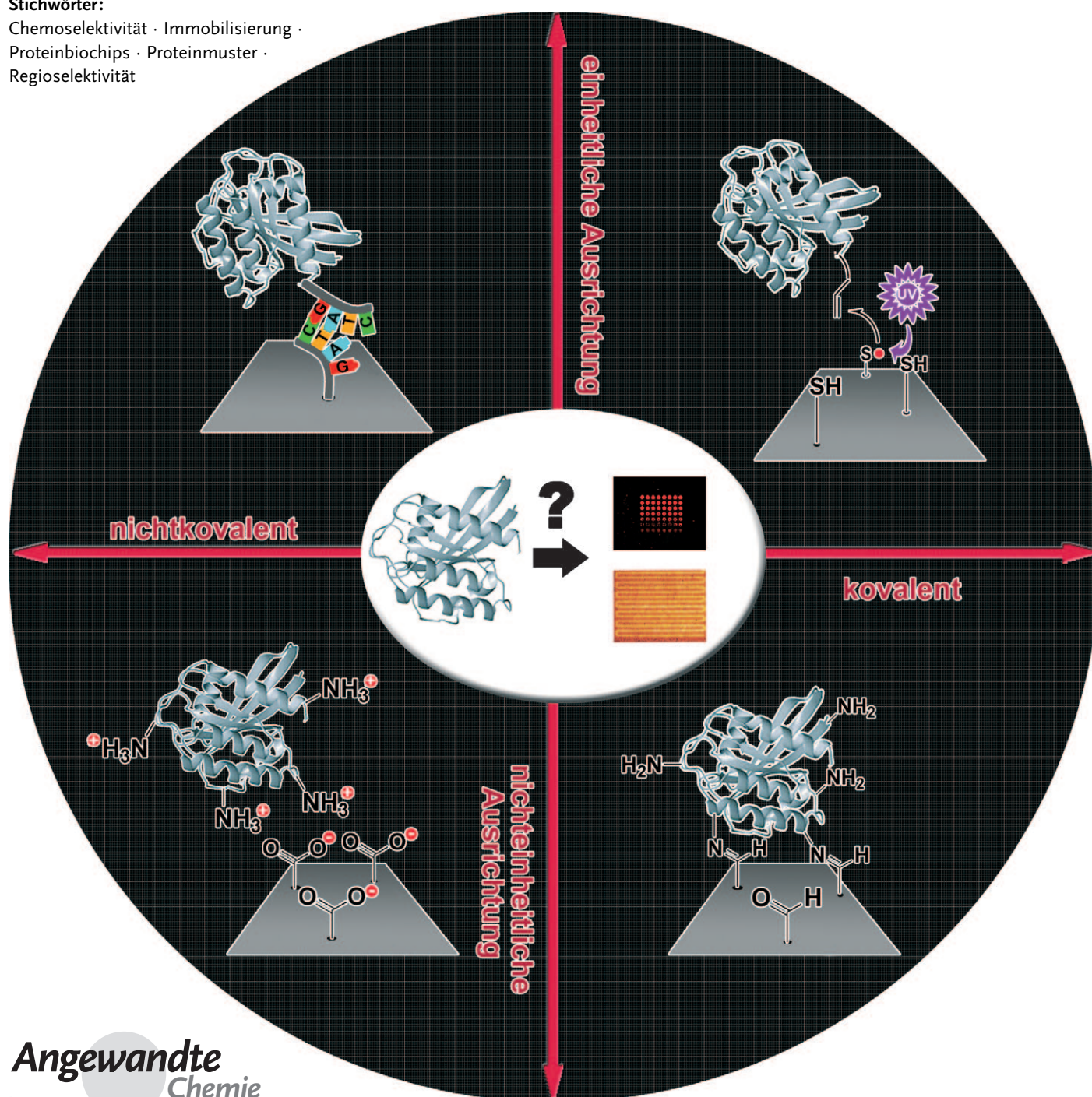


Chemische Verfahren zur Herstellung von Proteinbiochips

Pascal Jonkheijm, Dirk Weinrich, Hendrik Schröder, Christof M. Niemeyer* und Herbert Waldmann*

Stichwörter:

Chemoselektivität · Immobilisierung · Proteinbiochips · Proteinmuster · Regioselektivität



Proteinbiochips sind integrale Bestandteile einer wachsenden Zahl medizinischer und bioanalytischer Anwendungen, weshalb das Interesse an Methoden zur Proteinimmobilisierung für die Herstellung solcher Chips in den letzten Jahren stark gestiegen ist. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über chemische Verfahren zur kovalenten und nichtkovalenten Anbindung von Proteinen auf Oberflächen, wobei ein spezielles Augenmerk auf chemische Selektivität und die Erhaltung der Proteinfunktion bei der Immobilisierung gelegt wird. Ferner werden Strategien zur Herstellung strukturierter Proteinoberflächen umrissen. Abschließend wird ein Ausblick auf mögliche Entwicklungsrichtungen im Bereich der Proteinbiochipforschung und -anwendung gegeben.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	9763
2. Chemische Aktivierung von Oberflächen	9764
3. Strategien zur Proteinimmobilisierung	9770
4. Zusammenfassung und Ausblick	9786

1. Einleitung

Proteinmikroarrays und Proteinbiochips ermöglichen die schnelle Kartierung kompletter Proteinwechselwirkungsnetzwerke.^[1] Mithilfe der Technik, die ursprünglich für die Herstellung von DNA-Mikroarrays entwickelt wurde, können Proteinmikroarrays mit Tausenden von Proteinen hergestellt werden. Wird ein Proteinbiochip z.B. mit einer biologischen Probelösung inkubiert, können Proteine aus der Probelösung an Proteine auf der Chipoberfläche binden und später identifiziert werden. Mit solchen Proteinbiochips lassen sich Protein-Protein- oder auch Protein-Wirkstoff-Wechselwirkungen, für die zuvor nur biochemische Methoden wie Western Blotting und Immunassays (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) zur Verfügung standen, schnell und umfassend untersuchen. Müssen Proteine einer biologischen Probe, die an Proteine des Mikroarrays binden, identifiziert werden, können Methoden wie Fluoreszenzbildgebung oder Massenspektrometrie eingesetzt werden. Trotz dieses augenscheinlichen Potenzials wurden Proteinbiochips bis auf wenige Ausnahmen nur bedingt, z.B. in der Wirkstoffforschung, eingesetzt.^[2–10]

Zwar bringt der Einsatz von DNA-Mikroarraytechnologie zur Herstellung von Proteinmikroarrays Vorteile mit sich, z.B. dass nur geringe Mengen möglicherweise teurer Proteine für ihre Herstellung benötigt werden, allerdings ist der Übergang von DNA-Mikroarrays zu Proteinmikroarrays nicht trivial: Die Herstellung von Proteinmikroarrays erfordert eine größere Zahl von Arbeitsschritten, ist generell durch größere Komplexität gekennzeichnet, und die Immobilisierung und/oder chemische Modifizierung von Proteinen kann wegen ihrer Empfindlichkeit leicht zu (teilweiser) Denaturierung führen.^[11,12]

Zusätzliche Triebkräfte für die Entwicklung von Proteinbiochips gehen von verwandten biotechnologischen Forschungsgebieten aus, z.B. der Biosensorik, der Biokatalyse und der Bioanalytik. Auf diesen Gebieten wächst die Nachfrage nach Oberflächen mit definierten, möglichst präzisen Proteinmustern im Nanometerbereich.^[13–16] Die Miniaturisierung wird auch durch die Erfordernisse komplexer Schnittstellen wie jener zwischen biologischen und technischen Systemen vorangetrieben.^[17,18]

Entscheidend für die Funktionsfähigkeit eines Proteinbiochips ist die Wahl einer geeigneten Kombination aus Chipoberfläche und Immobilisierungsstrategie. Diese muss kompatibel zu möglichst vielen Proteinen sein und deren native Konformation sowie biologische Funktion auf der Chipoberfläche aufrechterhalten können.^[19,20] Ferner sollte die chemische Selektivität der Immobilisierung steuerbar sein (d.h., es sollte kontrollierbar sein, welche funktionellen Gruppen des Proteins an der Immobilisierung beteiligt sind). Außerdem sollte die Regioselektivität steuerbar sein (d.h., es sollte bestimmbar sein, ob eine oder mehrere Proteinorientierungen auf der Oberfläche möglich sind).^[21–25] Eine einstufige Strategie ist gegenüber Strategien zu bevorzugen, die mehrere Stufen oder eine umfangreiche Proteinfunktionalisierung im Vorfeld der Immobilisierung erfordern.^[9,26]

Proteinarrays werden in der Regel durch Aufbringen von Proteinen mit Kontakt- oder Nichtkontakt-Druckverfahren, die aus der gängigen Hochdurchsatzproduktion von DNA-Mikroarrays bekannt sind, auf chemisch aktivierte Glasobjektträger hergestellt.^[27,28] Für die Erzeugung von Proteinmustern oder nanometergroßen Proteinarrays wurden komplexere Methoden zur Musterbildung entwickelt, deren Herkunft im Bereich der Nanotechnologie und der Materialtechnik liegt.^[29] Zum Beispiel ermöglicht die Dip-Pen-Nanolithographie (DPN) die Herstellung winziger Strukturen und kleiner Proteinchips, da auf diese Weise reaktive Gruppen in höherer Dichte auf die Chipoberfläche aufgebracht

[*] Dr. P. Jonkheijm, Dipl.-Chem. D. Weinrich, Prof. Dr. H. Waldmann
Abteilung Chemische Biologie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
und Fakultät für Chemie
Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund
Otto Hahn Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-Mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Dr. H. Schröder, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
Fakultät für Chemie, Biologisch-Chemische Mikrostrukturierung
Technische Universität Dortmund
Otto Hahn Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-Mail: christof.niemeyer@tu-dortmund.de

werden können als durch konventionelle Druckverfahren.^[30–32]

Die Entwicklung geeigneter Detektionsmethoden für die Auswertung von Proteinbiochips ist ebenfalls entscheidend für deren optimale Nutzung. Viele analytische Methoden, z. B. Fluoreszenzbildgebung, Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) und Massenspektrometrie, wurden für den Einsatz im Proteinbiochipbereich angepasst; für deren Beschreibung stehen exzellente Übersichtsartikel zur Verfügung.^[2–10,33,34] In diesem Aufsatz diskutieren wir das Zusammenspiel von chemischen, biologischen und nanotechnologischen Strategien zur Herstellung von Proteinbiochips. Zunächst werden generelle Methoden zur chemischen Funktionalisierung von organischen und anorganischen Oberflächen für eine anschließende Proteinimmobilisierung beschrieben. In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über verschiedene Strategien zur Proteinimmobilisierung gegeben, wobei nach Einheitlichkeit der Proteinorientierung auf der Oberfläche unterschieden wird.



Pascal Jonkheijm, geboren 1978 in Vogelwaarde (Niederlande), promovierte 2005 bei E. W. (Bert) Meijer an der TU Eindhoven und war bis 2008 Alexander von Humboldt-Stipendiat in der Gruppe von Herbert Waldmann am MPI in Dortmund. Derzeit ist er als Träger des niederländischen VENI-Preises Gruppenleiter am Mesa+-Institut für Nanotechnologie der Universität Twente. Seine Forschungsgebiete umfassen die supramolekulare Chemie, molekulare Nanofabrikation und Proteinmusterbildung.



Dirk Weinrich, geboren 1980 in Berlin, studierte Chemie an der TU Berlin mit den Schwerpunkten organische Chemie, technische Chemie und Biochemie und erhielt 2005 das Diplom mit einer Arbeit über photoschaltbare Peptide und spurlos abspaltbare Ankergruppen in der Arbeitsgruppe von Karola Rück-Braun. Derzeit ist er Doktorand mit dem Forschungsschwerpunkt Proteinbiochips in der Arbeitsgruppe von Herbert Waldmann am MPI in Dortmund.



Hendrik Schröder promovierte 2002 an der Universität Bremen in der Arbeitsgruppe von Dieter Wöhrle in organischer Chemie. Bis 2005 arbeitete er bei der Chimera Biotec GmbH im Themenbereich Biochips und ist derzeit Postdoktorand in der Gruppe von Christof M. Niemeyer an der TU Dortmund. Seine wissenschaftlichen Interessensgebiete umfassen die Oberflächenchemie sowie die Mikroarray- und Nanobiotechnologie.

2. Chemische Aktivierung von Oberflächen

Die Leistungsfähigkeit eines Proteinbiochips hängt stark von der Immobilisierungsmethode ab. Hierfür sind besonders wichtig:

- a) die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Chipoberfläche, da diese die spezifische und unspezifische Anbindung des Zielpoteins wie auch anderer Proteine beeinflussen,
- b) die Entfernung zwischen immobilisiertem Protein und der Chipoberfläche,
- c) die Orientierung des immobilisierten Proteins, da diese einen entscheidenden Einfluss auf dessen Fähigkeit haben kann, große Analyte, z. B. andere Proteine, zu binden,
- d) die Dichte der immobilisierten Proteine auf der Chipoberfläche, die die Empfindlichkeit und die Nachweisgrenze des Proteinbiochips bestimmt.

Die Wahl einer geeigneten Oberfläche für die Herstellung von Proteinbiochips wird von der vorgesehenen Anwendung bestimmt. Zum Beispiel werden Goldoberflächen häufig bei der Entwicklung von Biosensoren mit elektrochemischer Detektion oder Detektion durch SPR verwendet,^[34] da sie sich durch eine hohe elektrische Leitfähigkeit wie auch durch eine leichte chemische Funktionalisierbarkeit, z. B. durch einfache Chemisorption von thiofunktionierten Molekülen, auszeichnen. Dagegen werden Glas- oder Siliciooberflächen wegen ihrer – im Fall von Glas – Transparenz und ihrer niedrigen intrinsischen Fluoreszenz üblicherweise für Anwendungen mit optischer Detektion bevorzugt. Generell sind diese Oberflächen gekennzeichnet durch hohe chemi-



Christof M. Niemeyer studierte Chemie an der Universität Marburg und promovierte bei Manfred T. Reetz am MPI für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr. Nach einem Postdoktorat am Center for Advanced Biotechnology in Boston (USA) bei Charles R. Cantor habilitierte er sich 2002 an der Universität Bremen und hat derzeit den Lehrstuhl für Biologisch-Chemische Mikrostrukturierung an der TU Dortmund inne. Zu seinen Forschungsgebieten zählen die Chemie von Biokonjugaten und deren Anwendung in den Lebenswissenschaften, der Katalyse und der molekularen Nanotechnologie. Er ist Gründer der Chimeira Biotec GmbH.



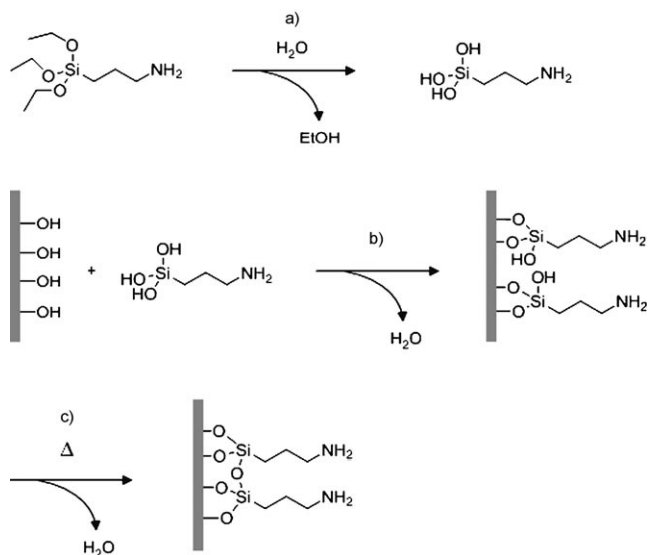
Herbert Waldmann promovierte 1985 bei Horst Kunz an der Universität Mainz in organischer Chemie und war anschließend Postdoktorand bei George Whitesides an der Harvard University. Er war Professor für organische Chemie an den Universitäten Bonn (1991) und Karlsruhe (1993) und ist nun Direktor am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund sowie Professor für organische Chemie an der TU Dortmund (1999). Sein wissenschaftliches Interesse gilt der chemischen Biologie unter Einsatz kleiner Moleküle, Proteinsonden und der Mikroarraytechnologie.

sche Homogenität und Stabilität, kontrollierbare Oberflächeneigenschaften wie Polarität und Benetzbarkeit, Modifizierbarkeit mit einer Vielzahl funktioneller Gruppen sowie eine hohe Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifizierung.

2.1. Planare Chipoberflächen

2.1.1. Funktionalisierung von Glasoberflächen

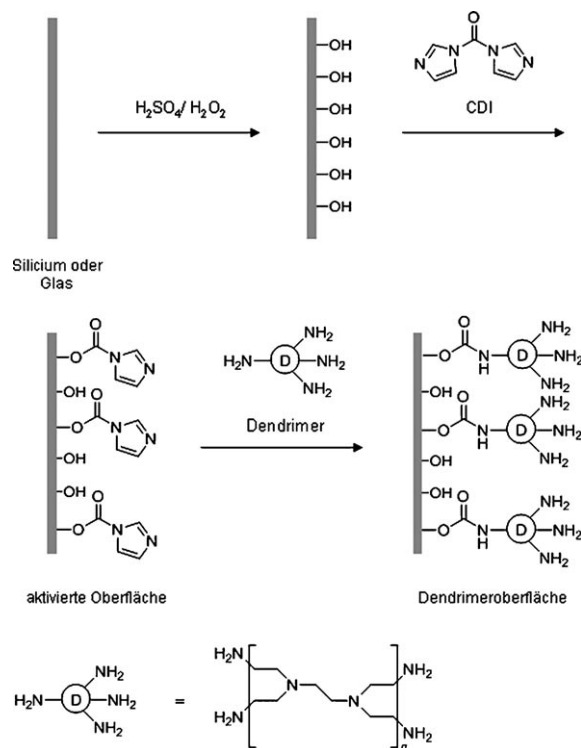
Für DNA-Mikroarrays werden bevorzugt Glasobjektträger verwendet, da sie über eine transparente, glatte, chemisch modifizierbare, nichtporöse und stabile Oberfläche verfügen und leicht erhältlich sind.^[35–37] Es wurden bereits vielzählige Methoden zur chemischen Funktionalisierung von Glasoberflächen für die Herstellung von DNA-Mikroarrays und Wirkstoffmikroarrays veröffentlicht.^[28,38,39] Hauptsächlich werden reaktive Silanolfunktionen (SiOH) an der Glasoberfläche genutzt, die durch Behandlung der Oberfläche z. B. mit Piranhalösung ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$) oder Sauerstoffplasma erzeugt werden. Im Anschluss werden neue funktionelle Gruppen durch Reaktion mit Organosilanen $(\text{RO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ oder Trichlorsilanen eingeführt.^[40] Eine große Zahl kommerziell erhältlicher Silanreagentien ermöglicht die Einführung von Amin-, Thiol-, Carbonsäure- oder Epoxidresten, die nachfolgend für eine weitergehende Funktionalisierung eingesetzt werden können.^[40–42] Schema 1 zeigt den postulierten Verlauf der Organosilanfunktionalisierung von Glasoberflächen.^[41–45] Eingeleitet wird die Funktionalisierung durch eine Hydrolyse der Alkoxygruppen der Organosilanverbindung, die abhängig von der vorhandenen Wassermenge sowohl in Lösung als auch an der Glasoberfläche stattfinden kann.^[43,45] Ein Überschuss an Wasser führt zu einer übermäßig starken Polyme-



