

# Perfluorierte Marker als Ankergruppen für Mikroarrays

Nicola L. Pohl\*

Biotechnologie · Enzyminhibitoren · Mikroarrays ·  
Perfluorierte Verbindungen · Wirkstoff-Forschung

**M**ikroarrays bieten die bequeme Möglichkeit, biomolekulare Wechselwirkungen mit minimalen Probenmengen aufzuspüren. Sie werden daher häufig zur Durchmusterung vor allem von immobilisierten Nucleinsäuren und Proteinen oder Peptiden eingesetzt. Arrays niedermolekularer Verbindungen wie Naturstoffe (z. B. Kohlenhydrate) oder Wirkstoffkandidaten haben sich dagegen nur langsam etabliert, zum Teil deshalb, weil die Verbindungen oft nur schwer mit einer Gruppe zu derivatisieren sind, die die spezifische Anbindung an eine Arrayoberfläche ermöglicht. Die meisten Methoden beruhen auf der intrinsischen Reaktivität einer nucleophilen Gruppe der niedermolekularen Verbindung, über die eine kovalente Bindung an reaktive Elektrophile auf der Oberfläche des Mikroarrayträgers geknüpft wird.<sup>[1]</sup> Da es zahlreiche nucleophile Gruppen gibt, die in niedermolekularen Verbindungen vorkommen, ist die genaue Art der Anheftung oft unbekannt. Eine spezifische funktionelle Bindungsgruppe kann von Anfang an beim Entwurf und Aufbau von Bibliotheken synthetischer Verbindungen vorgesehen werden, aber diese Strategie erhöht die Komplexität.

Eine Lösung des Problems, kleine Moleküle selektiv an eine Chipoberfläche zu binden, ohne eine neue *reaktive* funktionelle Gruppe einführen zu müssen, wurde 2005 präsentiert. Der Ansatz beruht auf der Einführung eines Fluorkohlenstoff-Ankers, wie er im Allgemeinen zur Vereinfachung von Reinigungsschritten verwendet wird (Abbildung 1).<sup>[2]</sup> Fluorkohlenstoffe bieten sich zur Abtrennung von Zwischenprodukten bei der Synthese von Bibliotheken kleiner Moleküle an,<sup>[3]</sup> denn die fluorierten Gruppen selbst sind relativ reaktionsträge, im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nicht sichtbar und bilden gegenüber Wasser und auch gegenüber organischen Lösungsmitteln bei Flüssig- oder Festphasenextraktionen getrennte Phasen. Im Unterschied zu Kohlenwasserstoffgruppen, die für eine verlässliche Festphasenextraktion auf C18-Säulen bis zu 36 Kohlenstoffatome lang sein müssen,<sup>[4]</sup> genügen perfluorierte Gruppen mit nur acht Kohlenstoffatomen für eine Extraktion an fluoriertem Silicagel über solvophobe Wechselwirkungen. In der ursprünglichen Ver-

