

Kombinatorische Synthese von Peptidarrays mit einem Laserdrucker**

Volker Stadler,* Thomas Felgenhauer, Mario Beyer, Simon Fernandez, Klaus Leibe, Stefan Güttler, Martin Gröning, Kai König, Gloria Torralba, Michael Hausmann, Volker Lindenstruth, Alexander Nesterov, Ines Block, Rüdiger Pipkorn, Annemarie Poustka†, F. Ralf Bischoff* und Frank Breitling*

Im Gedenken an Annemarie Poustka

Vor mehr als 40 Jahren nutzte Merrifield zum ersten Mal einen festen Träger, um Aminosäuren nacheinander an eine wachsende Peptidkette zu kuppeln.^[1] Aus seinem Ansatz entwickelte sich später das neue Fachgebiet der kombinatorischen Peptidsynthese, wobei viele Reaktionsorte parallel prozessiert werden, um möglichst viele Peptide parallel herzustellen.^[2] Im Fokus dieser Methoden liegt es, möglichst viele Peptide zu synthetisieren und zu analysieren, um z.B. Peptide zu finden, die an ein Zielprotein binden. Mit der „One-bead-one-compound“-Methode können zwar sehr einfach sehr viele Peptide hergestellt werden,^[3] aber die Decodierung der Peptidsequenzen – der an ein Zielprotein bindenden Peptide – benötigt dabei sehr viel Arbeitsaufwand. Zusätzlich zu diesem Nachteil können bei dieser Methode

problematische Peptide nicht einfach ausgeschlossen werden, d.h., während der Synthese der Peptidbibliothek werden z. B. auch viele hydrophobe Peptide hergestellt, die unspezifisch an jedes Zielprotein binden.

Arrays haben diese Nachteile nicht. Durch die Position auf dem Array ist auch die Sequenz jedes Peptids bekannt, und problematische Peptide können in nachfolgenden Arrays einfach weggelassen werden. Peptidarrays wurden von Frank erstmalig mithilfe der von ihm entwickelten SPOT-Synthese hergestellt. Aufgrund ihrer Zuverlässigkeit und vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dominiert diese Methode immer noch das Arbeitsgebiet.^[4] Hohe Peptiddichten können dabei mit der SC²-Methode erreicht werden, wobei individuelle, an Zellulosefasern gekuppelte Peptide in einem ersten Array synthetisiert und dann z.B. auf Glasobjektträger in hoher Dichte gespottet werden. Diese Variante der SPOT-Synthese ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn viele Kopien von hochdichten Peptidarrays hergestellt werden sollen.^[5] Mit lithographischen Methoden können mittlerweile Arrays mit tausenden von Oligonucleotiden pro cm² hergestellt werden.^[6] Der Nachteil dieser Methoden liegt darin, dass hierbei immer nur ein Monomer pro Arbeitsschritt an den Träger gekuppelt werden kann. Deswegen werden 20 × 10 Kupplungszyklen benötigt, um einen Array mit 10 Aminosäuren langen Peptiden herzustellen, während ein entsprechender Array von Oligonucleotiden nur 4 × 10 Kupplungszyklen benötigt. Dieser Peptid-spezifische Nachteil führt dazu, dass es schwierig ist, mit lithographischen Methoden Arrays mit längeren Peptiden herzustellen.^[7]

Um nun Arrays mit in hoher Dichte aufgetragenen Peptiden herzustellen, die darüber hinaus auch noch in Einzelanfertigung schnell und billig herstellbar sein sollen, haben wir einen „Peptiddrucker“ auf Basis eines herkömmlichen Farblaserdruckers entwickelt, der die 20 Aminosäuren als feste Aminosäure-Tonerpartikel auf einen Glaträger ortsgenau druckt. Im Anschluss eines jeden Druckvorganges wird eine komplette Schicht, die aus allen unterschiedlichen Aminosäuretonern in Form eines Punktmusters besteht, geschmolzen. Im Schmelzvorgang werden die zuvor in einer festen Matrix eingeschlossenen Aminosäurederivate beweglich gemacht und können so zur Trägeroberfläche diffundieren, wo sie mit freien Aminogruppen abreagieren. Schaltet man zwischen die aufeinander folgenden Druckebenen die in der Merrifield-Synthese üblichen Wasch- und Entschüttungsprozeduren, so gelangt man auf einfachem Wege zu