Schema 1. Postulierter Mechanismus der Silanisierung mit Amino-propyltriethoxysilan (APTES): Auf die Hydrolyse der reaktiven Alkoxygruppen (a), die in Lösung oder an der Oberfläche geschehen kann, folgt die Kondensation mit Silanolresten an der Oberfläche (b). Thermisches Aushärten des resultierenden Films führt zu weiterer Vernetzung (c).^[41–45]

isation in Lösung, während aus einem Wassermangel unvollständige Monoschichten auf der Oberfläche resultieren.^[43,44] Ferner wurden Methoden veröffentlicht, die auf der Abscheidung von Silanen aus organischen Lösungsmitteln, aus wässrigen Systemen oder aus der Gasphase wie auch auf der Dampfabscheidung (chemical vapor deposition, CVD) von Silanen basieren.^[46]

Dendrimere sind Moleküle mit stark verzweigten, baumähnlichen Strukturen, deren äußerste Schicht eine hohe Dichte an funktionellen Gruppen aufweist und die daher zur Erhöhung der Dichte von funktionellen Gruppen an Oberflächen eingesetzt werden können. Dendritische Strukturen können entweder durch In-situ-Synthese mit multifunktionalen Anker-molekülen an Oberflächen erzeugt^[47] oder vorab synthetisiert und anschließend auf Oberflächen immobilisiert und dort modifiziert werden. Beispiele für verwendete Strukturen sind Polyamidoamin-,^[46,48,49] Phosphan-^[50] oder Poly(propylenimin)-Dendrimere.^[51] Im Allgemeinen wird die zweite Immobilisierungsstrategie (Schema 2) bevorzugt, da

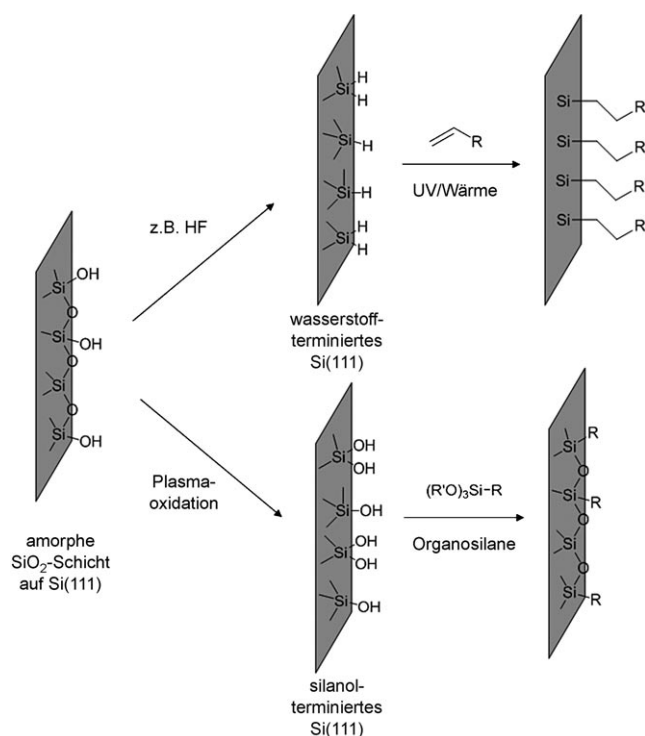


Schema 2. Herstellung dendrimerfunktionalisierter Chips mit Poly(propylenimin)-Dendrimern: Eine Glas- oder Siliciumoberfläche wird mit Piranhalösung gereinigt und mit z. B. Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert. Dendrimere können anschließend über periphere Aminfunktionen immobilisiert werden.^[51]

eine In-situ-Synthese an Oberflächen zu geringeren Ausbeuten und in der Folge zu einer geringeren Zahl an verfügbaren funktionellen Gruppen führen kann. In einer systematischen Untersuchung konnten Pathak et al. zeigen, dass die Aktivität von ungerichtet auf Glas immobilisierter alkalischer Phosphatase durch Verwendung von Poly(propylenimin)-Dendrimern an der Glasoberfläche erhöht werden kann.^[51]

2.1.2. Funktionalisierung von Silicioberflächen

Außer Glas wird auch Silicium zur Herstellung von Biochips verwendet. Wegen seiner hohen elektrischen Leitfähigkeit, der chemischen Widerstandsfähigkeit gegen Lösungsmittel, der hohen mechanischen Stabilität und einer niedrigen Eigenfluoreszenz kommt Silicium in Form von Wafern in großer Menge in der Halbleiterindustrie zum Einsatz. Eine einfache chemische Funktionalisierung wird jedoch durch Oxidation von Silicium durch Luftsauerstoff unter Bildung einer amorphen Siliciumoxidschicht erschwert. Um an Silicioberflächen Si-C-Bindungen erzeugen zu können, müssen sie zum einen vorbehandelt werden, um diese Oxidschicht zu entfernen und zum anderen für anschließende Reaktionen aktiviert werden (Schema 3). Die



Schema 3. Beispiele für die Funktionalisierung von Si(111): Si(111) bildet an der Luft eine amorphe Oxidschicht. Umsetzung mit HF erzeugt eine wasserstoffterminierte Silanoberfläche, die im Anschluss z. B. mit ω -funktionalisierten Alkenen umgesetzt werden kann. Durch Behandlung mit Sauerstoffplasma erhält man eine Silanolschicht an der Si(111)-Oberfläche, die z. B. mit Organosilanen funktionalisiert werden kann.^[41, 52]

Vorbehandlung erfolgt z. B. mit HF. Eine so erhaltene wasserstoffterminierte Si(111)-Oberfläche wird im weiteren Verlauf mit UV-Strahlung oder durch Erwärmung aktiviert und mit ω -funktionalisierten Alkenen zur Reaktion gebracht.^[52] Eine alternative Strategie besteht in der Oxidation von Silicioberflächen mit Plasma, sodass diese im Anschluss, analog zu Glasoberflächen, mit Organosilanen funktionalisiert werden können.^[41] Jüngst wurden auch Methoden zur Funktionalisierung anderer Oberflächenmaterialien wie Silicate (Glimmer) oder Metalloxide entwickelt, die für eine

Reihe spezieller Anwendungen, z. B. für Implantate (Titan, Tantal, Niob) oder elektrische Funktionseinheiten (Indiumzinnoxid, Indium Tin Oxide, ITO; Diamant), von Interesse sind. ITO wurde unter Einsatz von Silanchemie^[53, 54] und Elektropolymerisation^[55, 56] funktionalisiert, während Diamantoberflächen über Photoimmobilisierungsmethoden funktionalisiert wurden.^[57] Im Fall von Glimmer erfolgte die Funktionalisierung außer mit Silanchemie auch mit Polyelektrolyten.^[58–60] Für Titan, Tantal und Niob^[61, 62] wurde ferner der Einsatz selbstorganisierender Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) von thiofunktionalisierten Molekülen und Phosphonaten vorgestellt.^[63, 64]

2.1.3. Funktionalisierung von Goldoberflächen

Goldoberflächen finden in der Biosensorik breite Verwendung. Sie lassen sich leicht mit SAMs^[65, 66] von ω -funktionalisierten Thiolen, Disulfiden und Sulfiden funktionalisieren; die Qualität dieser SAMs hängt jedoch stark von der Kristallmorphologie der Metalloberfläche ab. Au(111) liefert Monoschichten mit der höchsten Dichte und Homogenität und kommt daher am häufigsten zum Einsatz. Au(111)-Oberflächen werden durch Auftragen dünner Goldfilme auf poliertes Glas, Silicium oder frisch gespaltenen Glimmer hergestellt.^[65, 66] Eine Methode zur Herstellung von Goldfilmen ist die thermische Abscheidung von Gold auf einem Siliciumwafer, wobei eine Zwischenschicht von Chrom oder Titan die Haftung des Goldfilms auf der Silicioberfläche erhöht. Gleichmäßige Goldoberflächen können außerdem mithilfe der Template-Stripping-Methode (Aufkleben einer auf Glimmer aufgedampften Goldschicht auf ein Glas- oder Siliciumsubstrat, gefolgt von Ablösung des Glimmers) z. B. unter Einsatz von Glimmer erzeugt werden.^[67] Die Chemie der Gold-Thiol-Wechselwirkung wurde intensiv erforscht. Die Funktionalisierung von Goldoberflächen mit Monoschichten ist wesentlich leichter steuerbar als die Organosilanchemie, die für andere Oberflächen eingesetzt wird. Zur Herstellung von Monoschichten werden Thiole, Sulfide oder Disulfide in einem ausreichend reinen Lösungsmittel (im Allgemeinen Ethanol oder Wasser) gelöst und nachfolgend auf zuvor gereinigte Goldoberflächen aufgebracht. In Abbildung 1 ist eine Thiolmonoschicht auf Gold dargestellt. Übersichtsartikel zur Herstellung und Anwendung von SAMs wurden in jüngerer Vergangenheit veröffentlicht.^[65, 66]

Über die Wechselwirkung der SAM mit Proteinen entscheiden die endständigen funktionellen Gruppen der heterodifunktionellen Thiolverbindungen. Hierfür ist eine Vielzahl verschieden funktionalisierter Thiole erhältlich. Während kleine endständige Gruppen nur wenig Einfluss auf die Orientierung und Packungsdichte der Monoschicht haben, können sterisch anspruchsvolle Endgruppen oder gekuppelte Moleküle, wie Proteine, die Packungsdichte deutlich verringern. Sterisch anspruchsvolle endständige funktionelle Gruppen oder große, an die Monoschicht gebundene Moleküle wie Proteine können die Packungsdichte der Thiole verringern. Um diesen Effekt zu mindern, werden zunehmend Monoschichten mit einer Mischung verschieden funktionalisierter Monomere für die Immobilisierung von Biomolekülen verwendet.^[68]

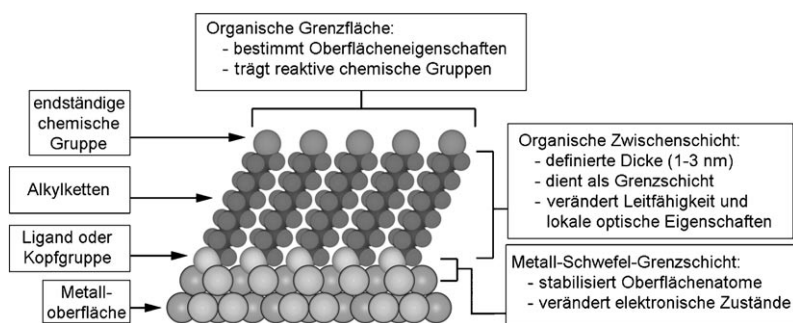
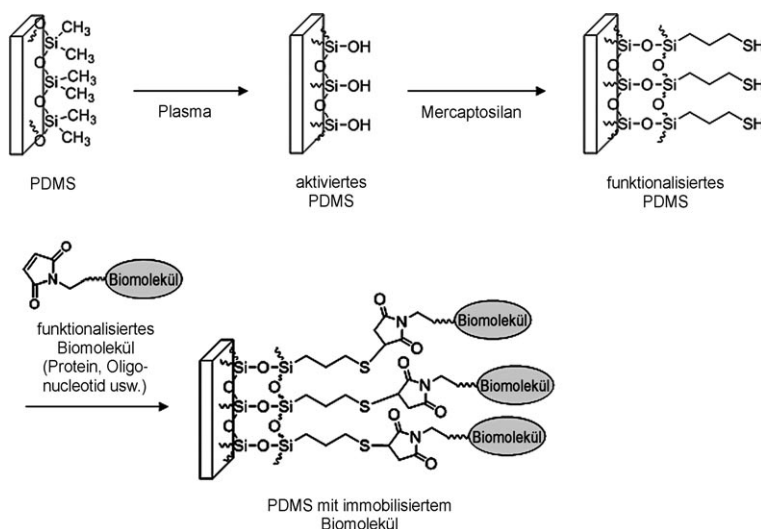


Abbildung 1. Ideale SAM von terminal funktionalisierten Alkylthiolaten auf einer Gold-(111)-Oberfläche. Die Alkylketten zeigen die charakteristische gekippte Orientierung.^[66] Wiedergabe mit Genehmigung der ACS.

Eine Mischung von ω -funktionalisierten Alkanthiolen und kurzkettigen, nichtfunktionalisierten Thiolen minimiert die sterische Hinderung in der Monoschicht, die durch die Immobilisierung großer Biomoleküle auftritt. Für eine derartige Mischung kann eine zufällige Verteilung beider Monomere in der Monoschicht angenommen werden, wenn diese keine Entmischungstendenz zeigt.^[69] Ein großer Nachteil von Au-Thiol-SAMs ist die hohe Beweglichkeit der Thiolmoleküle auf der Goldoberfläche, die die Lebensdauer des Chips begrenzt.^[65,66] Ein weiterer Nachteil ist ihre Empfindlichkeit gegen Photooxidation.^[70] Diese Empfindlichkeit ist andererseits jedoch für die Photolithographie auf Au-Thiol-SAMs nutzbar.^[70]

2.1.4. Funktionalisierung von Polymeroberflächen

Polymeroberflächen bieten sich als mögliche Alternativen zu anorganischen Oberflächen an. Ihre niedrigen Herstellungskosten machen sie besonders für kommerzielle Anwendungen interessant; ein Beispiel ist Polystyrol, das für



Schema 4. Beispiel für die chemische Funktionalisierung von PDMS: Eine PDMS-Oberfläche wird mit Plasma oxidiert und mit einem Thiolsilan funktionalisiert. Die PDMS-Thiol-Oberfläche kann nachfolgend für die Immobilisierung von Biomolekülen, z. B. maleimidfunktionalisierten Proteinen oder Oligonucleotiden, eingesetzt werden.^[78]

ELISA-Anwendungen meistgenutzte Material.^[71-74] Die Herstellung einer großen Zahl von mikrostrukturierten Bauteilen, z. B. Mikrofluidikchips, geht ebenfalls von Polymermaterialien aus, darunter Polydimethylsiloxan (PDMS), Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polycarbonat (PC). Diese Bauteile können je nach gewünschter Anwendung geformt und mit gängiger Mikroarrayausrüstung verwendet werden.^[75-77] Da diese Polymermaterialien jedoch nicht die notwendigen funktionellen Gruppen für die Immobilisierung von Proteinen aufweisen, ist vor ihrem Einsatz als Chipmaterial eine chemische Funktionalisierung notwendig.^[78,79] Zu diesem Zweck

kann PDMS durch Plasmaoxidation aktiviert und nachfolgend mit Organosilanen funktionalisiert werden (Schema 4) (z. B. mit Mercaptosilanen, um thiolmodifiziertes PDMS zu erhalten).^[78] PMMA kann mit Hexamethyldiamin aminiert werden, um so eine für die Immobilisierung von Proteinen geeignete Oberfläche zu erhalten.^[79] PC wurde durch Sulfonierung der Oberfläche mit Sulfatgruppen funktionalisiert.^[79]

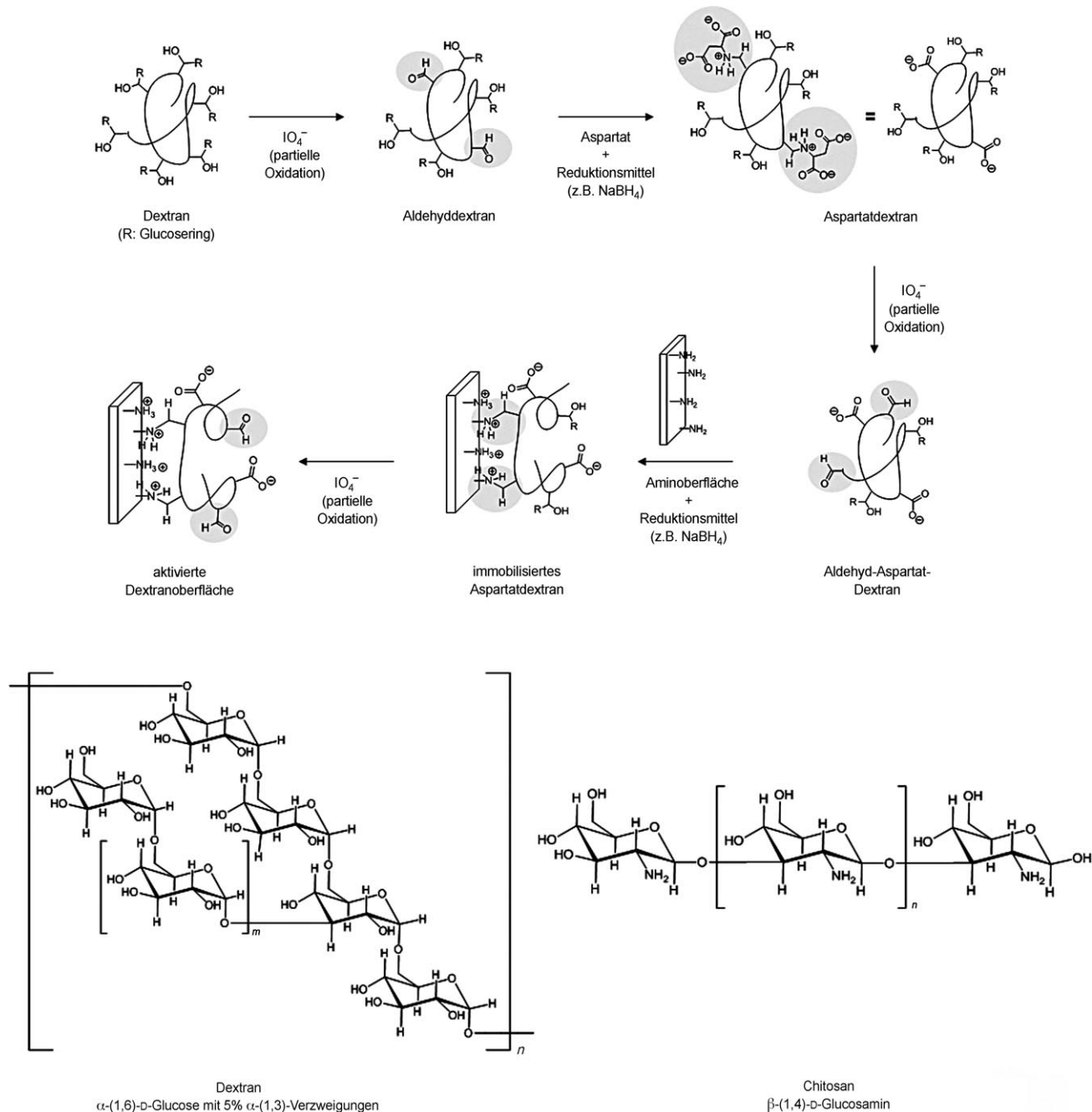
2.2. Chips mit dreidimensionalen Matrices

Außer klassischen, zweidimensionalen Chipmaterialien werden auch poröse, dreidimensionale Matrices, z. B. Hydrogele oder Polymermembranen, für die Herstellung von Proteinbiochips eingesetzt. Diese Matrices ermöglichen die Diffusion von Proteinen und bieten eine homogene, wässrige Umgebung, die eine Denaturierung von Proteinen verhindern kann. Ihre Nachteile sind oft hohe Hintergrundsignale und Probleme durch Massentransporteffekte.

