänger-Oligomere. Die Spotgröße der gezeigten Arrays beträgt $250 \mu\text{m}$. c) Zwei-Farben-Überlagerung des Arrays nach Adhäsion der Fibroblasten. Die gewachsenen Zellen sind mit TRITC-Phalloidin gefärbt und als grüne Objekte sichtbar. d) Rekonfigurierter Array, der vier verschiedene Peptidliganden enthält, nach Adhäsion der Fibroblasten. Um eine deutliche Darstellung zu gewährleisten, ist nur die grüne Fluoreszenz gezeigt.

kein DNA-Protein-Konjugat enthielten. Letztere Spots enthielten lediglich das Fänger-Oligomer **cF9**. Das Auszählen der anhaftenden Zellen für eine große Zahl von Spots ($n=384$) ergab ein Verhältnis von ungefähr 1:2:5:14 für die Spots, die **F10-Cy5**, **F5-bG5**, **F1-bRGDF** bzw. **cF9** enthielten. Dabei war die Zahl der Zellen, die an **F10-Cy5**-modifizierten Spots hafteten, vergleichbar oder sogar geringer als die Hintergrundadhäsion auf den mit Polyethylenglycol passivierten Bereichen der Glasträger.

Durch den Vergleich der Spots, die **F10-Cy5** oder **cF9** enthalten, wird deutlich, dass die Tendenz der NIH-3T3-Fibroblasten zur Bindung an mit ssDNA beladene Spots effizient unterdrückt werden kann, indem die ssDNA durch Hybridisierung mit den komplementären DNA-STV-Konjugaten (z. B. **F10-Cy5**) „maskiert“ wird. Die quantitative Untersuchung der mit unterschiedlichen Oligonucleotid-Peptid-Konjugaten beladenen Spots ergab, dass die Präferenz der Zellen für Spots mit dem RGD-Motiv gegenüber solchen mit dem **bG5**-Peptid in den meisten Fällen zwischen 10:1 und 10:4 variierte. Sorgfältiges Anpassen der Kultur- und Waschbedingungen wurde als Hauptgrund für diese beobachteten Variationen ausgemacht.^[14]

Um die Eignung unseres Ansatzes für die Untersuchung unterschiedlicher Liganden zu demonstrieren, nutzten wir den modularen Aufbau der Chips und rekonfigurierten den beschriebenen DNA-Fänger-Array mit anderen DNA-Peptid-Konjugaten (Abbildung 2d). Zu diesem Zweck wurde ein zweites Kontrollpeptid, das Nonapeptid Biotin-Gly5-Ala-Gly-Glu-Phe-COOH (**bAGEF**), das zwei Punktmutationen im Vergleich zum RGDF-Motiv aufweist, mit dem DNA-STV-Konjugat **F10** gekuppelt (**F10-bAGEF**). Des Weiteren wurde ein Pentapeptid mit dem cyclisierten RGDF-Motiv^[10] (**b-cyclRGDFK**, Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) an das DNA-STV-Konjugat **F5** gekuppelt (**F5-cyclRGDFK**). Gemeinsam mit diesen Konjugaten wurden auch die Konjugate **F9-bG5** und **F1-bRGDF** auf dem Chip immobilisiert. Lediglich eine sehr geringe Zahl an Zellen, vergleichbar mit der Zahl auf den **bG5**-Spots, adhärierte an die **bAGEF** enthaltenden Spots. Dagegen war die Zahl an Zellen, die auf **b-cyclRGDF**-modifizierten Spots ermittelt wurde, vergleichbar mit der Zahl an Zellen auf den **bRGDF**-Spots (Abbildung 2d). Diese Befunde bestätigten eindeutig, dass die beobachtete Zelladhäsion auf der Gegenwart des RGD-Motivs beruhte und nicht auf einer Variation der Peptidlänge oder DNA-Sequenz.

Eine genauere Analyse der Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie zeigte signifikante Unterschiede in der Morphologie der adhärierten Zellen (Abbildung 3). In Spots, die **F1-bRGDF** oder **cF9** enthielten, hatten die Fibroblasten eine normale Spindel- oder pyramidale Morphologie mit einem gut definierten Zytoskelett, klar erkennbar an den Stressfasern im Zytosoma (Abbildung 3a,b). Darüber hinaus führten längere Wachstumszeiträume der Zellen, die an mit **F1-bRGDF** beladenen Spots adhärierten, innerhalb von ca. 40 h zu einer Bedeckung des gesamten Spots mit Zellen (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen).^[17] Dies belegt, dass die Zellen zur Vermehrung fähig sind. Damit können sie auf Mikroarrays kultiviert werden und verhalten sich ähnlich wie in der klassischen Zellkultur. Die beobachtete Präferenz der NIH-3T3-