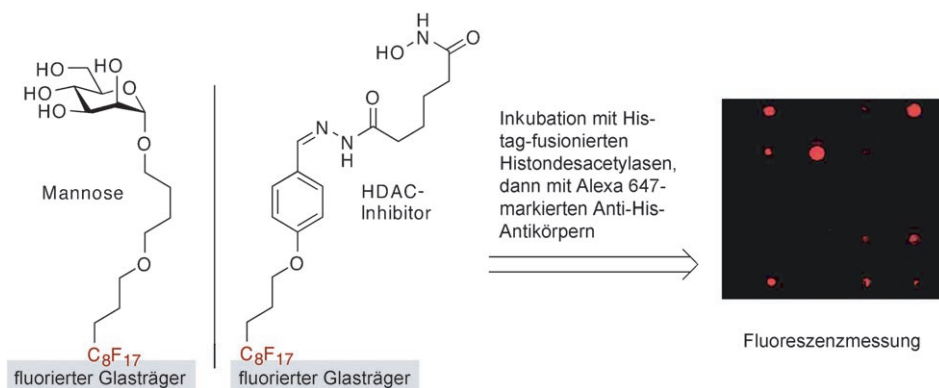


**Abbildung 1.** Die Strategie zur Herstellung von Mikroarrays mit niedermolekularen fluorierter Verbindungen nutzt nichtkovalente Wechselwirkungen, die Moleküle mit perfluorierten Ankern an definierten Positionen auf fluorderivatisierten Glasplättchen fixiert. Durch Inkubation der Plättchen in wässrigen Pufferlösungen, die Proteine enthalten, die entweder selbst fluoreszenzmarkiert sind oder anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar gemacht werden, lässt sich die Wechselwirkung zwischen den Proteinen und den niedermolekularen Verbindungen durch Fluoreszenzmessung sichtbar machen.

öffentlichung 2005 wurde gezeigt, dass dieser solvophobe Effekt der Fluorierung sogar stark genug ist, um Monosaccharide mit einer Perfluor-Ankergruppe an eine C-modifizierte Glasoberfläche an definierten Positionen zu adsorbieren. Ungeschützte Kohlenhydratligenanden, die über einen Butandiol-Abstandhalter mit einem C-Anker gekuppelt waren, wurden auf die modifizierten Glasplättchen aufgebracht und dann mit fluoreszenzmarkierten Kohlenhydrat-Bindeproteinen inkubiert. Sogar geringe Mengen eines Kohlenwasserstoffensids, das oft in biologischen Tests verwendet wird, werden im Screeningpuffer toleriert. Diese erste Arbeit wurde dann auf Disaccharide und geladene Zucker ausgeweitet, die mit pflanzlichen Lectinen nach einer analogen fluorbasierten Strategie durchgemustert wurden.<sup>[5]</sup>

Das ursprüngliche Konzept fluorbasierter Mikroarrays mit niedermolekularen Substanzen wurde an ungeschützten Kohlenhydratligenanden gezeigt. In einer neueren Arbeit wurde nun nachgewiesen, dass dieser Ansatz nicht auf Liganden beschränkt ist, die so hydrophil sind wie Kohlenhydrate (Abbildung 2).<sup>[6]</sup> Beschrieben wurde das erste Mikroarray-Screening von niedermolekularen Hemmstoffen für Histondesacetylasen (HDAC). Die Studie erbringt den Beleg, dass fluorbasierte Mikroarrays zur nichtkovalenten Immobilisierung hydrophoberer Wirkstoffkandidaten geeignet sind. Histondesacetylasen sind eine Gruppe zinkhaltiger Hydrolasen, die die Genexpression modulieren, indem sie acetylierte Lysinseitenketten von Transkriptionsregulatoren hydrolysieren. Inhibitoren dieser Enzyme lassen eine Wirkung gegen Tumoren, neurodegenerative Erkrankungen, fibroproliferative Störungen, Entzündungskrankheiten und Virus- und Protozoen-Infektionen erwarten.<sup>[7]</sup> Inhibitoren, die selektiv für einzelne HDACs sind, sollten helfen, die individuellen

[\*] Prof. Dr. N. L. Pohl<sup>[a]</sup>  
Department of Chemistry and the Plant Sciences Institute  
Iowa State University  
2756 Gilman, Ames, IA 50011 (USA)  
Fax: (+1) 515-294-0105  
E-Mail: npohl@iastate.edu  
Homepage: [http://www.chem.iastate.edu/faculty/Nicola\\_Pohl/](http://www.chem.iastate.edu/faculty/Nicola_Pohl/)  
[†] N.L.P. ist ein Alfred P. Sloan Research Fellow.



**Abbildung 2.** Die Strategie, Mikroarrays durch fluorbasierte solvophobe Wechselwirkungen zu beladen, wurde ursprünglich für die Durchmusterung hydrophiler Kohlenhydrate entwickelt. Nachfolgende Arbeiten zeigen jedoch, dass auch hydrophobere Verbindungen wie Histondesacetylase-Inhibitoren über nicht-kovalente Fluor-Wechselwirkungen immobilisiert und dann durchmustert werden können.