[*] Dr. V. Stadler,^[‡] Dr. T. Felgenhauer,^[‡] Dr. M. Beyer, Dr. S. Fernandez, K. Leibe, K. König, Dr. A. Nesterov, I. Block, Prof. A. Poustka, Dr. F. R. Bischoff,^[‡] Dr. F. Breitling^[‡]
Abteilung Chipbasierte Peptidbibliotheken, Deutsches Krebsforschungszentrum, INF 580, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-421-744
E-Mail: v.stadler@dkfz.de
r.bischoff@dkfz.de
f.breitling@dkfz.de

Homepage: http://www.dkfz.de/en/b120_cbpl/index.html

Dr. R. Pipkorn

Zentrale Einheit für Peptidsynthese, DKFZ Heidelberg

Dr. G. Torralba, Prof. M. Hausmann, Prof. V. Lindenstruth
Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg

Dr. S. Güttler, M. Gröning

Abteilung für Technische Informationsverarbeitung
Fraunhofer-Institut, Stuttgart

[†] Diese Autoren haben gleichwertig zu dieser Arbeit beigetragen.

[‡] verstorben am 3. Mai 2008

[**] Wir danken Dorothea Freidank, Daniela Rambow, Thorsten Kühlwein und Jürgen Kretschmer für technische Hilfe, Martina Schnölzer (DKFZ) für die Massenspektrometrie, Hans Lehrach für hilfreiche Diskussionen und Ermutigung, Kazuhiro Ohmori (Sekisui) für Rat in Bezug auf die Partikelzusammensetzung und Alexander Küller, Michael Grunze und Reiner Dahint (Universität Heidelberg) für Oberflächenanalytik, dem BMBF (Antragsnr. 03N8710 und NGFN-0313375), der Helmholtz Gemeinschaft (Antragsnr. VH-VI-108), dem HFSP (Antragsnr. RGP5/2006), der Europäischen Union (Antragsnr. 508399) und der Volkswagenstiftung (Antragsnr. 79 466) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801616> zu finden.

einem vollständig kombinatorisch synthetisierten Peptidarray (Abbildung 1). Ein Vorteil dabei ist, dass die normale Fmoc-Chemie genutzt werden kann,^[8] wobei sich unsere Methode von der Standard-Festphasensynthese nur durch das – bei Raumtemperatur – „feste Lösungsmittel“ unterscheidet, das die Aminosäuren bis zum Start der Kupplungsreaktion in festen Tonerpartikeln immobilisiert.

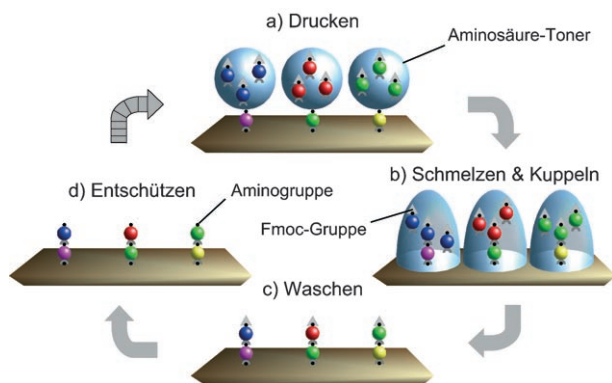


Abbildung 1. Partikelbasierte kombinatorische Peptidsynthese. a) Ein Laserdrucker druckt in Tonerpartikel eingebettete Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester auf einen festen Träger, wo b) die Partikel nach dem Druckvorgang geschmolzen werden. Dadurch können die chemisch voraktivierten Aminosäurederivate zu den freien Aminogruppen auf der Trägeroberfläche diffundieren und mit diesen abreagieren. Der Syntheszyklus ist beendet, wenn c) nicht verbrauchte Monomere weggeschwungen und d) die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Wiederholte Kupplungszyklen ergeben einen Peptidarray.