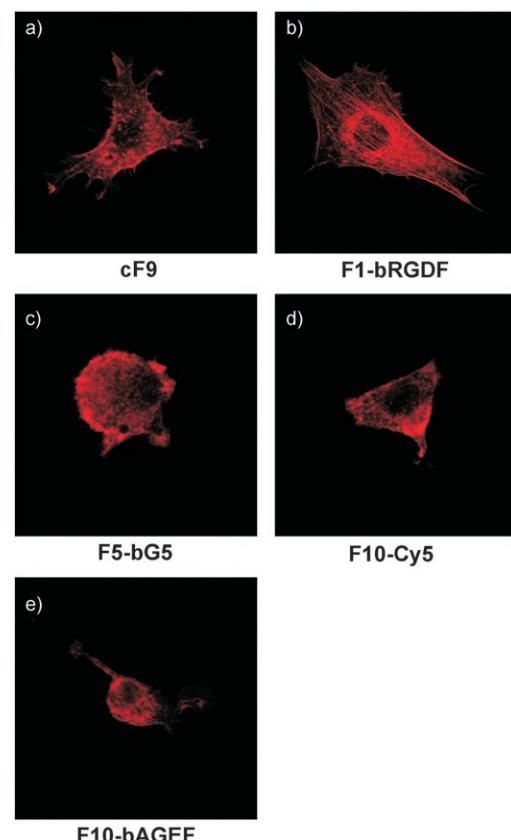


Abbildung 3. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopiebilder (64fache Vergrößerung) von Zellen, die auf individuellen Spots des in den Abbildungen 1 und 2 gezeigten Arrays wachsen. e) Repräsentatives Bild einer Zelle auf Spots mit **F10-bAGEF**-Konjugat (aus Abbildung 2d).

Fibroblasten zur Adhäsion an Spots mit einzelsträngiger DNA war überraschend, und der Grund für dieses Phänomen ist gegenwärtig noch unklar.^[18] Bekanntlich ist die Zelloberfläche insgesamt negativ geladen, weshalb man Coulomb-Abstoßung zwischen den DNA-Polyanionen und der Zelle erwarten sollte. Mögliche Erklärungen für das beobachtete Verhalten sind elektrostatische Anziehung, verursacht durch die Abschirmung der negativen Ladung der DNA durch erhöhte Konzentrationen zweiwertiger Kationen oder durch positiv geladene Membranproteine, oder das Vorhandensein von Rezeptorgruppen auf der Zelloberfläche. Eine detaillierte Analyse dieses Phänomens mithilfe von Immunfärbung und Mikroskopie an lebenden Zellen ist im Gange.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Zellmorphologie war die Morphologie von Zellen, die an Spots mit **F5-bG5**, **F10-Cy5**, **F10-bAGEF** oder der Glasoberfläche haften (Abbildung 3c-e und Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen), rund. Bei diesen Zellen fand ein verstärktes Wachstum von Filopodien statt, den radialen dünnen Ausläufern der Zelle, die für die Anheftung an Oberflächen benötigt werden. Diese Morphologie ist typisch für Zellwachstum auf Substraten, denen passende Anheftungspunkte fehlen, die zur Entwicklung eines normalen Phänotyps benötigt werden. Die Integrin-vermittelte Zellausbreitung und die Bildung fokaler Adhäsionen ermöglichen das Überleben und die Vermehrung anheftungsabhängiger Zellen; dementsprechend führt das

Fehlen von Anheftungspunkten zur Bildung runder Zellformen und oft auch zur Apoptose.^[10] Aus diesem Grund ist unsere Beobachtung runder Zellen, die an Spots mit **F10-Cys**, **F5-bG5**, **F10-bAGEF** oder auf der umgebenden passivierten Glasoberfläche adhärierten, in guter Übereinstimmung mit der Erwartung, dass die Fibroblasten keine korrekten fokalen Kontakte mit diesen Oberflächen knüpfen können. Dagegen deutet die reguläre Zellmorphologie der Zellen auf Spots mit dem RGD-Motiv und überraschenderweise auch mit ssDNA darauf hin, dass die hier eingesetzte NIH-3T3-Zelllinie durchaus in der Lage ist, die fokalen Kontakte zu knüpfen, die für die Entwicklung eines normalen Phänotyps benötigt werden.

Wir haben hier gezeigt, dass DNA-Mikroarrays für die Herstellung von Arrays mit lebenden Zellen genutzt werden können. Mithilfe von DNA-Mikroarrays für die gerichtete Immobilisierung kombinatorischer Bibliotheken kleiner zellspezifischer Liganden wurden positionskodierte Zellarrays hergestellt, in denen die einzelnen Spots durch kleine Populationen lebender Zellen besiedelt wurden. Diese Zellen wurden durch die Gegenwart der immobilisierten Liganden beeinflusst. Durch diese erstmals beschriebene Affinität der Zellen für DNA-modifizierte Oberflächen ergeben sich neue Möglichkeiten für die Anwendung von DNA-Arrays zum Design von Zellarrays, wenn selbstorganisierende DNA-Nanostrukturen genutzt werden, um zusätzliche Funktionen, z. B. schaltbare Freisetzung, und mechanische Eigenschaften in die Oberflächenarchitektur zu integrieren.^[19,20] Wir erwarten daher, dass der hier beschriebene Ansatz nicht nur für die Grundlagenforschung in der molekularen Zellbiologie, sondern z. B. auch als Screeningplattform in der Wirkstoffentwicklung Anwendung finden wird.