Funktionen dieser Hydrolasen bei der Kontrolle der Genexpression zu unterscheiden. Vegas et al. durchsuchten eine Sammlung von HDAC-Hemmstoffen, die mit einem perfluorierten Anker versehen waren, um die einzelnen Verbindungen in ihrer Wirkung miteinander zu vergleichen. Die Substanzen waren mit unterschiedlich langen Linkern und mit Metallchelatoren bekannter Affinitäten modifiziert. Es wurden Duplikate des Arrays hergestellt, die gegen HDAC2, den HDAC3/NcoR2-Peptidkomplex und HDAC8 durchmustert wurden. Mit einem farbstoffmarkierten Anti-Penta-His-Antikörper wurden die bindenden Wechselwirkungen sichtbar gemacht. Die Strategie der nichtkovalenten Kuppelung war mit der Entfernung nichtgebundener HDAC vom Chip, der anschließenden Inkubation mit Antikörpern und mehreren Waschschritten, die vor der Auswertung im Fluoreszenzscanner erfolgten, kompatibel. Die Fluor-Arrays überstehen sogar eine Inkubation mit löslichen Inhibitoren für Konkurrenzexperimente im Mikroarray-Format und ein Screening mit Lysaten aus ganzen Zellen statt mit gereinigten Proteinen. Die Autoren betonen, dass die fluorbasierten Mikroarrays eine kontrollierte Fluoreszenzabbildung der Hemmstoffe mit gleichmäßig niedrigem Hintergrund und großem Signal/Rausch-Verhältnis ermöglichen.

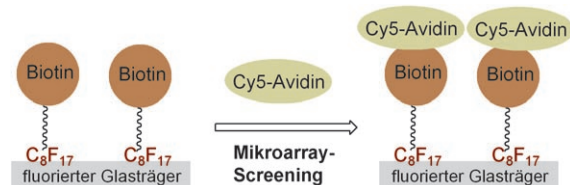
Die Studie zeigte außerdem auf, dass es große Übereinstimmungen zwischen HDAC-Inhibitoren gibt, die mit den geschilderten fluorbasierten Mikroarrays oder mit biochemischen Tests in Lösung oder mit Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gefunden wurden. Einige der Inhibitoren waren auf der fluorierten Mikroarray-Oberfläche allerdings weniger aktiv als im biochemischen Test in Lösung. Mit SPR-Messungen zur Bestimmung der Kinetik und Thermodynamik der Inhibitorbindung ließ sich zeigen, dass diese auffälligen Inhibitoren vergleichsweise hohe Dissoziationsgeschwindigkeiten aufwiesen ( $> 0.1 \text{ s}^{-1}$ ). Weil in vielen Fällen nicht nur eine hohe Affinität, sondern auch niedrige Dissoziationsgeschwindigkeiten angestrebt werden, um die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Zielstruktur zu optimieren, haben die fluorbasierten Mikroarrays mit niedermolekularen Verbindungen das Potenzial, aktive Moleküle sowohl anhand

der Affinitäten als auch anhand der Dissoziationsgeschwindigkeiten herauszufiltern.

Die HDAC-Inhibitor-Studie lenkt den Blick auch auf wichtige praktische Aspekte bei der Herstellung von Mikroarrays mit hydrophoberen Verbindungen. Die Waschverfahren während des Aufbringens der Verbindungen sind entscheidend, um Kreuzkontaminationen – vor allem mit weniger hydrophilen Verbindungen – zu vermeiden. Die Drucknadeln wurden vor dem Druckvorgang in Dimethylformamid beschallt; zwischen verschiedenen Proben während eines Laufs wurden sie fünfmal im

gleichen Lösungsmittel gewaschen und dann im Vakuum getrocknet.