Unser Peptiddrucker basiert auf dem Farblaserdrucker OKI C7400, mit allerdings 20 Druckwerken, die jeweils einen speziellen Aminosäuretoner enthalten. Die Maschine ermöglicht außerdem eine auf $\pm 5 \mu\text{m}$ exakte Positionierung des Arrays, sodass trotz der sehr kleinen Synthesorte für die einzelnen Peptide aufeinander folgende Druckvorgänge die jeweils gewünschte Abfolge der Aminosäuresequenzen garantieren (Abbildung 2a). Ansonsten funktioniert der Peptiddrucker wie ein normaler Farblaserdrucker, wobei hier eine ca. 20 cm breite Zeile mit ca. 10000 Leuchtdioden (LEDs) ein Lichtmuster auf der Oberfläche einer OPC-Walze (organischer Photoleiter; organic photo conductor) generiert, die sich mit ca. 10000 Schritten pro 20 cm dreht. Dieses zweidimensionale Lichtmuster besteht also aus etwa 100 Millionen Pixeln pro $(20 \times 20) \text{ cm}^2$. Das OPC-Material übersetzt das Lichtmuster in das entsprechende Muster aus elektrischen Ladungen mit wiederum etwa 100 Millionen Pixeln pro $(20 \times 20) \text{ cm}^2$. Dazu wird die OPC-Walze zunächst mithilfe einer Korona gleichmäßig aufgeladen, anschließend werden selektiv nur die mit Licht bestrahlten Pixel entladen. Dieser Prozess wird durch die Eigenschaften des OPC-Materials ermöglicht. Die in Dunkelheit isolierende Beschichtung der Walze wird durch die Belichtung leitend und lässt die aufgetragenen Ladungen sehr schnell zur Masse abwandern.^[9] Im nächsten Schritt wird das Muster von elektrischen Ladungen in das entsprechende Partikelmuster umgewandelt, indem geladene Tonerpartikel nur zu den mit Licht neutralisierten Bereichen „springen“. Schlussendlich werden die Partikel von der OPC-Walze durch ein starkes elektrisches

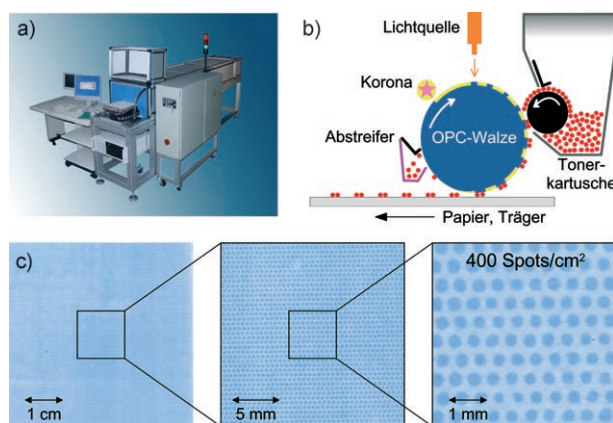


Abbildung 2. Funktionsweise eines Laserdruckers. a) Der Peptiddrucker mit 20 gegeneinander ausgerichteten Druckwerken; auf der Vorderseite des Druckers ist die Halterung für den Träger sichtbar. b) Eine Lichtquelle (LED-Zeile, orange) bestrahlt ausgewählte Bereiche der zuvor mit einer Korona (gelb) gleichmäßig aufgeladenen OPC-Walze (blau) wodurch diese neutralisiert werden. Triboelektrisch aufgeladene Tonerpartikel „springen“ zu diesen neutralisierten Bereichen, bevor sie schließlich durch ein starkes elektrisches Feld auf den Träger des Peptidarrays transferiert werden. c) Eine mit freien Aminogruppen derivatisierte Glasplatte wurde mit Aminosäuretoner bedruckt. Die in den Partikeln eingebetteten Aktivester (hier: Fmoc-L-Ile-OPfp) werden durch Hitze freigesetzt, nichtumgesetztes Material mit DMF weggeschwungen und die verbliebenen freien Aminogruppen mit 10% Essigsäureanhydrid in DMF blockiert. Schließlich wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF abgespalten und die dadurch neu entstandenen freien Aminogruppen mit 0.1% Bromophenolblau in Methanol angefärbt.

Feld (4 kV mm^{-1}) auf den Träger übertragen, wo der Ausdruck aus den Teilbildern der 20 verschiedenen Aminosäuretoner zusammengesetzt wird (Abbildung 2b).