Nylon und Nitrocellulose sind Beispiele für Membranmaterialien, die für die Immobilisierung von Proteinen eingesetzt werden. Auf Nylon werden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen oder Photovernetzung immobilisiert, auf Nitrocellulose vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen.^[41] Nylon ist darüber hinaus mechanisch stabiler und hat eine höhere Bindungskapazität für Proteine als Nitrocellulose. Mit Glas als Träger kann die mechanische Stabilität von Membranen erhöht werden. Dies ermöglicht eine Verkleinerung der Spotgröße von 0.5–1 mm auf 25–200 μm und macht die Membranen so konkurrenzfähig zu anderen Mikroarraymaterialien.^[36,80] Anodisch oxidiertes, poröses Aluminium ist ein weiteres Mikroarraymaterial, dessen dreidimensionale Struktur eine gezielte Durchmischung von Probenlösungen in Vertiefungen an der Chipoberfläche ermöglicht und die Nachweisempfindlichkeit in den resultierenden Mikroarrays erhöht.^[81] Es ist außerdem mechanisch stabil und kann z. B. leicht mit Organosilanen funktionalisiert werden.

Polymerhydrogele sind hydrophile Matrices, die die Diffusion von Proteinen ermöglichen und die Bindungskapazität von Proteinchips um zwei Größenordnungen gegenüber der von zweidimensionalen Oberflächen erhöhen.^[82,83] Stabile Chipoberflächen werden durch kovalente Anbindung der Gele an das Trägermaterial erhalten. Ein Gel aus einer Mischung von Agarose und Acrylamid kann z. B. durch Photopolymerisation auf einer Chipoberfläche, die mit Acrylgruppen funktionalisiert ist, immobilisiert werden.^[82,83] Wird das immobilisierte Gel mit Hydrazin oder Ethylendiamin umgesetzt, wird ein aminfunktionalisiertes Gel erhalten.^[84,85]

Ferner werden Polysaccharide wie Chitosan oder Dextran für die Immobilisierung von Proteinen eingesetzt. Chitosan ist ein natürliches, aminfunktionalisiertes, nichtgiftiges und biologisch abbaubares Polysaccharid, das wegen seiner pH-abhängigen Eigenschaften sowohl auf Glas immobilisiert werden als auch Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen binden kann. Dextran ist ein komplexes, verzweigtes Polysaccharid mit verschiedenen langen Ketten von Glucosemolekülen, deren Hydroxygruppen zu Aldehyden oxidiert und im Anschluss kovalent auf aminfunktionalisierten Oberflächen immobilisiert werden können (Schema 5). Mit



Schema 5. Dextranoberflächen: Dextran wird mit Periodat zu Aldehyddextran oxidiert, aus dem nach weiterer Umsetzung mit Aspartat und Periodat aldehyd- und aspartatfunktionalisiertes Dextran erhalten wird. Dieses kann über Reduktion auf aminfunktionalisierten Oberflächen kovalent immobilisiert werden. Nach einer weiteren Oxidation mit Periodat wird ein negativ geladenes, aldehydfunktionalisiertes Polymer erhalten, das reaktiv gegen Proteine ist.^[41]

dieser Methode wird die Oberfläche von Biacore-Chips hergestellt.^[136] Nicht umgesetzte Aldehydfunktionen ermöglichen im weiteren Verlauf die Immobilisierung von Proteinen. Abbildung 2 zeigt den Einsatz von lysinfunktionalisiertem

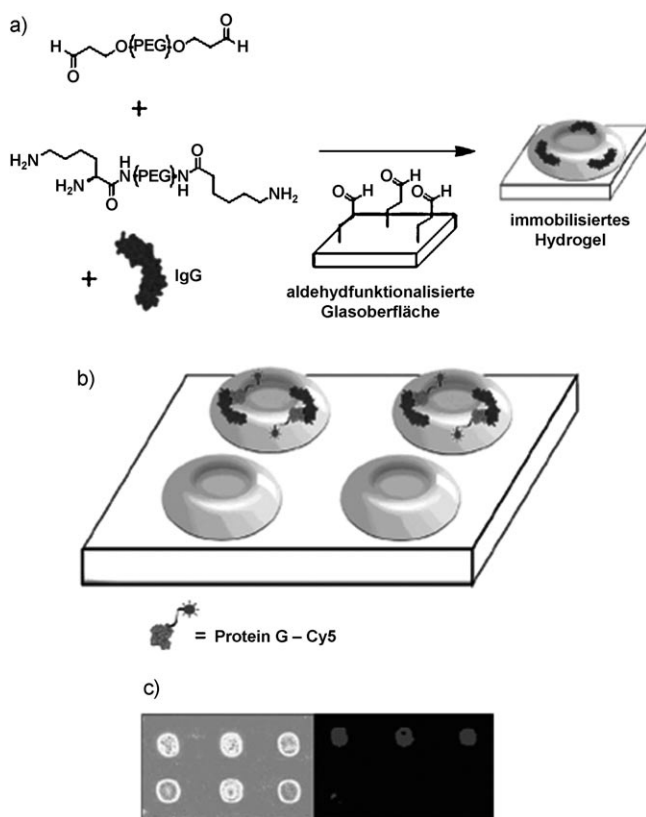


Abbildung 2. a) Hydrogeltropfen aus einer Mischung von aldehyd- und lysinfunktionalisierten PEGs werden auf aldehydbeschichteten Glsträgern aufgetragen, um immobilisierte Geltaschen zu erhalten, in denen z. B. IgG eingeschlossen werden kann. b) Inkubation des Hydrogelarrays mit Cy5-funktionalisiertem Protein G ermöglicht den Nachweis von IgG in entsprechenden Geltaschen. c) Optische Aufnahmen (links) und Fluoreszenzaufnahmen (rechts) der Geltaschen, deren Durchmesser bei etwa 200 μm liegt. Nur die obere, IgG enthaltende Reihe zeigt Fluoreszenz.^[86] Wiedergabe mit Genehmigung der ACS.

Polyethylenglycol (PEG) als Gelmaterial für Aldehydoberflächen, auf denen im Anschluss Immunglobulin (IgG) immobilisiert und detektiert werden kann.^[86] Supramolekulare Hydrogele aus glycosylierten Aminosäuren fanden erst kürzlich als Oberflächenmaterial für Proteinarrays Verwendung.^[87] Weiterhin wurden biologisch abbaubare Copolymer-Polyester aus L- und D-Milchsäure sowie Glycolsäure als Oberflächenmaterialien für biologische Anwendungen eingesetzt.^[88]

2.3. Minimierung unspezifischer Anbindung von Proteinen

Während die unspezifische Bindung bei DNA-Mikroarrays gut kontrollierbar ist, ist sie bei Proteinmikroarrays ein

großes Problem. Da Nucleinsäuren negativ geladen sind, ist ihre unspezifische Adsorption an Oberflächen leichter zu unterdrücken als die von Proteinen. Proteine können durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen (elektrostatische, Van-der-Waals-, Lewis-Säure-Base- oder hydrophobe Wechselwirkungen, oft verbunden mit Konformationsänderungen) unspezifisch an Oberflächen adsorbieren.^[89,90] In vielen Mikrotiterplattenassays werden diese Wechselwirkungen genutzt, um Proteine (z. B. Antikörper) über unspezifische Adsorption zu immobilisieren. Allerdings kann es nach der ursprünglichen, gewünschten Proteinimmobilisierung zu ungewollter unspezifischer Adsorption anderer Proteine z. B. aus biologischen Probenlösungen kommen. Die Minimierung dieser ungewollten Adsorption ist entscheidend für niedrige Signal/Rausch-Verhältnisse und somit für die Qualität der Assays. Eine möglichst geringe unspezifische Adsorption ist jedoch auch generell ein wichtiger Faktor nicht nur für Anwendungen wie ELISA und verwandte Proteindetektionsassays,^[91] sondern auch für Proteinmikroarrays.

Unspezifische Adsorption wird durch die Wahl eines geeigneten Oberflächenmaterials, z. B. natürlicher Oberflächenmaterialien wie Elastin,^[92] Sarcosin,^[93] Agarose,^[94] Cellulose^[95] oder durch Polysaccharide,^[93,96] reduziert. Synthetische Materialien, wie Fluorkohlenstoffpolymere,^[97,98] Polyethylenglycol,^[99,100] Polyvinylalkohol^[101,102] oder Polyelektrolyte,^[100,103,104] werden ebenfalls eingesetzt; auch Polyethylenglycolderivate kommen zur Anwendung.^[105–107] Eine elegante Studie von Whitesides und Prime zeigte, dass kristallin-helicale und amorphe Monoschichten von Oligoethylenglycol-funktionalisierten Alkanthiolaten auf Gold resistent gegen Proteinadsorption sind.^[108]

Man nimmt an, dass die Hydrophilie der Ethylenglycolschicht für die Unterdrückung der unspezifischen Proteinadsorption verantwortlich ist.^[109] Die Empfindlichkeit von Ethylenglycolschichten gegen Autoxidation verhindert jedoch einen Einsatz über längere Zeiträume. Phospholipide wurden ebenfalls als Oberflächenmaterial genutzt. Es wird vermutet, dass elektrostatische Wechselwirkungen zu einer starken Hydratation der Phospholipidschicht und somit zur Unterdrückung von unspezifischer Proteinadsorption führen.^[109] Die geringe Stabilität von z. B. Phosphorylcholinmonoschichten begrenzt jedoch ihre Einsetzbarkeit. Whitesides et al. nutzten Alkylthiolatmonoschichten mit Osmolyten (organische Verbindungen, die die Osmose beeinflussen) und Kosmotropen (organische Verbindungen, die die Stabilität von H₂O-H₂O-Wechselwirkungen erhöhen), wie Betain, Taurin oder Hexamethylphosphoramid, zur Herstellung von Oberflächen mit verbesserter Widerstandsfähigkeit gegen unspezifische Proteinadsorption. Man nimmt an, dass die bevorzugte Verdrängung der an der Oberfläche immobilisierten Moleküle aus der Lösungsdomäne eines Proteins dessen unspezifische Adsorption an die Oberfläche verhindert (Abbildung 3).^[110] Trotz der Effizienz der genannten Oberflächenmodifikationen sind herkömmliche Blockierreagentien, wie Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA) oder Milchpulver, sowie Detergentien, wie Tween 20 oder Natriumdodecylsulfat (SDS), oft weiterhin unabdingbar für die effektive Verhinderung einer unspezifischen Proteinadsorption.^[72]

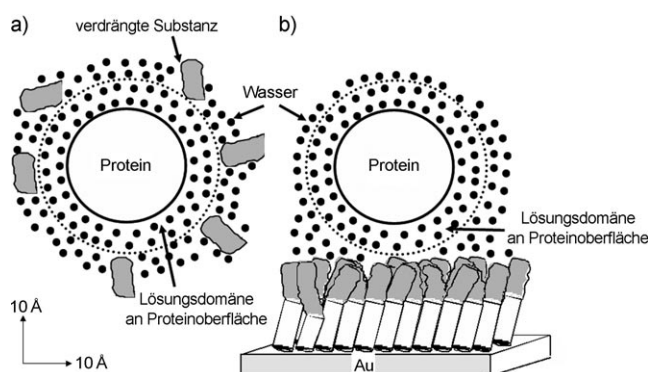


Abbildung 3. Proteinabweisende Oberflächen: Gelöste Substanzen, die vorzugsweise aus der Lösungsdomäne um ein Protein verdrängt werden, verursachen verstärkte Hydratation des Proteins (a). Werden Oberflächen mit Substanzen dieser Art funktionalisiert, minimiert dies (unspezifische) Proteinadsorption (b).^[110] Wiedergabe mit Genehmigung der ACS.

2.4. Einführung von funktionellen Gruppen an Oberflächen

Die Reaktivität eines Chips wird durch die Art der funktionellen Gruppen an seiner Oberfläche bestimmt. Die Menge an Protein, die immobilisiert werden kann, und somit die Nachweisgrenze des Chips hängen von der Dichte der funktionellen Gruppen ab. Werden Proteine direkt an die Oberfläche gebunden, kann es wegen der Nähe zwischen Proteinen und Oberfläche zu einer Veränderung der Protein-konformation und damit der Bindungseigenschaften oder Aktivität der Proteine kommen. Eine Immobilisierung über mehrere Bindungen hinweg kann ferner zu (teilweiser) Denaturierung der Proteine und somit ebenfalls zu Aktivitätsverlusten führen. Abstandhalter (Spacer), die zwischen Protein und Chipoberfläche eingeführt werden können, reduzieren diese Effekte. Diese Abstandhalter können nahezu beliebig lang sein und beliebige chemische Eigenschaften haben. Starre oder flexible, hydrophile oder hydrophobe sowie geladene oder neutrale Moleküle sind verwendbar.^[42,111] Auch programmierbare Abstandhalter sind denkbar (siehe Abschnitt 3.2.1.4 über DNA-dirigierte Immobilisierung von Proteinen).

Die Modifizierung einer Oberfläche mit Abstandhaltern ermöglicht die Einführung vielfältiger funktioneller Gruppen. Abstandhalter tragen zwei gleichartige (homodifunktionell) oder zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen (heterodifunktionell). Am häufigsten eingesetzt werden homodifunktionelle Abstandhalter, die mit aminfunktionalisierten Chipoberflächen reagieren können. Beispiele für diesen Typ sind Glutaraldehyd, 1,4-Butandiolglycidylether, 1,4-Phenylendiisothiocyanat, Dimethylsuberimidat, Divinylsulfon, Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, Disuccinimidylcarbonat oder Terephthaldialdehyd (Tabelle 1). Im Fall von thiofunktionalisierten Chipoberflächen kann 2,2'-Dipyridyldisulfid eingesetzt werden, das an der Oberfläche Thiopyridyldisulfide bildet. Diese reagieren nachfolgend mit Cysteinresten von Proteinen unter Bildung von Disulfidbrücken. Hydroxyfunktionalisierte Oberflächen können mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert werden und stehen so für die Im-

mobilisierung von Proteinen zur Verfügung. Homodifunktionelle Abstandhalter können jedoch auch Gruppen verknüpfen, die sich beide auf der Oberfläche oder am Protein in direkter Nachbarschaft befinden; diese Gruppen stehen nachfolgend für die Proteinimmobilisierung nicht mehr zur Verfügung oder können (falls es sich um Gruppen am Protein handelt) zu einer Beeinträchtigung der Aktivität führen. Dieses Risiko wird durch Ringöffnungs- oder heterodifunktionelle Abstandhalter umgangen. Tabelle 1 zeigt einige Beispiele für käufliche Verbindungen, z.B. Glutarsäureanhydrid oder SMCC und SIAB, die sowohl eine thiolreaktive als auch eine aminreaktive Funktionalität enthalten.

3. Strategien zur Proteinimmobilisierung

Die gewählte Immobilisierungsstrategie hat einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften des jeweils erhaltenen Proteinbiochips. Werden nichtmodifizierte Proteine auf aktivierten Oberflächen immobilisiert, führt dies zu einer statistischen Verteilung ihrer Orientierung auf der Oberfläche, die für die Bindungseigenschaften der Proteine von Nachteil sein kann, wenn z.B. aktive Zentren nicht zugänglich sind. Wie in vielen Beispielen gezeigt wurde, waren zwar Antikörper, die auf diese Weise in Arrays immobilisiert wurden, nach der Immobilisierung weiter bindungsfähig; in anderen Fällen führte diese Strategie jedoch zum teilweisen oder vollständigen Verlust der Proteinaktivität oder -bindungsfähigkeit.^[5,10,112,113] Die gerichtete Immobilisierung von Proteinen in einer definierten Orientierung, um z.B. den Zugang zu einem aktiven Zentrum zu ermöglichen, minimiert dieses Risiko. Gerichtete Immobilisierung kann beispielsweise mithilfe chemoselektiver Strategien erfolgen, wie in den folgenden Abschnitten gezeigt werden wird. Es werden zunächst Immobilisierungsstrategien zur nichtgerichteten nichtkovalenten (Abschnitt 3.1.1) wie kovalenten Proteinanbindung (Abschnitt 3.1.2) beschrieben, die zu einer zufälligen Proteinorientierung auf der Oberfläche führen. Ein zweiter Teil umfasst fortgeschrittene Immobilisierungsstrategien zur gerichteten Anbindung, die eine einheitliche Proteinorientierung auf der Oberfläche zur Folge haben. Auch diese sind in Varianten mit kovalenter (Abschnitt 3.2.1) und nichtkovalenter Proteinanbindung (Abschnitt 3.2.2) untergliedert.

3.1. Nichtgerichtete Proteinimmobilisierung

3.1.1. Nichtkovalente Anbindung

Proteine können durch Coulomb-, hydrophobe oder polare Wechselwirkungen an eine Oberfläche adsorbieren, wobei die jeweils vorherrschende Wechselwirkung durch die Oberfläche und das Protein bestimmt wird. Am häufigsten werden Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen ungeordnet auf Polystyroloberflächen immobilisiert. Oberflächen mit positiv geladenen Ammonium- oder negativ geladenen Carboxylatgruppen sind für die Immobilisierung durch elektrostatische Wechselwirkungen am besten geeignet. Auch diese Art der Anbindung ist ungerichtet, da jedes Protein eine Orientierung einnimmt, die die Abstoßungskräfte gegenüber

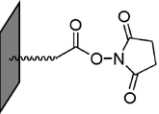
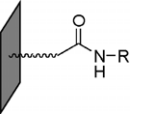
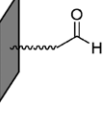
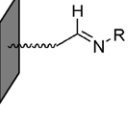
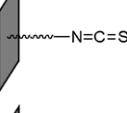
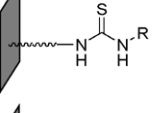
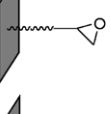
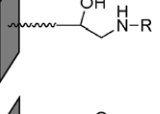
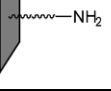
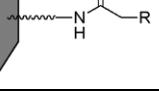
Tabelle 1: Strukturen gängiger Abstandhalter oder Anker-moleküle (SATA, MSA, SADP, PMPI, SMCC, SPDP, SIAB von Pierce).

homodifunktionell		Beispiele für Abstandhalter		heterodifunktionell	
reaktiv gegen Amine		reaktiv gegen Amine		reaktiv gegen Amine	
Glutaraldehyd		Glutarsäureanhydrid			
1,4-Butandiol diglycidylether		SATA (geschütztes Thiol)			
1,4-Phenylendiisothiocyanat		MSA (geschützte Carbonsäure)			
Dimethylsuberimidat		SADP (photoreaktiv)			
Divinylsulfon				reaktiv gegen Amine und Alkohole	
Disuccinimidylcarbonat		PMPI			
Terephthaldialdehyd				reaktiv gegen Amine und Thiole	
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat		SMCC			
		SDPD			
		SIAB			
reaktiv gegen Thiole					
2,2'-Dipyridyldisulfid					
N,N'-Carbonyldiimidazol					

der Oberfläche und anderen adsorbierten Proteinen minimiert. Beide Strategien kommen häufig im Zusammenhang mit dreidimensionalen Matrixmaterialien zum Einsatz. Adsorptionsmechanismen von mit Polyanilin modifizierten Polypropylenmembranen beruhen z. B. sowohl auf hydrophoben wie auch auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Diese Membranen sind für die Immobilisierung einer Vielzahl von Proteinen einsetzbar.^[85] Die am häufigsten genutzten dreidimensionalen Matrixmaterialien sind jedoch Hydrogele auf Gold, die in Biacore- oder anderen SPR-Systemen zum Einsatz kommen.^[114,136] Hydrogele aus sulfatfunktionalisiertem Dextran binden wegen der hohen Dichte an geladenen funktionellen Gruppen Proteine besser als cellulose- oder aspartatfunktionalisiertes Dextran. Nitrocellulosemembranen auf Glas werden ebenfalls häufig verwendet, da ihre Eignung für die Immobilisierung von Proteinen aus anderen Anwendungsgebieten wie Western Blotting oder diagnostischen Membransystemen bekannt ist.^[115,116]

Proteine können über Chemisorption von Cysteineitenketten direkt auf Gold immobilisiert werden.^[117,118] Nach der Immobilisierung sollten jedoch freie Bereiche der Goldoberfläche passiviert werden. Es ist keine vorherige Funktionalisierung der Proteine notwendig, allerdings ist die Bindungskapazität der Oberfläche begrenzt. Der direkte Kontakt der Proteine zur Metalloberfläche kann außerdem zu Denaturierung und Aktivitätsverlusten führen. Wird eine Monoschicht als Zwischenschicht eingeführt, kann diese die Bindungskapazität der Chipoberfläche erhöhen und die Beeinträchtigung der Proteinaktivität verringern (Abschnitt 2.1.3). Antikörper werden häufig auf Chipoberflächen mit negativ geladenen Nanopartikeln immobilisiert, die ihrerseits durch DPN,^[119] Ätzen^[120] oder Kolloidolithographie^[121] hergestellt werden. Zur Immobilisierung von Antikörpern werden auch Chipoberflächen mit Anordnungen von einheitlich orientierten, hydrophilen Polymeren oder von Block-Copolymeren mit hydrophilen Bereichen genutzt.^[122–125]

Tabelle 2: Varianten der ungerichteten, kovalenten Proteinimmobilisierung.

immobilisierte Funktion	Funktion am Protein	Produkt
NHS-Ester ^[126–130]	 H_2NR	 Amid
Aldehyd ^[7, 9, 131–138]	 H_2NR	 Imin
Isothiocyanat ^[99]	 H_2NR	 Thioharnstoff
Epoxid ^[133, 139, 140]	 H_2NR	 Aminoalkohol
Amin ^{[121, 157] [a]}	 $\text{HO(O)CCH}_2\text{R}$	 Amid

[a] Mit Kupplungsreagens (z. B. CDI).