Ein eingegangen am 31. Oktober 2006,
veränderte Fassung am 30. Januar 2007
Online veröffentlicht am 20. April 2007

Stichwörter: DNA · Mikroarrays · Peptide · Zelladhäsion · Zelloberflächenliganden

- [1] J. Sobek, K. Bartscherer, A. Jacob, J. D. Hoheisel, P. Angenendt, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 365–380.
- [2] D. H. Min, M. Mrksich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 554–558.
- [3] K. Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 782–799.
- [4] T. Braunschweig, J. Y. Chung, S. M. Hewitt, *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 325–336.
- [5] D. S. Chen, M. M. Davis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 28–34.
- [6] Orthogonale chemische Kupplungsstrategien, die die gerichtete und orientierte Immobilisierung kleiner Moleküle sowie ganzer Proteine ermöglichen, sind grundlegend für die Herstellung von Arrays, in denen die immobilisierten Proben ihre ungestörte biologische Funktion beibehalten sollen; Beispiele: M. N. Yousaf, M. Mrksich, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4286–4287; C. D. Hodneland, Y.-S. Lee, D.-H. Min, M. Mrksich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5048–5052; M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010–6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830–5834; ; A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schröder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H.

Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436–1440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408–1412; ; A. Dantas de Araújo, J. M. Palomoa, J. Cramer, M. Köhn, H. Schröder, R. Wacker, C. M. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 302–307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296–301; ; A. Watzke, M. Gutierrez-Rodriguez, M. Köhn, R. Wacker, H. Schröder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6288–6306, zit. Lit.

- [7] C. M. Niemeyer, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, *85*, 639–643.
- [8] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3241–3246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3179–3183.
- [9] K. E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3919–3927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767–3774.
- [10] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [11] Die Integrin-basierte Anheftung von Fibroblasten an mikro- und nanostrukturierte Oberflächen wurde bereits mit dem RGD-Motiv und verwandten Peptidmotiven untersucht, die durch Chemisorption an Goldoberflächen gebunden waren; Beispiele: B. T. Houseman, M. Mrksich, *Biomaterials* **2001**, *22*, 943–955; M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blummel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, J. P. Spatz, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 383–388; E. A. Cavalcanti-Adam, A. Micoulet, J. Blummel, J. Auernheimer, H. Kessler, J. P. Spatz, *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 219–224). Effekte nanotopographischer Rauheit und Substrateffekte der zellulären Funktion: M. J. Dalby, M. O. Riehle, D. S. Sutherland, H. Agheli, A. S. Curtis, *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 159–169, zit. Lit. Die Abscheidung von Fibronectinen durch Dip-Pen-Nanolithographie wurde beschrieben: K. B. Lee, S. J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, M. Mrksich, *Science* **2002**, *295*, 1702–1705.
- [12] R. Wacker, C. M. Niemeyer in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Vol. Supplement 21* (Hrsg.: D. E. Bergstrom), Wiley, New York, **2005**, S. 12.17.11–12.17.15.
- [13] U. Feldkamp, R. Wacker, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 367–372.
- [14] Oligonucleotidsequenzen, detaillierte Protokolle der Präparation der DNA-Arrays, Synthese der biotinylierten Peptide, Herstellung der DNA-STV-Konjugate und Zellkulturbedingungen sowie weitere Abbildungen Array-gebundener Zellen finden sich in den Hintergrundinformationen.
- [15] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686–694.
- [16] R. Wacker, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 453–459.
- [17] Wir haben beobachtet, dass die Fibroblasten prinzipiell auf allen in dieser Studie verwendeten Peptid-DNA-Oberflächen kultiviert werden können. Wir vermuten, dass die Vermehrung dank günstiger Zell-Zell-Wechselwirkungen stattfindet, die den Einfluss der Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen aufheben. Dennoch haben wir merkliche Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen festgestellt: Zellen auf Peptid-modifizierten Spots wachsen normal, Zellen, die an der Glasoberfläche haften, dagegen wesentlich langsamer. Diese Unterschiede in der Wachstums geschwindigkeit sind der Grund dafür, dass zuerst die Spots bewachsen werden (nach ca. 40 h) und erst anschließend die umgebenden Bereiche (nach ca. 80 h, Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen).
- [18] Erste Befunde aus Studien mit HeLa-Zellen (ATCC-Nr. CCL-2) zeigen, dass auch bei dieser Zelllinie die Adhäsion an die DNA/Peptid-modifizierten Spots gegenüber derjenigen an den passivierten Hintergrundbereich der Glasträger bevorzugt ist. Insbesondere Spots, die nur Fänger-Oligomere enthalten, werden effizient besiedelt (Abbildung S9 in den Hintergrundinformationen).
- [19] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431.
- [20] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876.