Die elektrische Aufladung der Aminosäure-Tonerpartikel geschieht triboelektrisch innerhalb der Tonerkartuschen, d.h., die Partikel werden unter mildem Druck gegen eine Schaumstoffwalze gerieben wodurch negative Ladungen auf der Partikeloberfläche entstehen. Die physikalischen Eigenschaften unserer Aminosäure-Tonerpartikel entsprechen dabei weitgehend denen von kommerziell erhältlichen Tonern, was die Größenverteilung der Partikel (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen), die verdruckte Menge (Abbildung S3), das Schmelzverhalten (Abbildung S2), die Morphologie (Abbildung S4) und schließlich auch das Druckbild betrifft (Abbildung 2c und Abbildung S8). Als aktivierte Aminosäurederivate für die Peptidsynthese haben wir die 20 Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester (Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, OPfp = Pentafluorphenyl) gewählt, da diese voraktiviert, relativ stabil und außerdem kommerziell erhältlich sind. Diese wurden dann zusammen mit höheren Homologen von Standard-Lösungsmitteln (z.B. Diphenylformamid) in die entsprechenden Aminosäure-Tonerpartikel eingebettet (Tabelle S1). Die meisten dieser – bei Raumtemperatur – festen Lösungsmittel ergaben ähnliche Kupplungsausbeuten wie mit dem Standard-Lösungsmittel für die Flüssigphasensynthese, *N,N*-Dimethylformamid (DMF), aber auch einige der Harzkomponenten von kommerziellen Tonern funktionierten ähnlich gut.

Die Druckergebnisse dieser Aminosäure-Tonerpartikel und kommerzieller Toner unterschieden sich nicht in den Kriterien der Spot-Auflösung und übertragener Tonermenge (Abbildung S3). Wurden die verdrukten Aminosäuren anschließend durch Schmelzen an mit Aminogruppen derivatisierte Glaträger^[10] gekuppelt, dann ergab dies eine ausgezeichnete Auflösung des Musters von gekuppelten Aminosäuren (Abbildung 2c). Die Ansteuerungssoftware unseres ersten Druckerprototypen limitiert allerdings noch die erreichbare Auflösung auf 160 000 Spots pro (20 × 20) cm² (Abbildung 2c) – weit weniger als die Millionen verschiedener Peptide, die damit herstellbar sein sollten.

Um die partikelbasierte Peptidsynthese genauer zu untersuchen, wurden jeweils auf einer größeren Glasfläche die HA- und Flag-Epitope hergestellt. Die dabei ermittelte repetitive Kupplungsausbeute unserer partikelbasierten Methode lag bei etwa 90 % im Durchschnitt (Abbildung S6), wobei die Integrität der synthetisierten Peptide jeweils durch Massenspektrometrie bestätigt wurde (Abbildungen S9–S11). Diese relativ niedrige Kupplungsausbeute (verglichen mit der Standard-Fmoc-Synthese auf Polymerperlen) kann teilweise dadurch erklärt werden, dass bei unserer partikelbasierten Methode die mit PEG-Oberflächen (Polyethylenglycol) geätzten Glaträger nicht vorgequollen werden können, da die entstehenden DMF-Dämpfe die OPC-Walzen angreifen würden. Als nächstes konnten wir ausschließen, dass unsere neuartigen festen Lösungsmittel und die für die Kupplungsreaktion verwendete Hitze zu einer Racemisierung der L-Aminosäuren führt (Abbildung S7). Unsere Daten bestätigen die Ergebnisse von Schüttler et al., die bei Kupplungstemperaturen von 90 °C für die nah verwandten Fmoc-Aminosäure-OPep-Ester ebenfalls keine Racemisierung nachweisen konnten.^[11] Obwohl weder unsere massenspektrometrischen Daten noch die HPLC-Daten auf größere Probleme mit anderen durch Hitze hervorgerufene Nebenreaktionen hinweisen (Abbildungen S7, S9, S10, S11), werden wir dies in der Zukunft noch näher untersuchen. Zu unserer Überraschung zeigte keiner der in die Tonerpartikel eingeschlossenen Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester einen messbaren Zerfall bei 25 °C, mit der Ausnahme von Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp, das mit 5 % pro Monat zerfiel (Abbildung S5). Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis, da Carbonsäure-aktivierte Fmoc-Argininderivate in

anderen Lösungsmitteln notorisch instabil sind.^[12] Schließlich haben wir einen Peptidarray mit 5500 Varianten der Flag- und Myc-Epitope auf einem Glasobjektträger (2.6 cm × 7.6 cm) synthetisiert (Abbildung 3; 400 Peptide pro cm²). Nach Färben mit den entsprechenden Antikörpern ergab dieser Array das erwartete Färbemuster, das mit den von anderen publizierten Daten übereinstimmt (Abbildung 3 und Abbildung S8).^[13]