3.1.2. Kovalente Anbindung

Proteine können über die funktionellen Gruppen ihrer Aminosäureseitenketten kovalent an Chipoberflächen gebunden werden. Tabelle 2 zeigt einige gängige Strategien, während geeignete Oberflächenfunktionalisierungen bereits in Abschnitt 2 beschrieben wurden. Eine Vielzahl von chemisch aktivierten Oberflächen, die zum Teil auch unspezifische Proteinadsorption unterdrücken, sind kommerziell erhältlich. Diese Art der Immobilisierung führt jedoch zu einer statistischen Verteilung der Proteinorientierungen auf der Chipoberfläche und kann daher die Proteinaktivität beeinträchtigen, wenn z. B. aktive Zentren nicht zugänglich sind. Viele dieser Strategien wurden ursprünglich in der Biacore-Technik eingesetzt. Diese ermöglicht eine zuverlässige In-situ-Detektion von z. B. Protein-Protein-Wechselwirkungen. Allerdings ist auch die Verwendung von Molekülen in Biacore-Systemen möglich, die Proteine nichtkovalent binden (siehe Abschnitt 3.2).^[136]

3.1.2.1. Immobilisierung über Amine

Für die ungerichtete, kovalente Immobilisierung von Proteinen wird am häufigsten die Aminogruppe der Aminosäure Lysin verwendet. Wegen des relativ häufigen Vorkommens von Lysin in Proteinen (> 10 %) besteht jedoch das Risiko, dass Proteine zum einen verstärkt in unterschiedlicher Orientierung und zum anderen auch über mehrere Bindungen hinweg immobilisiert werden; beides kann ihre Aktivität auf der Chipoberfläche beeinträchtigen. Für diese Art der Immobilisierung werden meist *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester genutzt, die mit Aminen unter Bildung von Peptidbin-

dungen reagieren.^[126–130] Die Effizienz der Immobilisierung hängt von mehreren Parametern wie pH-Wert, Konzentration, Ionenstärke und Reaktionszeit ab, die allesamt optimiert werden müssen. NHS-Ester sind hinreichend reaktiv und hydrolysestabil, wenn die Reaktion unter Standardbedingungen, d. h. typischerweise in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) bei pH 7.3 und Raumtemperatur, durchgeführt wird. Aldehydoberflächen kommen ebenfalls häufig zum Einsatz. Die sich bildenden, hydrolyselabilen Iminbindungen zwischen Protein und Chipoberfläche werden durch Reduktion mit z. B. Natriumborhydrid unter Bildung sekundärer Amine stabilisiert.^[131–133]

Eine der ersten Mikroarrayanwendungen mit Immobilisierung von Proteinen durch Aminogruppen (Lysinreste oder NH_2 -Terminus) auf Aldehydoberflächen wurde von MacBeath und Schreiber entwickelt.^[134] Dieses System war im Vorfeld häufig in Biacore-Systemen eingesetzt worden.^[136] Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem Protein G und Immunglobulin G, zwischen immobilisiertem Protein p50 und einem Inhibitor sowie zwischen einer immobilisierten FRB-Domäne (FK-bindend, Protein-Rapamycin-bindend) und einem anderen Protein wurden auf einem Mikroarray detektiert.^[134] Seitdem wurde häufig auf diese Strategie zur Immobilisierung von Proteinen auf verschiedenen Oberflächen zurückgegriffen.^[7, 9, 135, 136]

Gordus et al. stellten SH2/PTB-Mikroarrays auf Aldehydoberflächen her und setzten diese ein, um ein quantitatives Proteinwechselwirkungsnetzwerk der ErbB-Rezeptoren zu erstellen (Abbildung 4).^[137] Aldehydfunktionalisierte Monoschichten auf Gold wurden zur Herstellung von Mikrostrukturen cytophiler Proteine verwendet.^[138] Einer anderen Strategie folgend wurden Isothiocyanatoberflächen zur Immobilisierung von Proteinen über Aminogruppen eingesetzt.^[99] Epoxidfunktionalisierte Oberflächen werden genutzt, da sie sich durch ihre Stabilität in neutralen, wässrigen Systemen und durch ihre Reaktivität auszeichnen. Man nimmt an, dass die Reaktion der Epoxide an der Oberfläche mit den Aminogruppen der Proteine über einen zweistufigen Mechanismus abläuft, in dessen Verlauf es zunächst zu einer schnellen Proteinadsorption und anschließend zu einer intermolekularen Bindungsknüpfung kommt. Untersuchungen mit einigen kommerziell erhältlichen Epoxidoberflächen zeigten, dass die Immobilisierung nur bei hoher Ionenstärke zufriedenstellend ist, bei der jedoch viele Proteine nicht stabil sind.^[133, 139, 140] Kürzlich wurden die Leistungen einiger kommerziell erhältlicher Chipoberflächen für den Einsatz in Antikörpermikroarrays verglichen.^[141–145]

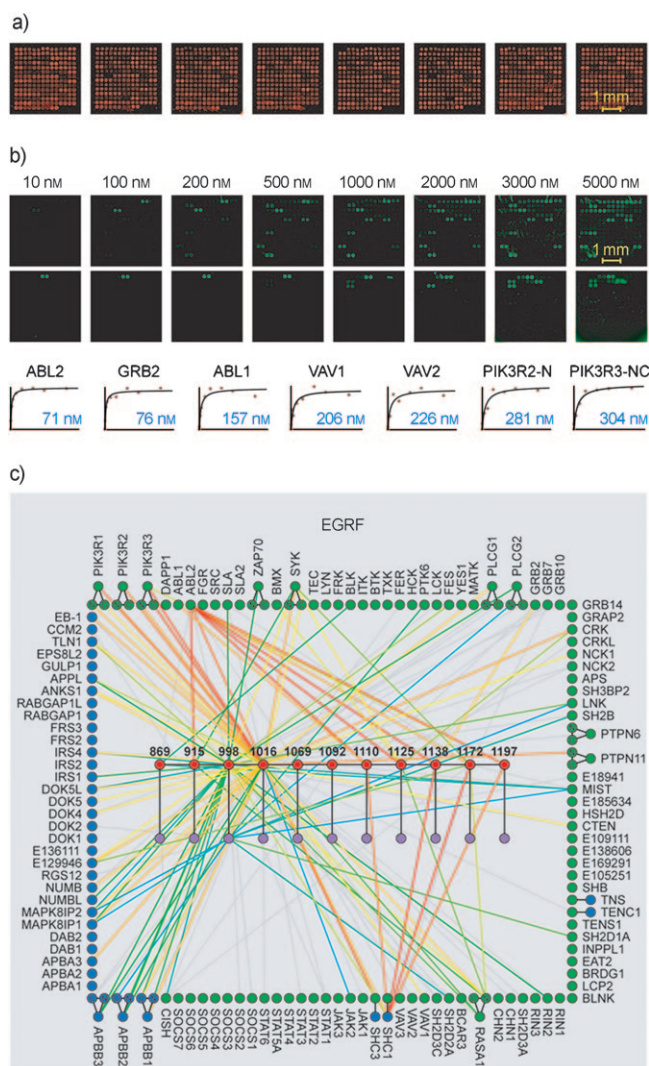


Abbildung 4. a) SH2/PTB-Proteinmicroarrays zur Erstellung eines quantitativen Wechselwirkungsnetzwerks der ErbB-Rezeptoren: 159 SH2- und PTB-Domänen werden als Mikroarrays in den Vertiefungen von aldehydfunktionalisierten Mikrotiterplatten immobilisiert (sichtbar gemacht durch vorherigen Zusatz von 5% Cy5-markiertem BSA). b) Nach Inkubation mit 66 durch 5- und 6-Carboxytetramethylrhodamin [5(6)-TAMRA] funktionalisierten, die ErbB-Bindungsstellen repräsentierenden Phosphopeptiden wird eine Proteinwechselwirkungsanalyse durchgeführt, und an die Daten wird ein Bindungsmodell angepasst (repräsentative Abbildungen). c) Mithilfe der erhaltenen Daten können quantitative Proteinwechselwirkungsnetzwerke für die vier menschlichen ErbB-Rezeptoren erstellt werden (EGFR, repräsentative Abbildung).^[137] Wiedergabe mit Genehmigung von *Nature*.

Eine weitere Strategie setzt auf die lokale Aktivierung von Carbonsäuren auf Chipoberflächen. Durch Mikrokontaktdruck^[146] und Mikrostempeln^[147] wurden so Muster von Carbonsäuregruppen auf Chipoberflächen erzeugt, an denen Laminin und Fibronectin immobilisiert werden. Mit Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) wurden gezielt aldehydfunktionalisierte Thiole in Monoschichten eingeführt und nachfolgend Strukturen von IgG und Metalloproteinen hergestellt.^[148–151] Mirkin et al. erzeugten mit der Dip-Pen-Nanolithographie nanometergroße Anordnungen

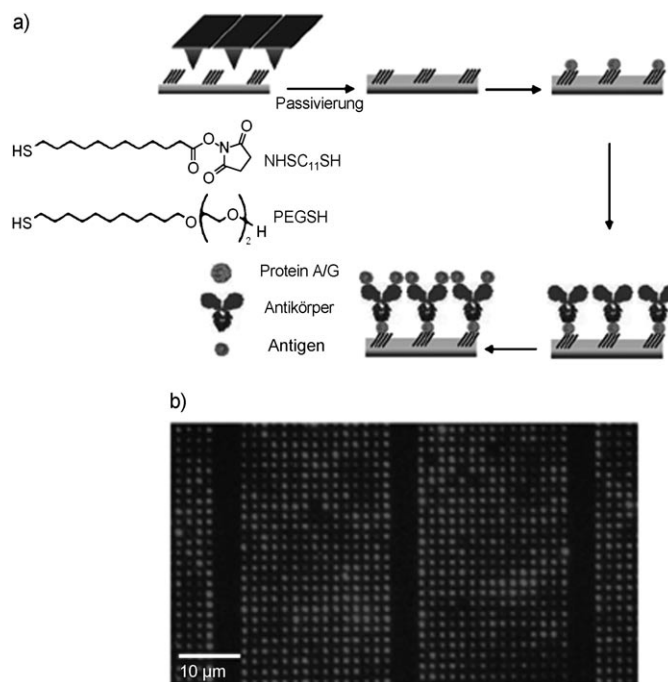


Abbildung 5. Herstellung eines funktionalen Antikörpernanoarrays mit DPN: a) Mit einem 26-Stift-DPN-Array wird auf einer Goldoberfläche ein Nanoarray aktivierter Alkylthiolate erzeugt. Die übrige Oberfläche wird nachfolgend mit einer PEG-Thiol-Verbindung passiviert. Danach wird Protein A/G immobilisiert. Durch Inkubation mit humanem Anti-β-Galactosidase-IgG wird ein Antikörpernanoarray erhalten. b) Detektion des Nanoarrays mit Alexa-594-markierter β-Galactosidase.^[152]

aktivierter Carbonsäuren, auf denen Protein A oder G immobilisiert wurden. Diese konnten ihrerseits zur Immobilisierung von IgG über die Fc-Region verwendet werden, um so Antikörpernanoarrays zu erhalten (Abbildung 5).^[152–155] Mit einem auf diese Weise hergestellten Anti-β-Galactosidase-IgG-Array wurde fluoreszenzmarkierte β-Galactosidase immobilisiert und so die biologische Aktivität des Arrays und des Zielproteins nachgewiesen.^[152, 153]

In einem weiteren Beispiel wurden Alkylthiole einer Monoschicht auf Gold mit einem Nahfeld-Rastermikroskop (near-field scanning microscope, SNOM) gezielt in schwächer gebundene Alkylsulfonate umgewandelt. Diese konnten nachfolgend von CDI-aktivierten Carboxythiolen verdrängt werden,^[156] die ihrerseits zur Immobilisierung von Proteinen genutzt wurden. Auf diese Weise wurden Nanostrukturen von Proteinen des Lichtsammelkomplexes von weniger als 100 nm Breite erzeugt.^[156]

3.1.2.2. Immobilisierung über Carbonsäuren

Die Immobilisierung von Proteinen über Carbonsäuren bietet eine Alternative zur Anbindung über Amine, da Aspartat und Glutamat bei den meisten Proteinen die häufigsten Aminosäurereste auf der Oberfläche sind. Mithilfe milder Kupplungsmethoden, z.B. durch Verwendung von CDI, können Carbonsäurereste an der Außenseite von Proteinen aktiviert und diese dann auf Aminoberflächen immobilisiert werden.^[157] Auf diese Weise wurden mikrometergroße Qua-

drate fluoreszierender Proteine auf mit plasmaverstärkter chemischer Dampfabscheidung (plasma enhanced chemical vapour deposition, PECVD) hergestellten, aminfunktionalisierten Oberflächen hergestellt.^[121] Es besteht jedoch das Risiko einer Reaktion der aktivierten Carbonsäuren mit den auf Proteinen omnipräsenten Aminogruppen, die zur Beeinträchtigung der Aktivität der Proteine oder zu einer Vernetzung der Proteine untereinander führen kann.

3.1.2.3. Photoreaktive Oberflächen

Fodor et al. gelang ein Durchbruch für die Analyse ganzer Genome, indem sie photolabile Schutzgruppen für die ortsgesteuerte Oligonucleotidsynthese auf Chipoberflächen einführten.^[158] Nachfolgend wurden auch Oligopeptidarrays mit hoher Probandichte hergestellt,^[158, 159] allerdings ist die Synthese ganzer Proteine mit dieser Methode nahezu unmöglich. Diese Arbeit stimulierte aber die Entwicklung photochemischer Methoden zur direkten Immobilisierung von Proteinen.^[160] Zwei wichtige Vorteile photochemischer Methoden sind die Möglichkeit, Proteine ohne vorherige chemische Modifizierung zu immobilisieren, und die freie Bestimmbarkeit von Form und Größe der zu erzeugenden Proteinmuster. Es besteht jedoch das Risiko der Denaturierung oder Beschädigung der zu immobilisierenden Proteine durch Nebenreaktionen. Die meisten photochemischen Reaktionen können unter milden Bedingungen und unabhängig von pH-Wert oder Temperatur durchgeführt werden. Für ihre Auslösung ist meist Licht mit $\lambda \approx 350$ nm ausreichend, das von der Mehrheit der Biomoleküle nicht absorbiert wird. Die Lichtaktivierung startet definierte chemische Prozesse, an deren Ende die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Proteinen und der Oberfläche steht.

Um photoreaktive Oberflächen herzustellen, werden typische photoreaktive Reste, z.B. Arylazid-, Diazirin-, Benzophenon- oder Nitrobenzylreste (Tabelle 3), die auch bei der Photoaffinitätsmarkierung^[161] oder als photolabile Schutzgruppen eingesetzt werden, auf einer Oberfläche immobilisiert. Die Photolyse von Arylaziden erzeugt reaktive Nitrene, die in C-H-Bindungen inserieren können, jedoch auch eine Tendenz zur schnellen intramolekularen Ringexpansion zeigen; dabei entstehen hochelektrophile Verbindungen, die nur langsam inserieren. Solche unerwünschten Ringexpansionen können durch Verwendung von Perfluorphenylaziden (PFPA) minimiert werden, da die Fluorsubstitution aromatischer Systeme die Geschwindigkeit der Ringvergrößerung verringert. Aus Diazirinen entstehen unter Bestrahlung mit Licht Carbene, die innerhalb von Mikrosekunden kovalente Bindungen mit Proteinen eingehen und so eine Proteinim-

Tabelle 3: Überblick über verschiedene photoreaktive Substituenten und heterodifunktionelle Abstandhalter.^[161–171]

	photoreaktive funktionelle Gruppen	heterodifunktionelle Abstandhalter
Arylazid		
Diazirin		
Benzophenon		
Azidophenylalanin		
Disulfid		
Nitrobenzyl ^[a]		

[a] Photoabspaltbare Schutzgruppe.

mobilisierung bewirken. Sigrist et al. immobilisierten auf diese Weise alkalische Phosphatase und Antikörper, die beide nach der Photoimmobilisierung noch aktiv waren.^[162, 163] Mithilfe eines SNOM konnten eine Diazirinoberfläche lokal aktiviert und 500 nm breite Linien von BSA erzeugt werden, deren Aktivität jedoch nicht überprüft wurde.^[164] Die Verwendung von Nitrobenzylgruppen ermöglicht das Schützen einer reaktiven funktionellen Gruppe, z.B. einer Aminogruppe, die nachfolgend durch Bestrahlung mit UV-Licht gezielt wieder entschützt werden kann und so weiteren Reaktionen zur Verfügung steht. Benzophenone sind Vorstufen von Ketylradikalen, die kovalente Bindungen zu Proteinen bilden. Dies wurde von Fodor, Schultz et al. für die photolithographische Immobilisierung von IgG auf benzophenonfunktionalisierten Glasoberflächen demonstriert.^[165] Heterodifunktionelle, photoreaktive Abstandhalter können über eine erste reaktive chemische Gruppe an Oberflächen gebunden werden, danach erfolgt eine Immobilisierung von Proteinen durch eine zweite Gruppe. Eine der beiden Reaktionen wird dabei photochemisch ausgelöst.^[163, 166–168] Ein Beispiel ist die Immobilisierung einer Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) auf Perfluortetradecansäurefunktionalisierten Dünnschichten, die zuvor photochemisch mit heterodifunktionellen NHS-Abstandhaltern funktionalisiert wurden.^[169] Ligler et al. beschrieben die photochemische Oxidation von Thiolen zu Sulfonaten auf Chipoberflächen und die nachfolgende Immobilisierung von IgG auf nicht bestrahlten Teilen der Oberfläche.^[170] Petersen et al. nutzten die durch benachbarte aromatische Aminosäuren induzierte, photochemische Spaltung von Disulfidbrücken an Proteinen. Die erhaltenen freien Thiole wurden im Anschluss genutzt, um Proteinspots mit 1 μ m Durchmesser zu erzeugen.^[171]

3.2. Gerichtete Proteinimmobilisierung

3.2.1. Nichtkovalente Anbindung

Die Orientierung eines Proteins auf einer Chipoberfläche kann einen entscheidenden Einfluss auf seine Aktivität oder Bindungsfähigkeit haben, da bei einer ungünstigen Orientierung relevante Stellen auf seiner Oberfläche z.B. für Bindungspartner gegebenenfalls nicht erreichbar sind. Um eine definierte Orientierung von Proteinen auf Chipoberflächen zu erreichen, wurden zuerst Paare aus einem Fusionsprotein und einem Affinitätsreagens verwendet, die ursprünglich für die säulenchromatographische Reinigung von Proteinen entwickelt worden waren. Mit Affinitätsreagentien funktionalisierte Chipoberflächen wurden so für die Immobilisierung entsprechender Fusionsproteine eingesetzt. Der Vorteil der Verwendung von Affinitätsreagentien wie der Glutathion-S-Transferase (GST),^[172] dem Maltose-Bindungsprotein (maltose binding protein, MBP),^[173] dem FLAG-Peptid,^[174] dem Hexahistidin-Tag (His₆)^[175] oder der Dehalogenase^[176–178] gegenüber einer Physisorption oder einer ungerichteten kovalenten Immobilisierung von Proteinen liegt in der Selektivität der Wechselwirkung sowie in der Variabilität von Art und Zahl der nichtkovalenten Wechselwirkungen. Ein weiterer Vorteil ist die Reversibilität der nichtkovalenten Anbindung, da sie es ermöglicht, Chip- oder Sensoroberflächen mehrfach zu verwenden.