Interessanterweise gibt es auch von einer anderen Arbeitsgruppe an der University of Cambridge eine aktuelle Veröffentlichung, die über nichtkovalente fluorvermittelte Wechselwirkungen zur Herstellung von Mikroarrays mit niedermolekularen Substanzen berichtet.<sup>[8]</sup> In den dort beschriebenen Experimenten wurden mit einem perfluorierten Anker versehene Biotinmoleküle auf fluoridierte Glasplättchen gedruckt und mit farbstoffmarkiertem Avidin nachgewiesen (Abbildung 3). Wie bei einer Strategie auf der Grundlage nichtkovalenter solvophober Wechselwirkungen



**Abbildung 3.** Ein allgemeiner hydrophober Effekt ist nicht ausreichend, um saubere Spots auf fluorierten Glasplättchen zu erhalten. Biotin, das mit einem C-Anker modifiziert und nach Bindung mit Cy5-markiertem Avidin sichtbar gemacht wurde, bildete verlässlich positionierte Spots, während unmodifiziertes Biotin stark ausblutete.

zu erwarten ist, lieferte C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>-modifiziertes Biotin konsistentere Ergebnisse und bessere Morphologien und Größen der Spots als das teurere, mit dem kürzeren C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>-Anker versehene Analogon. Zum Vergleich wurde auch unmarkiertes Biotin auf die fluoridierte Oberfläche aufgebracht, wo es deutlich sichtbar aus den Positionen auf dem Array ausblutete. Der fluoridierte Anker ist fraglos notwendig, um die niedermolekularen Verbindungen an diskreten Positionen aufzubringen und zu fixieren, wie es für ein Mikroarray-Screening erforderlich ist. Ein allgemeiner hydrophober Effekt reicht dazu nicht aus. Die Autoren weisen auch auf die ungewöhnliche Eigenschaft der fluorderivatisierten Glasplätt-

chen hin, mindestens fünfmal wiederverwendbar zu sein, indem sie einfach mit organischen Lösungsmitteln gewaschen werden. Die neu beschickten Plättchen zeigten wenig Hintergrundfluoreszenz und wenig unspezifische Wechselwirkungen zwischen Avidin und anderen Verbindungen, die mit Biotin nicht strukturverwandt sind.

Insgesamt sind solvophobe Effekte fluorierter Gruppen noch nicht gut verstanden. Klar ist aber, dass diese nichtkovalenten Wechselwirkungen stark genug sind, um eine Reihe von Verbindungen verlässlich auf Mikroarrays zu fixieren und sogar ein Screening in Gegenwart von Tensiden zu ermöglichen. Dies macht die Strategie nichtkovalenter Mikroarrays mit niedermolekularen Verbindungen so attraktiv. Der kürzlich erbrachte Nachweis, dass nichtkovalente fluorbasierte Mikroarrays auch für quantitative Bindungsexperimente geeignet sind, erhöht den Nutzen solcher Screening-Verfahren noch mehr.<sup>[9]</sup>

Online veröffentlicht am 17. April 2008

- 
- [1] Ein aktueller Übersichtsartikel: J. L. Duffner, P. A. Clemons, A. N. Koehler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 74–82.
  - [2] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162–13163.
  - [3] Aktuelle Beispiele: a) D. Crich, D. Grant, A. A. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12106–12107; b) W. Zhang, Y. Lu, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 836–843; c) D. P. Curran, Q. Zhang, C. Richard, H. Lu, V. Gudipati, C. S. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9561–9573; d) T. Kasahara, Y. Kondo, *Chem. Commun.* **2006**, 891–893.
  - [4] Siehe z. B.: J. Bauer, J. Rademann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7296–7297.
  - [5] S. K. Mamidyala, K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, G. Park, N. L. Pohl, *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 571–579.
  - [6] A. J. Vegas, J. E. Bradner, W. Tang, O. M. McPherson, E. F. Greenberg, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8106–8110; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7960–7964.
  - [7] G. Elaut, V. Rogiers, T. Vanhaecke, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2584–2620.
  - [8] R. L. Nicholson, M. L. Ladlow, D. R. Spring, *Chem. Commun.* **2007**, 3906–3908.
  - [9] F. A. Jaipuri, B. Y. Collet, N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1731–1734; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1707–1710.
-