Wir berichten hier über die kombinatorische Synthese von hochdichten Peptidarrays mithilfe eines eigens entwickelten Laserdruckers, der 20 Aminosäuretoner in aufeinander folgenden, frei kombinierbaren Druckebenen verdrukt. Eine Variante dieser Methode, die einen Mikrochip verwendet, um individuelle Pixelelektroden mit elektrisch geladenen Aminosäurepartikeln zu bedecken, ermöglicht dagegen bisher nur eine beschränkte Kombinatorik.^[14] Das Kennzeichen unserer partikelbasierten Methode ist das zwischenzeitliche „Einfrieren“ der aktivierten Aminosäurederivate in festen Partikeln (Abbildung 1). Dieser Schritt erlaubt es uns, die einzelnen Aminosäure-Tonerpartikel separat zu produ-

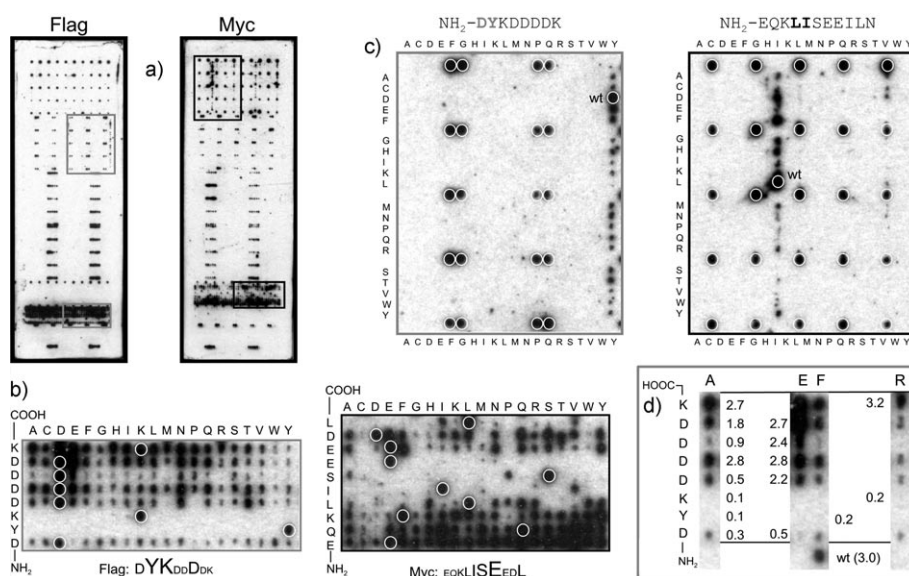


Abbildung 3. Kombinatorische Synthese eines Peptidarrays. In ihrer Sequenz variierte Flag- und Myc-Epitope wurden nacheinander mit Antigen-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (ECL-Auslese). a) Glasobjektträger mit ca. 5500 durch kombinatorische Synthese hergestellten Peptiden, gefärbt mit Flag- oder Myc-Antikörpern. Regelmäßig eingefügte Positivkontrollen (umrahmte Spots entsprechen dem Wildtyp-Epitop) und einige reaktive Peptidvarianten sind klar sichtbar. Die eingefügten Rahmen entsprechen den daneben vergrößert dargestellten Bereichen. b) Charakterisierung der Flag- und Myc-Epitope. Bei beiden Epitopen wurde jede Aminosäureposition gegen alle 20 Aminosäuren ausgetauscht, um die Bindungsanforderungen der epitopspezifischen Antikörper zu untersuchen. Die von diesen Experimenten abgeleitete Epitopspezifität ist in der darunter geschriebenen Peptidsequenz zusammengefasst, wobei die Größe der einzelnen Buchstaben die Wichtigkeit dieser Aminosäure für die Bindung des Antikörpers symbolisiert. Die von uns gefundenen Bindungsspezifitäten der 9E10- und Flag-M2-Antikörper stimmen mit den von anderen publizierten Ergebnissen überein.^[13] c) Die zwei fett gedruckten Positionen der Peptidepitope wurden gleichzeitig variiert. Eingestreute Wildtyp-Sequenzen sind umrandet. Die N-terminale Asparaginsäure des Flag-Epitops kann gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden, während das benachbarte Tyrosin für die Bindung des Flag-M2-Antikörpers unverzichtbar ist. Das Isoleucin des Myc-Epitops kann nur durch Valin ersetzt werden, während das benachbarte Leucin weniger wichtig für die Antikörperbindung ist. Die Resultate dieser komplexeren Aminosäureaustausche stimmen mit den in (b) gezeigten Versuchen überein. d) Vergleich der Färbintensität der Flag-Epitopvarianten mit dem Flag-M2-Antikörper von (b) mit den von anderen publizierten relativen Affinitäten,^[13] die neben die gefärbten Spots geschrieben wurden.