3.2.1.1. Nickel-Nitrilotriessigsäure-Oberflächen

Fusionsproteine mit einer GST- und einer Polyhistidinsequenz können in einer Tandemstrategie zunächst über eine Glutathionsäule gereinigt und über die Polyhistidinsequenz nachfolgend auf Nickel-Nitrilotriacetat(Ni-NTA)-Oberflächen immobilisiert werden. In einer aufwändigen Studie stellten Snyder et al. aus 5800 Hefeproteinen, die als Fusionsproteine mit N-terminalem GST-His₆ exprimiert worden waren, Proteinmikroarrays auf Ni-NTA-Chips her und zeigten so die Anwendbarkeit dieses Konzeptes. Die erhaltenen Proteinmikroarrays wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber anderen Proteinen und Phospholipiden hin untersucht. Es konnten nur sechs von zehn erwarteten Proteinwechselwirkungen nachgewiesen werden, allerdings wurde ein gemeinsames Bindungsmotiv einiger Proteine identifiziert.^[22] Der Einfluss der Orientierung der immobilisierten Proteine auf das Ergebnis wurde nicht bestimmt, allerdings wurde die Tatsache, dass Ni-NTA-Mikroarrays eine höhere Signalqualität als Aldehydmikroarrays liefern, auf die einheitliche Orientierung der Proteine auf den Ni-NTA-Mikroarrays zurückgeführt.^[22]

His₆-Sequenzen werden wie GST standardmäßig zur Reinigung rekombinanter Proteine mitexprimiert und legen somit den Grundstein für Versuche, Proteine auf Ni-NTA-Chipoberflächen zu immobilisieren. Auf diese Weise gelang die Herstellung von Proteinbiochips mit His₆-modifizierten fluoreszierenden Proteinen, Antikörpern, Virusproteinen und Wachstumsfaktoren.^[179–185] NTA ist ein vierzähliger Ligand, der hexagonale Komplexe mit einer Reihe zweiwertiger Metallionen (meist Ni²⁺) bildet, sodass zwei Bindungsstellen des Komplexes für die Bindung an eine His₆-Sequenz

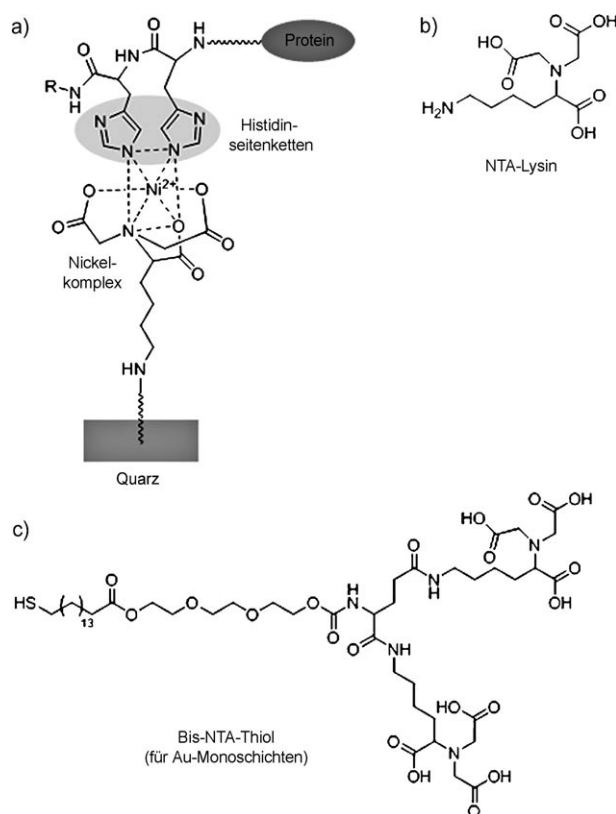


Abbildung 6. a) Bindung eines polyhistidin-funktionalisierten Proteins an eine Nickel-NTA-funktionalisierte Quarzoberfläche über zwei der Histidinreste in der Polyhistidinsequenz.^[174] b) NTA-Lysin, das zur Herstellung von Ni-NTA-Chipoberflächen verwendet wird. c) Eine Bis-NTA-Thiol-Verbindung, die eine höhere Affinität für polyhistidin-funktionalisierte Proteine zeigt als einfache NTA-Gruppen.^[198]

zur Verfügung stehen (Abbildung 6). Die Immobilisierung von His₆-modifizierten Proteinen auf Ni-NTA-Monoschichten kann ähnlich wie im Fall der Ni-NTA-Säulenchromatographie durch Zusatz von Ethylendiamintetraacetat oder Imidazol rückgängig gemacht werden.^[179, 181, 186] NTA-Verbindungen (Abbildung 6) können z.B. über Aktivester (NHS, *N'*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid (EDC)) oder Maleimide kovalent an Chipoberflächen aus Dextran oder Glas gebunden werden. Gold-NTA-Oberflächen wurden nach Reaktion von Maleimid-NTA mit *N*-Succinimidyl-*S*-acetylthiopropionat oder direkt mit thiofunktionierten NTA-Verbindungen hergestellt.^[179, 182, 187, 188] Nachteile des Ni-NTA-Systems bestehen in der metallbasierten, unspezifischen Proteinadsorption an der Chipoberfläche sowie der relativ niedrigen Affinität der Polyhistidinsequenz zum Ni-NTA-Komplex ($K = 10^7 \text{ M}^{-1}$), die zur unerwünschten Abdissoziation (Bleeding) immobilisierter Proteine führen kann. Wird die Zahl der wechselwirkenden Gruppen erhöht, kann entsprechend dem Multivalenzprinzip die Stabilität des Komplexes erhöht werden (Abbildung 6).^[189] Eine höhere Dichte von NTA-Gruppen an der Chipoberfläche erhöht die Bindungsaffinität des His₆-Tags zu NTA-Rezeptoren um mehrere Größenordnungen, während die Proteinimmobilisierung reversibel bleibt.^[185, 187, 190, 191]

Das 20S-Proteasom wurde von Tampé et al. entweder an den α - oder an den β -Untereinheiten mit Polyhistidinsequenzen funktionalisiert, um die Orientierung auf der Chipoberfläche steuern zu können. Je nach Funktionalisierung nahmen die Proteine nach der Immobilisierung auf Ni-NTA-Oberflächen verschiedene bevorzugte Orientierungen ein (Abbildung 7).^[192–194] Mithilfe der immobilisierten α -Untereinheit konnte der Schritt der Oberflächenassoziiierung des

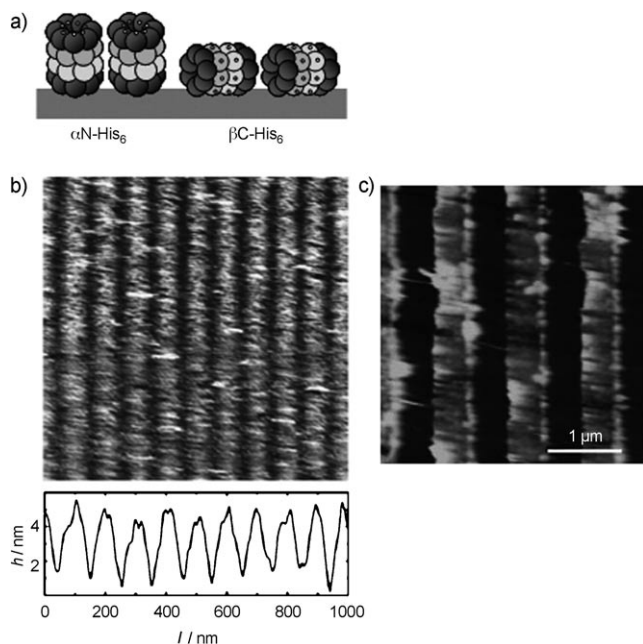
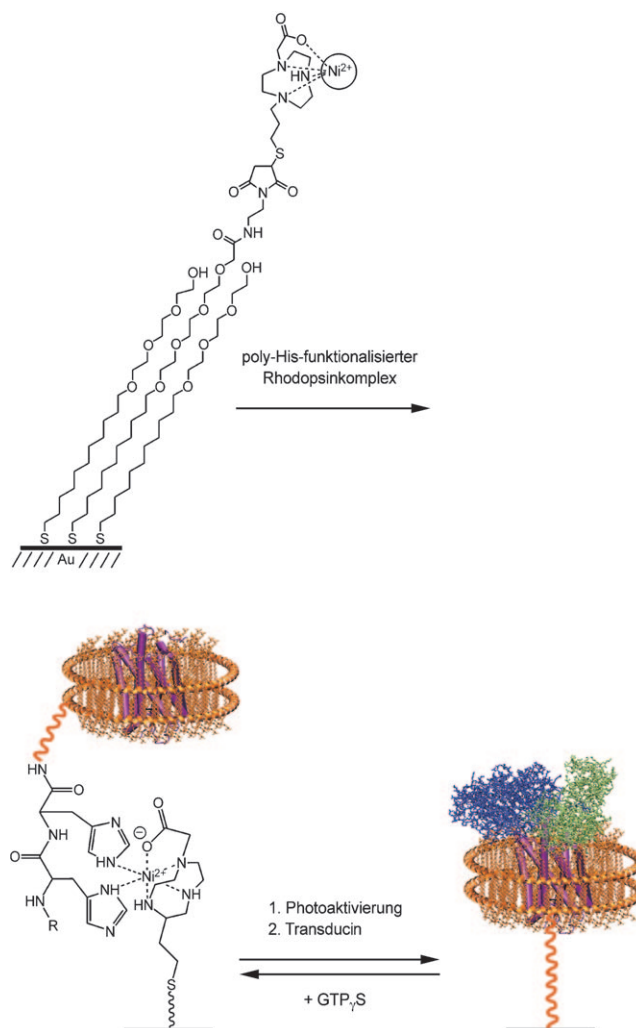


Abbildung 7. a) α N-His₆: Proteasom mit Polyhistidinsequenz an der α -Untereinheit (endständig gebunden); β C-His₆: Proteasom mit Polyhistidinsequenz an der β -Untereinheit (über die Seite gebunden). b) Topographische rasterkraftmikroskopische (AFM-) Aufnahme von Linien α N-His-Tag-funktionalisierter Proteasomkomplexe, die auf Ni-NTA-SAMs immobilisiert wurden, die durch lokale Generierung von Aminen auf einer nitrofunktionalisierten SAM mit Elektronenstrahlolithographie und anschließende Funktionalisierung mit einer NTA-Verbindung erzeugt worden waren. Darunter: Höhenprofil über die erhaltenen Linien.^[194] c) AFM-Aufnahme von Strukturen eines polyhistidinmodifizierten fluoreszierenden DsRed-Proteins, das auf einer mit Nanoimprintlithographie hergestellten, chemisch funktionalisierten Struktur immobilisiert wurde.^[200]

Proteinabbaumechanismus mit SPR und Einzelmolekül-Kreuzkorrelationsspektroskopie (single molecule cross correlation spectroscopy) aufgeklärt werden.^[192–194] In einem anderen Beispiel konnten verschiedene Konformationen der ligandenbindenden Domäne des Östrogenrezeptors (estrogen receptor, ER), die durch Agonisten und Antagonisten induziert wurden, mit konformationsspezifischen Peptiden und Proteinen untersucht werden.^[195,196] Gothelf et al. verwendeten den polyhistidinmodifizierten ER auf Ni-NTA-Oberflächen in einem elektrochemischen Sensor.^[195] Mrksich et al. analysierten GST-Fusionsproteine auf Glutathion-Thiol-Monoschichten mit Massenspektrometrie.^[196] Wegner et al. verwendeten NTA-funktionalisierte Monoschichten in Mikrofluidiksystemen mit parallelen Mikrokanälen, um mehrere polyhistidinmodifizierte Proteine parallel auf

einer Chipoberfläche zu immobilisieren.^[188] Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen und sequenzspezifische Wechselwirkungen des TATA-Box-Bindungsproteins mit doppelsträngiger DNA wurden mit Fluoreszenzbildgebung und SPR detektiert und zeigten die Aktivität der immobilisierten Proteine.^[188] Kürzlich gelang Mrksich et al. die Immobilisierung von polyhistidinmodifiziertem Rhodopsin auf Monoschichten (Schema 6).^[197] Mit Massenspektrometrie gelang



Schema 6. Rhodopsin wird über ein polyhistidinmodifiziertes Gerüstprotein auf einer Thiolmonoschicht immobilisiert. Nach Aktivierung durch Licht bindet der Rezeptor einen Transducinkomplex. GTPγS: Guanosin-5'-(thiotrisphosphat).^[197]

anschließend der Nachweis der Bindung des Transducinkomplexes nach Photoaktivierung des immobilisierten Rhodopsins, die zur Photoisomerisierung des lysingebundenen Chromophors 11-*cis*-Retinal und damit zu einer Konformationsänderung führt.^[197] Der Einsatz nichthydrolysierbarer Nucleotide unterbindet die Wechselwirkung zwischen Rhodopsin und Transducin.^[197]

Durch Mikrokontaktdruck wurden Mikrostrukturen von NTA-Verbindungen erzeugt.^[198,199] Möller et al. bedruckten z. B. nichtadhäsive, verzweigte, Isocyanatgruppen enthaltende

PEG-Filme mit einer aminfunktionalisierten NTA-Verbindung. Nach Zugabe von Nickelionen wurde an den erhaltenen NTA-Mustern polyhistidinfunktionalisiertes EGFP selektiv aus Zelllysate immobilisiert.^[199] Huskens et al. immobilisierten polyhistidinfunktionalisiertes DsRed auf 500 nm breiten NTA-Linien, die mit Nanoimprintlithographie hergestellt worden waren (Abbildung 7).^[200] Indem sie die mechanische Instabilität von NTA-Monoschichten auf Gold nutzten, gelang Tinazli et al. durch Nanopropfen (nanografting) die lokale Entfernung von immobilisiertem α -His₆-Proteasom. Die entstandenen Leerstellen wurden anschließend mit anderen polyhistidinfunktionalisierten Proteinen aufgefüllt.^[201] Auf diese Weise wurden definierte Zonen gleichförmig orientierter Proteine mit Größen von bis zu 50 nm erzeugt, allerdings ist die Herstellung aufwändig. Turchanin et al. reduzierten mit Elektronenstrahlolithographie nitrofunktionalisierte SAMs lokal zu Aminen, an denen nachfolgend NTA-Gruppen angebracht wurden.^[194] So konnte ein Muster von 100 nm breiten Linien bis zu einer Gesamtfläche von 1 mm² hergestellt werden.^[194] Mit DPN wurden Anordnungen von polyhistidinfunktionalisiertem Ubiquitin und Thioredoxin mit einer Spotgröße von bis zu 80 nm auf Nickeloberflächen erzeugt und mit Antikörpern ausgelesen.^[202]

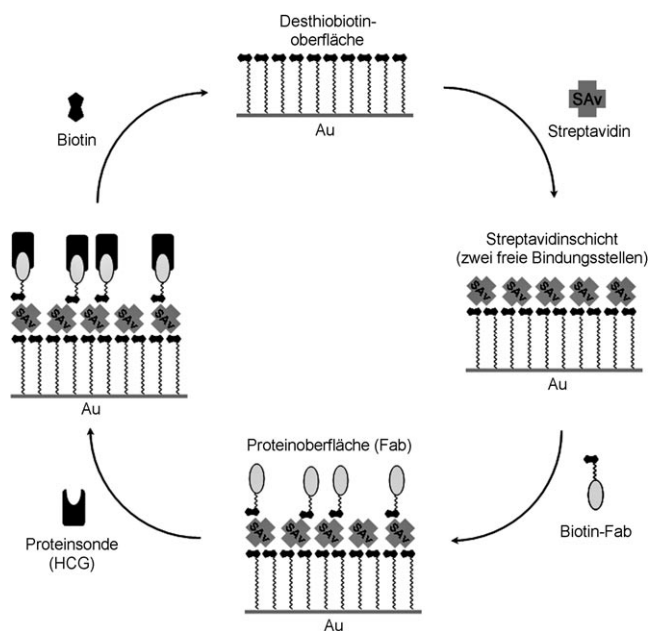
3.2.1.2. Biotinoberflächen

Eine weitere Strategie, deren Ursprung ebenfalls in der Affinitätschromatographie liegt, setzt auf die spezifische Bindung von Biotin an die Proteine Avidin oder Streptavidin (SAv). Streptavidin hat vier Biotin bindende Untereinheiten, deren Komplex mit Biotin wegen der hohen Affinität nahezu irreversibel gebildet wird und daher vergleichbar mit einer kovalenten Bindung ist ($K = 10^{13} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$).^[203] Die Komplexbildung von Biotin und SAv verläuft sehr schnell und ist nahezu unabhängig von pH-Wert, Temperatur, organischen Lösungsmitteln, enzymatischer Proteolyse oder Denaturierungsmitteln. SAv wird meist gegenüber Avidin bevorzugt, da dieses Glycoaminosäuren trägt, die eine unerwünschte, unspezifische Adsorption bewirken können. Viele Immobilisierungsmethoden nutzen das Biotin-SAv-System, über das erst kürzlich ein Übersichtsartikel erschienen ist.^[204]

Für die Herstellung von SAv-Monoschichten wird meist die Schichtanordnung Biotin/SAv/Biotin bevorzugt, da bei einer direkten Immobilisierung von SAv das Risiko besteht, dass sich eine qualitativ schlechte Monoschicht bildet. Zunächst wird dazu eine Biotinmonoschicht hergestellt, die die Orientierung der SAv-Schicht über die Anbindung an zwei der Biotinbindungsstellen von SAv steuert. Die anderen beiden Biotinbindungsstellen werden von der Chipoberfläche weggedreht und stehen für die Bindung biotinylierter Proteine zur Verfügung. Die Kombination mit Monoschichten, die aus einer biotinylierten und einer nichtbiotinylierten Thiolverbindung bestehen, ermöglicht die Steuerung der Dichte der Biotinmoleküle und damit der immobilisierten Proteine an der Oberfläche.^[205] Das Biotin-SAv-System wurde zuerst von Ringsdorf, Knoll et al. zur Herstellung von Proteinoberflächen eingesetzt. Sie immobilisierten biotinyliertes Concanavalin A und biotinylierte Fab-Fragmente von

Antikörpern (Schema 7).^[206] Die Wechselwirkung der immobilisierten Fab-Fragmente mit Hormonmolekülen macht eine Anwendung als Immunsensor denkbar.^[206, 207]

Saavedra et al. immobilisierten Cytochrom *c* aus Hefe über das Biotin-SAv-System. Ergebnisse aus Untersuchungen des linearen Absorptionsdichroismus und der Fluoreszenz-anisotropie der Chipoberfläche stimmten mit berechneten Resultaten überein.^[208, 209] Holland-Nell und Beck-Sickingen verglichen die Aktivität einer immobilisierten, biotinylierten Reduktase mit der Aktivität eines in zufälliger Orientierung



Schema 7. Herstellung von Proteinoberflächen mit der Biotin-Streptavidin-Methode: Eine Monoschicht von Desthiobiotin auf Gold wird mit SAv inkubiert, um eine SAv-Oberfläche mit zwei freien Biotin-Bindungsstellen pro SAv-Molekül zu erzeugen. Die Inkubation mit einem biotinylierten Zielprotein (hier dargestellt ein Antikörperfragment, biotinyliertes anti-HCG-Fab) ergibt die gewünschte Proteinoberfläche. Diese wird nachfolgend genutzt, um ein weiteres Protein (menschliches chorionisches Gonadotropin (HCG)) in einer Probenlösung zu detektieren.^[206]

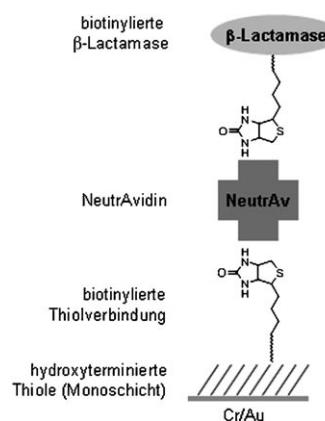


Abbildung 8. Konzept des Lactamasechips von Knoll et al.: Biotinylierte β -Lactamase wird mit der Biotin-SAv-Methode auf einer SAM an einer Chrom/Goldoberfläche immobilisiert. Die enzymatische Aktivität des immobilisierten Enzyms wird nachfolgend mit SPR gemessen.^[210]

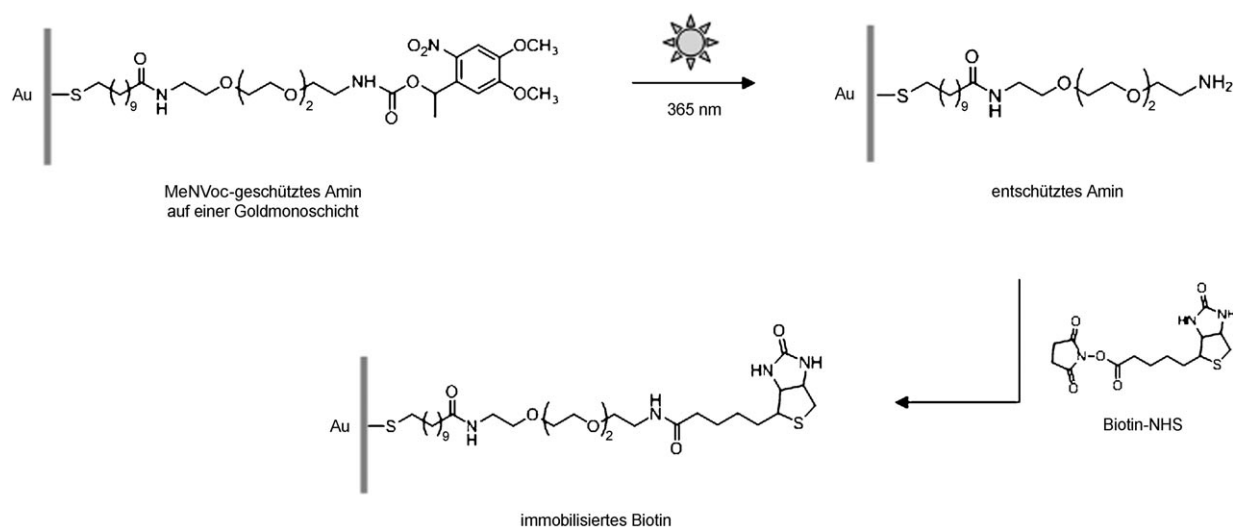
immobilisierten Enzyms. Das in gerichteter Orientierung immobilisierte Enzym war deutlich aktiver.^[113] Knoll et al. stellten mithilfe der Biotin-SAv-Strategie einen Biosensor mit biotinylierter β -Lactamase her und analysierten in situ die Katalyse einer Modellreaktion (Abbildung 8).^[210] Möller et al. untersuchten die Faltung von biotinylierter RNase, die mit dem Biotin-SAv-Ansatz auf den von ihnen entwickelten, proteinabweisenden Polyethylenoxid(PEO)-Chipoberflächen immobilisiert worden war.^[99] Biotinyliertes Kinesin wurde mit der Biotin-SAv-Strategie in Mikrokanälen angebunden und ermöglichte Untersuchungen des dreidimensionalen Tubulintransports.^[211] Mikrokanäle, in denen mit der Biotin-SAv-Strategie verschiedene Proteine A/G immobilisiert worden waren, fanden Anwendung als Sensoren.^[212]

Für die Herstellung von Proteinmustern mit dem Biotin-SAv-System gibt es verschiedene Ansätze. So ist es möglich, Chipoberflächen mit inaktivierten Biotinverbindungen einzusetzen, die dann lokal aktiviert werden. Auf diese Weise können Muster von aktiviertem Biotin erhalten werden, die für die Immobilisierung von Proteinen zur Verfügung stehen. Photochemisch ist dies z. B. über die Maskierung mit einer photolabilen Schutzgruppe, Nitroveratryloxycarbonyl (Nvoc), möglich, die an ein Stickstoffatom des Imidazolidinonrings gebunden ist (Tabelle 4). Durch Bestrahlung wird die Schutzgruppe abgespalten, und das aktivierte Biotin steht für die Immobilisierung von Pro-

Tabelle 4: Beispiele für Biotinderivate, die für die Photoimmobilisierung von Proteinen eingesetzt werden.^[215, 216]

Name	Verwendung	Struktur
NVoc-Biotin	photoabspaltbare Schutzgruppe ^[209]	
Photobiotin	Erzeugung einer reaktiven Zwischenstufe mit Licht	
Hydrochinonbiotin	elektrochemische Entschützung ^[55]	
ARP	aldehyde-reactive probe, Invitrogen (hydrazinfunktionalisiertes Biotin) ^[212, 213]	
olefinfunktionalisiertes Biotin	Thiol-En-Reaktion ^[214]	

teinen über SAv zur Verfügung.^[160, 213, 214] Da die Aktivierung des geschützten Biotins auf Licht basiert, kann die Form der erhaltenen Strukturen mit einer Photomaske beliebig gesteuert werden. Ein anderes photochemisches Konzept beruht auf dem Schützen von Aminen in SAMs mit Methyl-6-nitroveratryloxycarbonyl(MeNVoc)-Schutzgruppen. Nach gezielter Photolyse der Schutzgruppen auf der Oberfläche wird Biotin durch Kupplungsreaktionen auf den entschützten Aminen immobilisiert (Schema 8).^[215, 216] Statt Schutzgruppen werden auch photoreaktive Abstandhalter eingesetzt: So



Schema 8. Indirekte Biotinimmobilisierung über eine photoabspaltbare Schutzgruppe.^[215, 216]

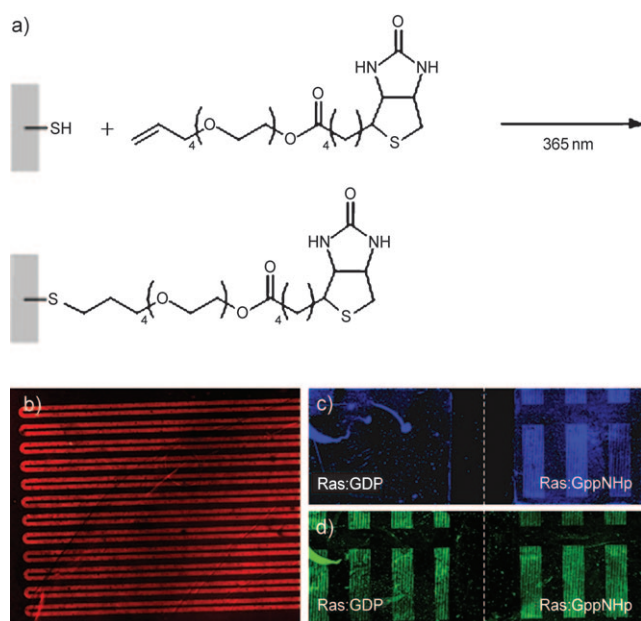


Abbildung 9. Proteinmusterbildung mit der Thiol-En-Reaktion: a) Eine Thioloberfläche wird mit einer olefinfunktionalisierten Biotinverbindung beschichtet und durch eine Photomaske mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt, um Biotinstrukturen auf der Oberfläche zu erhalten. b) Biotinylierte alkalische Phosphatase wird über eine SAV-Zwischenschicht auf den Biotinstrukturen immobilisiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert. c) In gleicher Weise werden an verschiedenen Stellen auf einem Chip inaktives, GDP-gebundenes Ras und aktives, GppNHp-gebundenes Ras immobilisiert und mit einem Fusionsprotein aus der Ras-Bindungsdomäne (RBD) von Raf und YFP inkubiert. Nur im Fall von aktivem Ras:GppNHp kann die Bindung der RBD:YFP detektiert werden. d) Nach der Inkubation mit RBD:YFP werden beide Ras-Formen auf der Oberfläche mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen (GDP: Guanosin-5'-diphosphat; GppNHp: Guanosin-5'-[(β , γ)-imido]triphosphat, ein nichthydrolysierbares GTP-Analogon).^[219]

konnten Acetalgruppen an einer Oberfläche photochemisch in Aldehyde umgewandelt werden, an die nachfolgend Biotinhydrazid gebunden wurde.^[217,218] Mit dieser Strategie gelang die Herstellung mikroskaliger und, mithilfe eines SNOM, auch nanoskaliger Proteinmuster.

Jonkheijm et al. verwendeten die photochemische Thiol-En-Reaktion zur Bildung von Proteinmustern mit der Biotin-SAV-Methode (Abbildung 9).^[219] Eine thiofunktionalisierte Oberfläche wurde mit olefinfunktionalisiertem Biotin beschichtet und durch eine Photomaske mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Die entstandenen, thioethergebundenen Biotinstrukturen wurden im Anschluss zur Anbindung von Streptavidin-Cy5, alkalischer Phosphatase und der GTPase Ras genutzt. Im Fall von Streptavidin-Cy5 konnten homogene, mikrometergroße Linienstrukturen auf zentimetergroßen Flächen erzeugt werden. Auf SAV-Linien immobilisierte alkalische Phosphatase und Ras zeigten enzymatische Aktivität und Proteinbindungsfähigkeit, die qualitativ dem Verhalten der Proteine in Lösung entsprachen (Abbildung 9).^[219]

Eine weitere Methode zur lokalen Aktivierung zuvor deaktivierter Biotinoberflächen beruht auf lokal induzierten, elektrochemischen Prozessen, um eine an ein Stickstoffatom des Imidazolidinonrings von Biotin gebundene Hydrochi-

nonschutzgruppe (Tabelle 4) zu oxidieren und zu hydrolysieren.^[55] Eine elektrochemische Lithographietechnik beruht auf der lokalen Erwärmung einer Oberfläche, um dort gebundene Schutzgruppen gezielt zu entfernen.^[220] Weitere Methoden nutzen Softlithographie oder Rastersondenlithographie, um Biotin in Strukturen auf Oberflächen zu immobilisieren oder um reaktive Zonen auf der Oberfläche zu erzeugen, die im Anschluss zur Anbindung von Biotin verwendet werden.^[124,199,220–230] Die Ausdehnungen derartiger hergestellter SAV-Strukturen reichen vom Mikrometerbereich bis in den Bereich einiger zehn Nanometer. In einigen Fällen gelang auf diese Weise die Immobilisierung von fluoreszierenden Proteinen oder von Antikörpern.

Kürzlich wurde die Selbstorganisation periodischer DNA-Nanostrukturen (Bottom-up-Verfahren) genutzt, um Matrices für die Immobilisierung von SAV- und Antikörperarrays zu erzeugen.^[231,232] Zwar konnte auf diese Weise die Größe der hergestellten Strukturen auf bis zu 20 nm reduziert werden, jedoch gelang bisher nur die Funktionalisierung relativ kleiner Oberflächen.^[231–236]

Als alternative Bausteine für die schrittweise Herstellung von Proteinarrays wurden in jüngerer Vergangenheit synthetische Liganden-Rezeptor-Paare entwickelt. Beispielsweise wurden Cucurbit[7]uril-funktionalisierte Monoschichten eingesetzt, um Ferrocen-modifizierte Glucoseoxidase zu immobilisieren. Für die Immobilisierung von Cytochrom c und SAV wurde auch die Wechselwirkung zwischen Adamantylgruppen und Cyclodextrinen genutzt.^[223,237,238]

Um Proteine zu biotinylieren, kommen häufig aktivierte Biotinverbindungen zum Einsatz (Tabelle 5). Beim Einsatz dieser Verbindungen besteht jedoch das Risiko einer unspezifischen Biotinylierung und damit einer Beeinträchtigung der Proteinaktivität. Daher wurden zielgerichtete Biotinylierungsstrategien unter Einsatz von Biotin-Ligase^[239–243] oder inteinbasierten Methoden entwickelt.^[244–246] Yao et al. nutzten die chemoselektive Reaktion eines Cystein-Biotins mit einem reaktiven Thioester am C-Terminus eines Proteins, der zuvor über inteinbasierte Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL) eingeführt worden war, um Proteine zu biotinylieren (Schema 9).^[245] Auf diese Weise kann der Einsatz großer Affinitätsreagentien wie GST vermieden werden, die die Funktion des Proteins beeinträchtigen können. Drei Modellproteine – MBP, ein fluoreszierendes Protein und GST – wurden exprimiert, im Zelllysats mit Biotin funktionalisiert und auf SAV-Trägern immobilisiert. Mit Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass Konformation und Aktivität der immobilisierten Proteine erhalten bleiben.^[245]

3.2.1.3. Oberflächen mit Antikörpern

Der Einsatz natürlicher, proteinbindender Proteine (z. B. Antikörper) und antikörperbindender Proteine (z. B. Protein A oder G) zur Herstellung von Proteinbiochips ist vorteilhaft. Es können mono- oder polyklonale Antikörper, Antikörperfragmente oder synthetische Polypeptidliganden verwendet werden.^[247–250] Die zu verwendenden Antikörper müssen allerdings zunächst identifiziert und isoliert werden und außerdem für die Herstellung von Antikörperchips in großen Mengen zur Verfügung stehen. Ferner sind Antikörper

Tabelle 5: Beispiele für Reagentien, die für die Biotinylierung von Proteinen eingesetzt werden.^[245]

Name	Verwendung	Struktur
Biotin-NHS	reaktiv gegen Amine	
Biotinhydrazid	reaktiv gegen Zucker	
Pentylaminbiotin	reaktiv gegen Carbonsäuren, Pierce – Verwendung mit Kupplungsreagens EDC	
Biotin-BMCC	reaktiv gegen Thiole, Pierce	

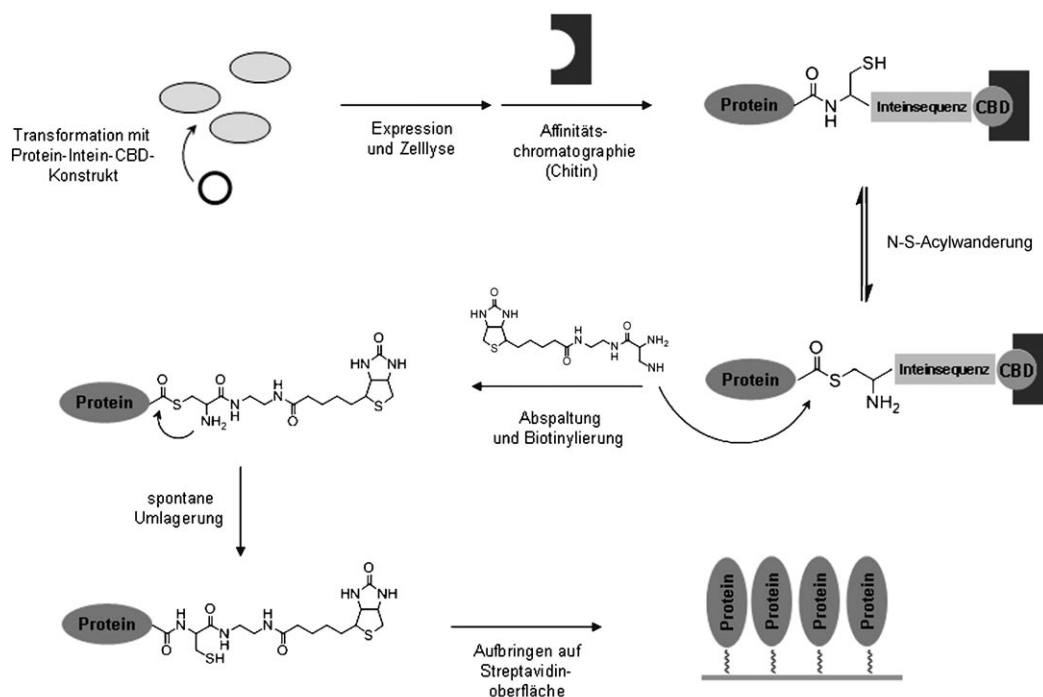
mehrfach glycosyliert und haben eine große Bindungsfläche, sodass es beim Einsatz von Antikörperchips zu nicht unerheblicher Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Zielproteinen und damit zu einer großen Zahl von falsch-positiven und/oder falsch-negativen Signalen kommen kann. In gängigen Anwendungen werden Antikörper meist ungerichtet auf Chipoberflächen immobilisiert. Um die Qualität von Antikörperchips zu verbessern, kann die Orientierung der Anti-

verschiedene Methoden zur Verwendung von DNA-Mikroarrays als Grundlage für Proteinbiochips entwickelt.^[12, 16, 255] Die Oligonucleotid-dirigierte Immobilisierung von DNA-Protein-Konjugaten zeichnet sich durch eine hohe Stabilität und Selektivität aus. Ferner sind DNA-Chips leicht zugänglich.^[27, 28] Schwierig ist jedoch die selektive Anbindung von Oligonucleotiden an große Proteine. Daher wurden Methoden entwickelt, mit denen z.B. thiopyridyl- oder maleimid-

körper auf der Chipoberfläche z. B. mit Protein A, das spezifisch an die Fc-Region von IgG bindet, gesteuert werden. Antigene haben auf diese Weise einen besseren Zugang zur Bindungsstelle, die sich auf der variablen Fab-Region befindet. Polyhistidinfunktionalisiertes Protein A wurde z. B. chemo-selektiv gerichtet auf Ni-NTA-Oberflächen immobilisiert.^[251–254] Es gibt mehrere detaillierte Übersichtsartikel zur gesteuerten Immobilisierung von Antikörpern und zum Einsatz entsprechender Chips in Immunassays.^[247–250]