zieren und sie rigoros zu reinigen. Diese „Synthesepakete“ können monatelang im Peptiddrucker bei Raumtemperatur aufbewahrt und je nach Bedarf in hoher Auflösung verdruckt werden. Erst danach wird die Kupplung der Aminosäuren an den Träger gestartet – einfach durch Schmelzen der gesamten Schicht von 20 unterschiedlichen Aminosäurepartikeln. Dadurch vermeidet unsere partikelbasierte kombinatorische Synthese von Peptidarrays die Nachteile der (zu) vielen Kupplungszyklen, während sie gleichzeitig schnell (Sekunden für den Druckvorgang gegenüber Stunden für das Spotten), flexibel, kostengünstig und robust ist (Abbildung S5). Damit sollte es unser Peptiddrucker zum ersten Mal ermöglichen, ganze Genome von pathogenen Bakterien in überlappende Peptide zu übersetzen und diese nach pathogenspezifischen Antikörpern zu durchsuchen.

Eingegangen am 7. April 2008,
veränderte Fassung am 9. Mai 2008
Online veröffentlicht am 31. Juli 2008

Stichwörter: Aminosäure · Biotechnologie ·
Hochdurchsatzverfahren · Kombinatorische Chemie · Peptide

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.
- [2] a) R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84–86; b) U. Reineke, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *Curr. Opin. Bio-*

- technol.* **2001**, 12, 59–64; c) H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 3998–4002.
- [3] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, 354, 82–84.
- [4] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, 48, 9217–9232.
- [5] A. Dikmans, U. Beutling, E. Schmeisser, S. Thiele, R. Frank, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, 25, 1069–1080.
- [6] R. J. Lipshutz, S. P. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 20–24.
- [7] a) J. P. Pellois, X. Zhou, O. Srivannavit, T. Zhou, E. Gulari, X. Gao, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 922–926; b) S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767–773.
- [8] J. Jones in *Oxford Chemistry Primers* (Hrsg.: J. Jones), Oxford University Press, Oxford, **2002**, S. 1–92.
- [9] P. M. Borsenberger, D. S. Weiss in *Handbook of Imaging Materials*, 2nd ed. (Hrsg.: A. S. Diamond, D. S. Weiss), Marcel Dekker, New York, **2002**, S. 369–423.
- [10] M. Beyer, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff, F. Breitling, V. Stadler, *Biomaterials* **2006**, 27, 3505–3514.
- [11] A. Schüttler, W. Meltzow, J. Föhles, H. Zahn, *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.* **1976**, 357, 741–744.
- [12] M. H. S. Cezari, L. Juliano, *Pept. Res.* **1996**, 9, 88–91.
- [13] a) K. Hilpert, G. Hansen, H. Wessner, G. Küttner, K. Welfle, M. Seifert, W. Höhne, *Protein Eng.* **2001**, 14, 803–806; b) J. W. Sloatstra, D. Kuperus, A. Plückthun, R. H. Meloen, *Mol. Diversity* **1997**, 2, 156–164.
- [14] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, V. Stadler, F. Breitling, *Science* **2007**, 318, 1888.