3.2.1.4. DNA-modifizierte Oberflächen

Um die enorme Spezifität der Watson-Crick-Basenpaarung für die Immobilisierung von Proteinen nutzen zu können, wurden ver-



Schema 9. Einführung von Biotin in ein überexprimiertes Intein-Fusionsprotein durch EPL (CBD: chitin binding domain). Nachfolgend kann das biotinylierte Protein z. B. auf SAv-Chips immobilisiert werden.^[245]

funktionalisierte Oligonucleotide an Cysteinseitenketten von Proteinen, succinimidfunktionalisierte Oligonucleotide an Lysinseitenketten von Proteinen oder aldehydfunktionalisierte Oligonucleotide an hydrazinmodifizierte Antikörper gebunden werden können.^[12,255–265] Halbsynthetische Oligonucleotid-Protein-Konjugate wurden von Niemeyer et al. auf DNA-Mikroarrays immobilisiert, um bioaktive Protein-chips zu erhalten, die z.B. für immundiagnostische Anwendungen von Nutzen sein können.^[266,267]

Kürzlich gelang Heath et al. die Immobilisierung hydrazonverknüpfter DNA-Antikörper-Konjugate auf einem DNA-Mikroarray. Dieser Chip wurde zur parallelen Detektion eines Oligonucleotids, eines Proteins und von Zellen

eingesetzt.^[268] Für die Untersuchung von z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen ist es jedoch notwendig, Oligonucleotide regiospezifisch an Proteine zu binden, um Proteine in definierter Orientierung immobilisieren zu können. Eine Methode, die zur selektiven Kupplung von Oligonucleotiden und Peptidnucleinsäuren (PNAs) an Proteine verwendet wird,^[269,270] nutzt cysteinfunktionalisierte Oligonucleotide in einer EPL, um DNA- und PNA-Sequenzen an den C-Terminus rekombinanter Proteine zu binden.^[269–274] Becker et al. stellten DNA-Protein-Konjugate her, die nachfolgend auf konventionellen DNA-Mikroarrays auf Siliciumwafern immobilisiert wurden. Sie nutzten Chipoberflächen mit der DNA-funktionalisierten Ras-Bindungsdomäne von Raf (RBD-DNA), um aktives, GTP-gebundenes Ras zu immobilisieren, das nachfolgend über Fluoreszenzaufnahmen und MALDI detektiert wurde (Abbildung 10). Die biologische Aktivität der immobilisierten Konstrukte konnte so nachgewiesen werden.^[275]

Eine andere Methode zur selektiven Modifizierung von Proteinen mit Oligonucleotiden vereint die Orthogonalität der DNA-dirigierten Immobilisierung mit der Stabilität des Biotin-SAv-Systems, um eine aufwändige Modifizierung von Proteinen zu vermeiden.^[243,255,276–279] In einer Reihe von Studien, über die bereits in Übersichtsartikeln berichtet wurde,^[16,280,281] erzeugten Niemeyer et al. durch Inkubation von SAv-DNA mit biotinylierten Proteinen Protein-Oligonucleotid-Konjugate, die im Anschluss auf einer Oberfläche mit komplementären Oligonucleotiden immobilisiert wurden (Abbildung 11). Auf diese Weise gelang die Immobilisierung von FMN:NADHH-Oxidoreduktase, Luciferase, Antikörpern und Meerrettichperoxidase.^[243,255,276–279,282]

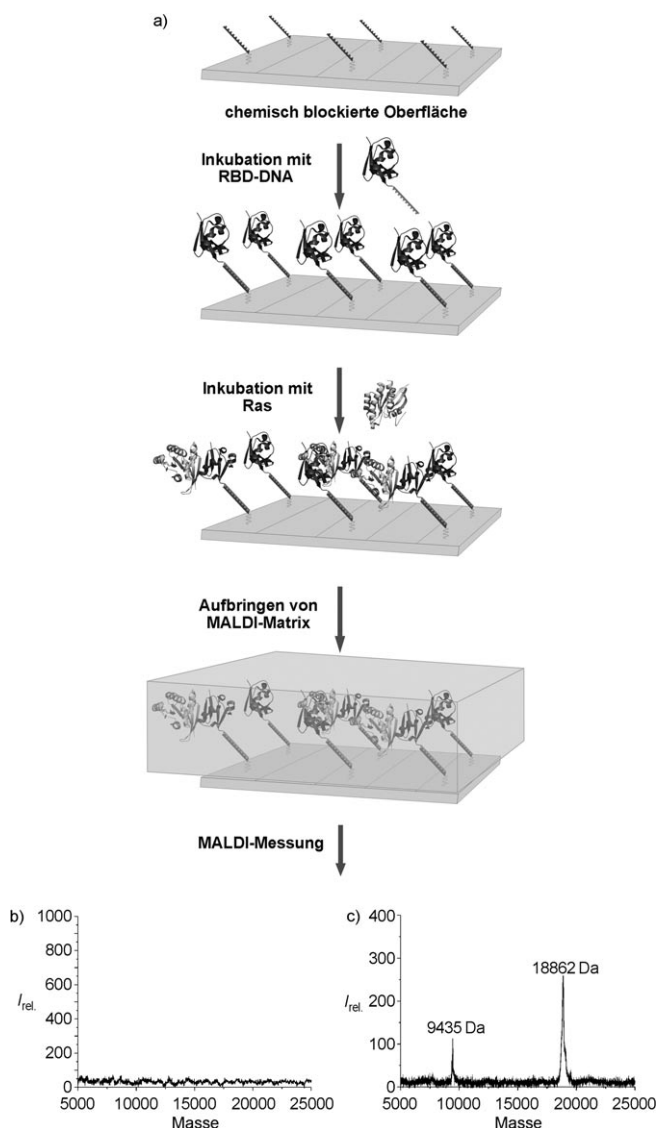


Abbildung 10. a) Ein Konjugat aus der Ras-Bindungsdomäne von Raf und einem DNA-Oligonucleotid (RBD-DNA) wird auf einer Oberfläche immobilisiert, die mit einem komplementären Oligonucleotid funktionalisiert ist. Nach Inkubation mit aktivem, GppNHP-gebundenem Ras und der Zugabe einer MALDI-Matrix ist mithilfe von MALDI auf der Oberfläche gebundenes Ras detektierbar. b) MALDI-Hintergrundspektrum des RBD-DNA-Chips. c) MALDI-Spektrum des RBD-DNA-Chips mit gebundenem Ras.^[275]

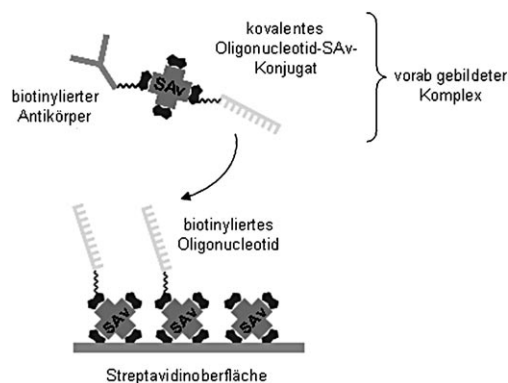


Abbildung 11. Herstellung von Mikroarrays mit mehreren Proteinen durch DNA-dirigierte Immobilisierung und die Biotin-SAv-Wechselwirkung: Nach der Kupplung biotinylierter Proteine mit verschiedenen SAv-DNA-Konjugaten erfolgt die selektive Immobilisierung durch Hybridisierung auf einem Array mit komplementären Oligonucleotiden.^[255]

LaBear et al. entwickelten ein beschleunigtes Hochdurchsatz-Screening für Proteinarrays. Zu diesem Zweck immobilisierten sie biotinylierte Plasmid-DNA, die für verschiedene Zielproteine mit C-terminalen GST-Sequenzen kodierte, zusammen mit anti-GST-Antikörpern in einem Mikroarray.^[283] Nach der In-vitro-Translation der Proteine

und deren Immobilisierung durch die Antikörper wurde ein Proteinmicroarray erhalten. Das System wurde validiert und nachfolgend eingesetzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen im humanen DNA-Replikationskomplex zu untersuchen.^[283] Die Methode wurde ebenfalls von anderen Gruppen verwendet.^[284–286]

3.2.2. Kovalente Anbindung

Die Immobilisierung eines Proteins über die Seitenketten seiner Aminosäuren geschieht oft nicht zielgerichtet, da ein bestimmter Aminosäuretyp mehrfach auf der Oberfläche des Proteins vorhanden sein kann. So kann es zu unterschiedlichen Orientierungen der immobilisierten Proteine auf einer Chipoberfläche kommen.^[21] Die meisten Methoden für die chemoselektive Immobilisierung von Proteinen beruhen auf Ligationsmethoden, die ursprünglich für die Synthese, Semisynthese und selektive Modifizierung von Proteinen entwickelt wurden.^[287, 288] Bei all diesen Methoden werden Proteine mit einzigartigen reaktiven Gruppen funktionalisiert, die nachfolgend gezielt mit komplementären chemischen Gruppen, z.B. an anderen Proteinen, zur Reaktion gebracht werden.

3.2.2.1 Immobilisierung über Thiole

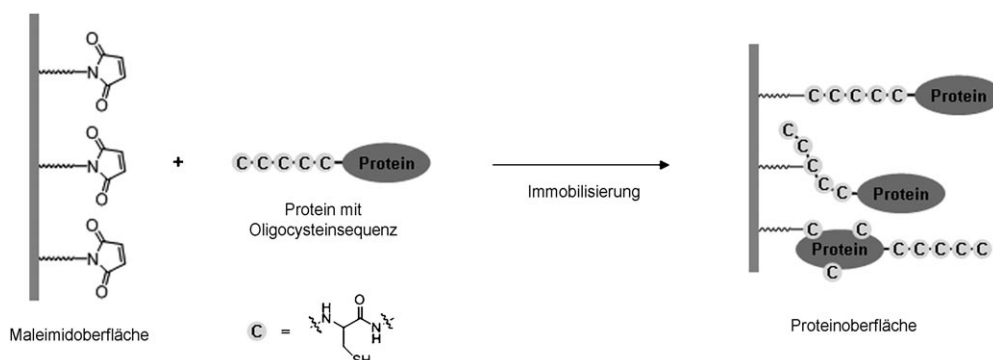
Eine gerichtete Immobilisierung von Proteinen ist möglich, wenn für die Immobilisierungsreaktion lediglich eine einzige zugängliche Aminosäure zur Verfügung steht. Cystein ist die einzige natürliche Aminosäure, die in der Seitenkette eine freie Thiolgruppe enthält, und tritt in Proteinen relativ selten auf (<1%). Thiole haben einen pK_s -Wert von ca. 8.5 und sind auch bei pH 7 ausreichend nucleophil, um selektiv mit funktionellen Gruppen wie α -Halogenacetyl- und Maleimidgruppen zu reagieren. Auf diese Weise ist eine Immobilisierung über stabile Thioetherbindungen möglich (Abschnitt 2.4).^[267, 289–291] Um die Cysteinsseitenkette für Proteinimmobilisierungen oder Kupplungen nutzen zu können, darf der Cysteinrest nicht in einem Proteinstrukturelement integriert sein, sondern sollte sich in einem dem Solvens zugänglichen Bereich des Proteins befinden. Cysteinreste können beispielsweise durch ortsgerichtete Mutation von Alanin oder Serin eingebaut werden. Gaub et al. führten in eine Lipase aus *Candida Antarctica* einen zugänglichen C-terminalen Cysteinrest ein, der anschließend genutzt wurde, um die Lipase auf Maleimidoberflächen zu immobilisieren.^[291] Eine Erweiterung dieser Methode ist die Einführung einer Oligocysteinsequenz, die reaktiver als ein einzelner Cysteinrest ist (Schema 10).^[290] In einem anderen Beispiel wurde

das Kuhbohnenmosaikvirus genetisch so verändert, dass an bestimmten Stellen auf den Capsomeren gezielt Cysteinreste eingeführt wurden. Diese wurden mit Rastersondenlithographie danach in Strukturen von 30 bis 50 nm Größe auf einer Maleimidoberfläche immobilisiert.^[292–294] Morpurgo et al. demonstrierten die selektive Immobilisierung einer cysteinmodifizierten Ribonuclease (RNase) auf Vinylsulfonoberflächen über eine konjugierte Addition.^[295]

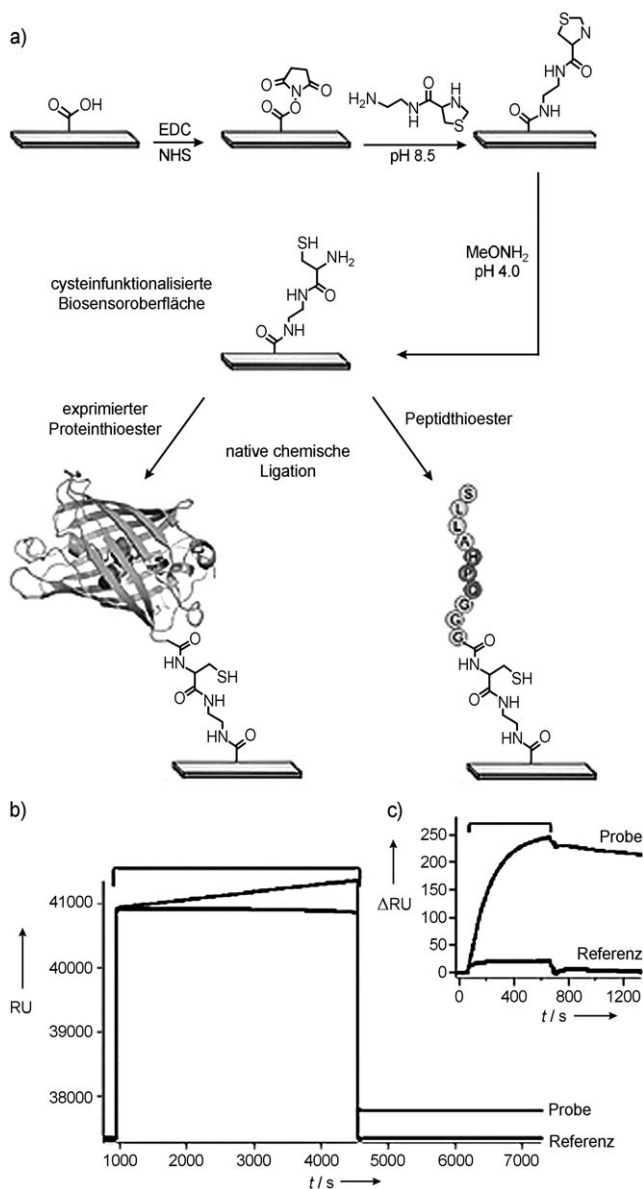
3.2.2.2 Native chemische Ligation an Oberflächen

Die native chemische Ligation (native chemical ligation, NCL) ist eine der effizientesten Methoden zur chemospezifischen Proteinimmobilisierung. Camarero et al. immobilisierten mit der NCL zwei fluoreszierende Proteine, die als C-terminale Thioester exprimiert wurden, auf N-terminal cysteinmodifizierten Glasoberflächen.^[296] Kontrollexperimente mit nativen Proteinen bestätigten, dass die NCL für die Immobilisierung verantwortlich war.^[296] In einem anderen Beispiel erzeugten Yao et al. durch inteindirigiertes Proteinspleißen N-terminal cysteinmodifizierte fluoreszierende Proteine und immobilisierten sie auf Thioesteroberflächen. Der Erfolg der Immobilisierung konnte durch Detektion mit Antikörpern und durch die Autofluoreszenz der Proteine demonstriert werden.^[297] Erst kürzlich berichteten Meijer et al. über die Immobilisierung eines thioestermodifizierten fluoreszierenden Proteins auf einer thiazolidinmodifizierten Oberfläche, die in situ mit SPR verfolgt wurde (Schema 11).^[298]

Camarero et al. schlugen eine spurlose Variante der NCL vor, die auf Proteintranssplicing basiert (Schema 12). Bei dieser Methode wurde das C-Inteinfragment einer gespaltenen Inteindomäne kovalent auf einer Glasoberfläche immobilisiert, während das N-Inteinfragment an ein Zielprotein konjugiert wurde.^[299] Die Wechselwirkung der beiden Inteinhälften, die im Fall des natürlich gespaltenen DnaE-Inteins spontan wechselwirken ($K = 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), führte zur Wiederherstellung der Inteinfunktion, der Immobilisierung des Zielproteins und der Freisetzung des Inteins. Auf diese Weise wurde Split-Intein-modifiziertes MBP immobilisiert, und durch Detektion mit einem Antikörper konnte die Erhaltung der Konformation des immobilisierten Proteins nachgewiesen



Schema 10. Proteinimmobilisierung über Cystein und die Oligocysteinsequenz: Ein Zielprotein (EGFP) wird mit einer Oligocysteinsequenz an einer dem Lösungsmittel zugänglichen Stelle funktionalisiert. Wird das Protein auf eine Maleimidoberfläche aufgebracht, wird es bevorzugt über Cysteinreste der Oligocysteinsequenz immobilisiert, da die Reaktion innerer Cysteinreste des Proteins weniger wahrscheinlich ist.^[290]

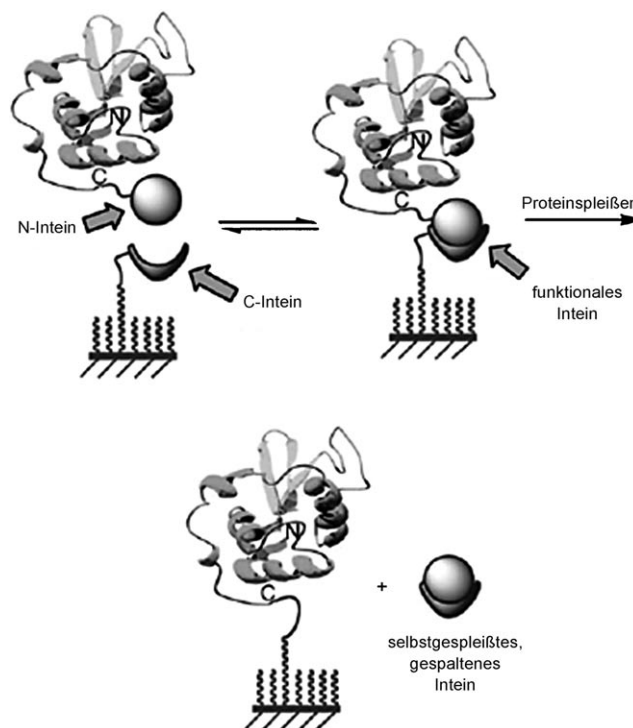


Schema 11. Proteinimmobilisierung mit der NCL: a) Die Inkubation eines fluoreszierenden, als Thioester exprimierten Proteins (grün fluoreszierendes Protein, GFP) mit einer cysteinfunktionalisierten SPR-Chipoberfläche führt zur Immobilisierung des Proteins durch nucleophilen Angriff von Cystein auf den Thioester. b) SPR-Spur der Immobilisierung des Proteins während der Injektion des Thioesters. c) SPR-Spur der Bindung eines anti-GFP-Antikörpers an das zuvor immobilisierte GFP.^[298]

werden. In Kontrollexperimenten mit unmodifizierten Proteinen war keine Proteinimmobilisierung feststellbar.^[299]

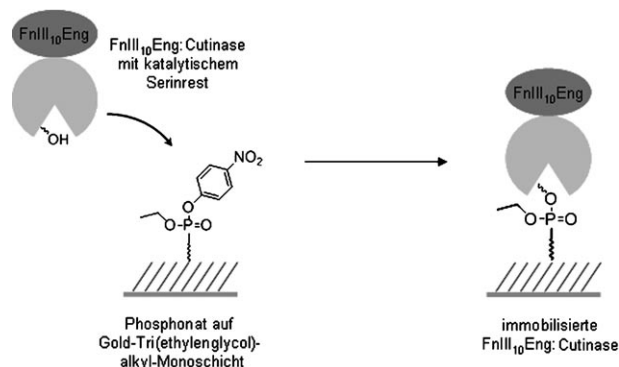
3.2.2.3. Enzymatische Systeme

Hodneland et al. erkannten in der Kombination von Wirkstoffmikroarrays und irreversibel Proteine bindenden Wirkstoffen^[38,300–302] die Möglichkeit, Proteine durch enzymatische Reaktionen selektiv und mit definierter Orientierung auf Oberflächen zu immobilisieren.^[68] Als Enzym für ihr Immobilisierungssystem wählten sie Cutinase, da diese irre-



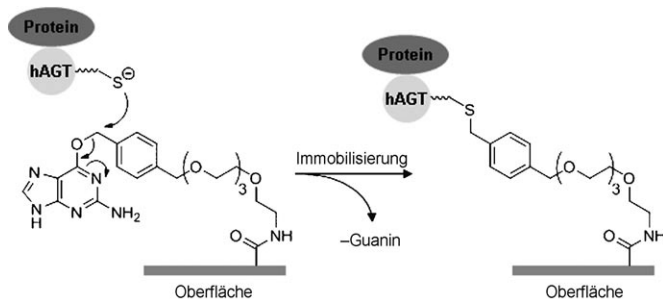
Schema 12. Proteinimmobilisierung über Split-Intein-Proteintranssplicing: Die Wechselwirkung eines immobilisierten C-Inteinfragments mit einem Fusionsprotein aus N-Inteinfragment und einem Zielprotein führt zur Bildung eines funktionalen Inteins, Selbstsplicing und der Immobilisierung des Zielproteins.^[299]

versibel mit Phosphonatgruppen reagiert, indem ein Serinrest im aktiven Zentrum mit ihnen kovalente, hydrolysestabile Addukte bildet. Nach Herstellung eines Zielproteinkonjugats aus Calmodulin und Cutinase (Schema 13)^[68] verfolgten die Autoren die Immobilisierung des Cutinasefusionsproteins auf phosphonatfunktionalisierten Goldmonoschichten mit SPR.^[68] Bei dieser Methode besteht allerdings das Risiko, dass andere hydrolytische Enzyme mit ähnlicher Reaktivität ebenfalls immobilisiert werden. Diese Methode wurde auch verwendet, um Mikroarrays von cutinasemodifizierten Antikörpern herzustellen.^[303]



Schema 13. Enzymbasierte Methode (mit Cutinase) zur Proteinimmobilisierung: Ein Fusionsprotein aus Cutinase und einem Zielprotein (hier die zehnte Domäne von Fibronectin III) wird auf eine phosphonatfunktionalisierte Oberfläche aufgebracht. Die Phosphonatgruppen reagieren irreversibel mit einem Serinrest im aktiven Zentrum der Cutinase und führen so zur Immobilisierung des Fusionsproteins.^[68]

Eine andere Strategie, die von Johnsson et al. entwickelt wurde, nutzt die selektive chemoenzymatische Immobilisierung von Proteinen mit einer mutierten *O*6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) (Schema 14). In Gegenwart

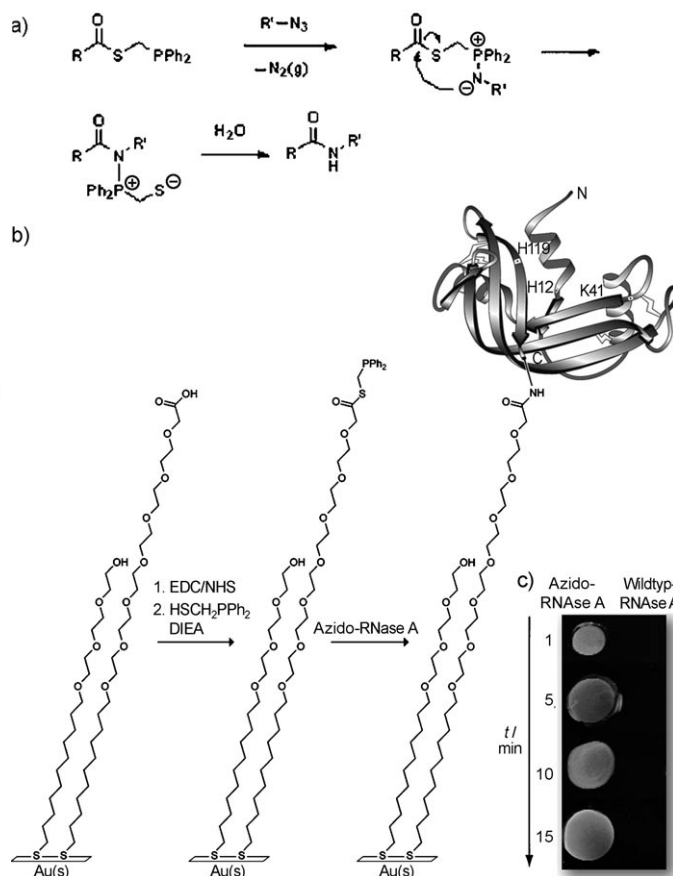


Schema 14. Proteinimmobilisierung mit einer Mutante der O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT): Ein Fusionsprotein aus hAGT und einem Zielprotein wird auf eine O6-benzylguaninfunktionalisierte Oberfläche aufgebracht. hAGT überträgt eine Benzylgruppe auf sich selbst und immobilisiert so das Fusionsprotein.^[304–306]

von O6-Benzylguanin(BG)-Derivaten transferiert das modifizierte Enzym eine Benzylgruppe auf sich selbst. Da sperrige Substituenten an der Benzylgruppe toleriert werden, ist die Verwendung immobilisierter Benzylgruppen möglich.^[304,305] Dementsprechend wurde AGT-modifizierte GST auf einer Oberfläche mit Benzylgruppen immobilisiert und nach Inkubation mit Antikörpern mit SPR^[304] und Rasterkraftmikroskopie^[306] detektiert. Andere Gruppen immobilisierten alkalische Phosphatase mit mikrobieller Transglutaminase,^[307] verschiedene Proteine mit Sortase^[308] und fluoreszierende Proteine mit einer Domäne der Polyhydroxyalkanoatdepolymerase.^[309]

3.2.2.4. Immobilisierung mit der Staudinger-Ligation

Bei der Staudinger-Ligation reagieren Azide mit phosphanfunktionalisierten Estern oder Thioestern zu Amidinen. Nach Bildung eines Iminophosphoranintermediats folgt über einen fünfgliedrigen Übergangszustand ein nucleophiler Angriff des Iminophosphoranstickstoffatoms auf den Thioester (Schema 15). Das erhaltene Aminophosphoniumintermediat wird nachfolgend zu einer Amidbindung hydrolysiert. Die Staudinger-Ligation verläuft unter milden Bedingungen in wässriger Lösung bei nahezu quantitativem Umsatz und ohne nennenswerte Bildung von Nebenprodukten. Ihre erste Anwendung zur Immobilisierung von Proteinen wurde von Raines et al. entwickelt, allerdings erfolgte die Immobilisierung in diesem Fall noch indirekt.^[310] Ein azidfunktionaliertes Peptidfragment einer gekürzten RNase, RNase S', wurde zunächst auf einer Phosphanylthioesteroberfläche immobilisiert. Durch Komplexierung mit einem Proteinfragment wurde anschließend die Aktivität der RNase S' wiederhergestellt.^[310] In einer Folgestudie wurde azidfunktionalierte Ribonuclease A direkt auf Phosphanylthioesteroberflächen immobilisiert (Schema 15).^[311] Kontrollexperimente ergaben, dass das mit der Staudinger-Ligation immobilisierte Protein sowohl enzymatisch aktiv war als auch andere Proteine binden konnte.^[311] Kontrollexperimente ergaben, dass



Schema 15. a) Mechanismus der Staudinger-Ligation. b) Azidfunktionalisierte RNase A wird durch Staudinger-Ligation auf phosphanfunktionalisierten Oberflächen immobilisiert. DIEA = Diisopropylethylamin. c) Das Auslesen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper macht die Zeitabhängigkeit der Immobilisierung sichtbar. Im Fall von nativer RNase A ist innerhalb des angezeigten Zeitbereichs keine Immobilisierung detektierbar.^[311] Wiedergabe mit Genehmigung der ACS.

die Immobilisierung nur über die Staudinger-Ligation erfolgte. Auch wurde gezeigt, dass das immobilisierte Protein enzymatisch aktiv war und weitere Proteine binden konnte.

Waldmann et al. immobilisierten azidmodifiziertes Ras mit der Staudinger-Ligation chemoselektiv auf Phosphanoberflächen (Abbildung 12).^[312,313] Die Immobilisierungsreaktion fand bei pH 7.4–7.6 und einer minimalen Proteinkonzentration von 50 µM statt. Nach vier Stunden wurde immobilisiertes Ras mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert. Da der Antikörper an eine Helix im aktiven Zentrum von Ras bindet, wurde dadurch zugleich die Erhaltung der Konformation des Proteins nachgewiesen.^[312,313] Die Azidgruppe, die in keinem nativen Protein existiert, kann beispielsweise nach Bertozzi et al. in rekombinante Proteine eingeführt werden.^[314]

3.2.2.5. Immobilisierung durch Cycloaddition

In der 1,3-dipolaren Huisgen-Cycloaddition reagieren Azide und Alkine zu 1,2,3-Triazolen. Diese Reaktion, eine so genannte Klickreaktion, bietet eine weitere leistungsfähige

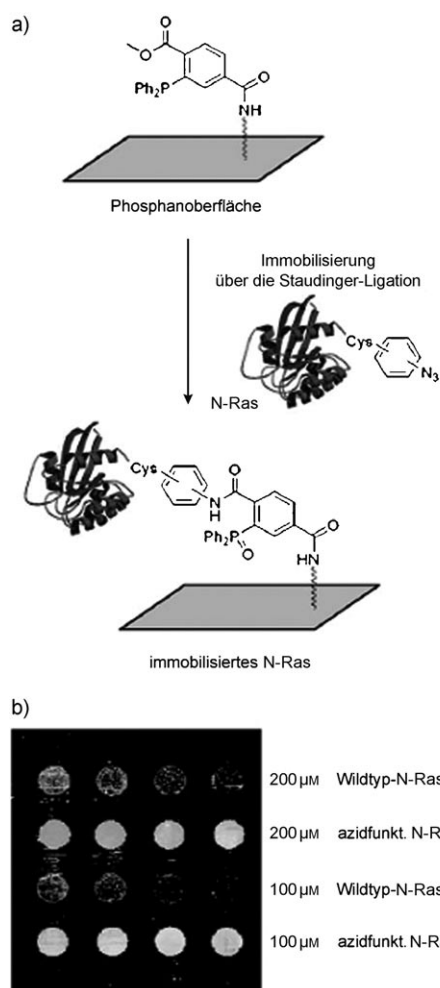


Abbildung 12. a) Azidfunktionalisiertes N-Ras wird mit der Staudinger-Ligation auf einer Phosphanoberfläche immobilisiert. b) Nach 4 h ist durch Detektion mit einem Cy5-markierten Antikörper Immobilisierung von Ras bei Konzentrationen von 100 und 200 μM, aber nicht von einem Wildtypprotein erkennbar.^[312]

Alternative zur Immobilisierung von Proteinen. Der Einsatz von Kupfer(I) als Katalysator kann jedoch zu Problemen führen, wenn empfindliche Proteine immobilisiert werden. Bertozzi et al. beschrieben kürzlich eine kupferfreie Variante dieser Reaktion, die aber noch nicht für die Immobilisierung von Proteinen eingesetzt wurde.^[315]

Distefano et al. immobilisierten azidfunktionalisierte Farnesyltransferase auf Alkinoberflächen bei Raumtemperatur über Nacht.^[316] In gleicher Weise wurden auch alkinfunktionalisierte, fluoreszierende Proteine auf Azidoberflächen immobilisiert. Lin et al. verwendeten alkin- und azidfunktionalisierte, fluoreszierende Proteine zur Immobilisierung auf Azid- bzw. Alkinoberflächen (Abbildung 13) und zeigten, dass bei Verwendung von nativen Proteinen keine Immobilisierung erfolgt. Im Fall der unidirektionalen Immobilisierung von MBP fanden die Autoren außerdem eine erhöhte Bindungsaktivität im Vergleich zur Immobilisierung in zufälliger Orientierung.^[112]

Kürzlich beschrieben Waldmann et al. die Klick-Sulfonamidreaktion (CSR) von Sulfonylaziden mit terminalen Alkinen für die Immobilisierung von Biotin, Zuckern, Phos-

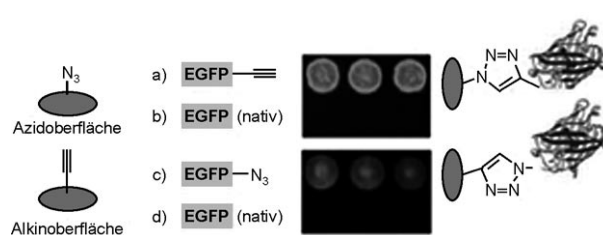


Abbildung 13. Immobilisierung von EGFP mit einer Klickreaktion: EGFP-Mikroarrays werden durch Auftragung von alkin- und azidfunktionalisiertem EGFP auf azid- bzw. alkinfunktionalisierten Oberflächen in Gegenwart von Kupfer(I) erhalten. Als Kontrolle wurde natives EGFP verwendet. Nach 12 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird mit Fluoreszenzaufnahmen funktionalisiertes Protein auf der Oberfläche nachgewiesen.^[112]

phopeptiden und Proteinen. So immobilisierten sie z. B. die alkinfunktionalisierte Ras-Bindungsdomäne (RBD) von cRaf1 auf einer Sulfonylazidoberfläche. Bei Inkubation mit aktivem, GppNHp- sowie inaktivem GDP-gebundenem Ras und schließlich mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper wurde nur die Bindung von Ras:GppNHp an die immobilisierte RBD detektiert. Dies belegte die Erhaltung der Aktivität der immobilisierten Proteine (Abbildung 14).^[317]

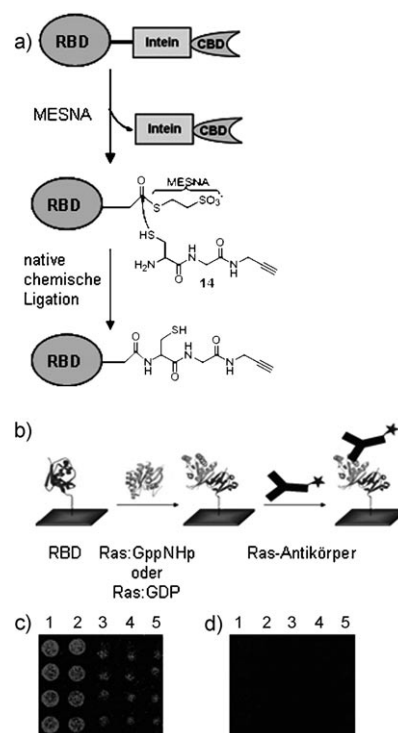


Abbildung 14. Immobilisierung der RBD von cRaf1 mit der CSR: a) Die RBD wird durch EPL mit einer Alkinverbindung funktionalisiert (MESNA: 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium). b) Das Protein wird auf eine sulfonylazidmodifizierte Oberfläche aufgebracht, die nachfolgend mit aktivem, GppNHp-gebundenem Ras und inaktivem GDP-gebundenem Ras inkubiert wird. Gebundenes Ras wird mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert. c), d) Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass nur aktives, GppNHp-gebundenes Ras (c) und nicht Ras:GDP (d) von der immobilisierten RBD gebunden wurde (1–5: 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1 mM Alkin-RBD auf der Sulfonylazidoberfläche).^[317]

Mrksich et al. verwendeten die Diels-Alder-Cycloaddition, in der elektronisch aufeinander abgestimmte Diene und Dienophile zu ungesättigten Sechsringen reagieren, für die Immobilisierung von Peptiden.^[318–320] Da die Diels-Alder-Reaktion bei Raumtemperatur und in Wasser mit hoher Selektivität und Geschwindigkeit durchgeführt werden kann, wendeten Waldmann et al. sie für die Immobilisierung von Proteinen an (Abbildung 15).^[321] Cyclopentadienfunktionali-

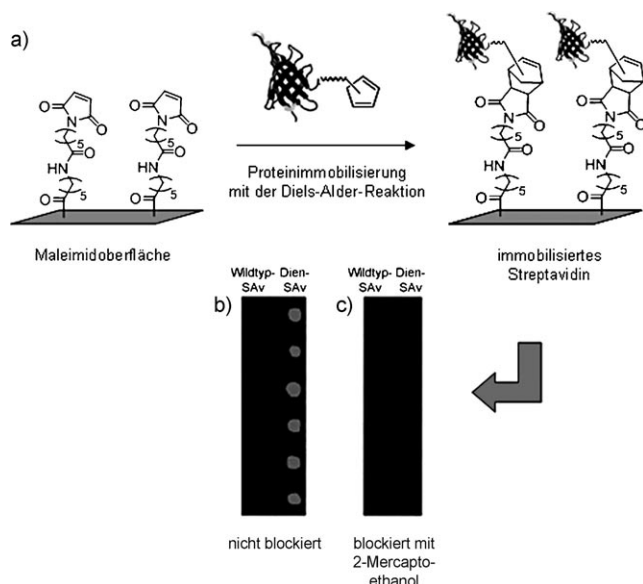


Abbildung 15. Proteinimmobilisierung mit der Diels-Alder-Cycloaddition: a) Dienmodifiziertes Streptavidin und unmodifiziertes Streptavidin als Negativkontrolle werden auf Maleimidglaträgern aufgebracht [b] ohne Blockieren, c) Blockieren der Maleimidoberfläche mit 5 % 2-Mercaptoethanol. Nach 8 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur erfolgt die Detektion mit Cy5-funktionalisiertem Biotin.^[321]

siertes SAV als Modellprotein und ein unfunktionalisiertes Kontrollprotein wurden bei pH 6 in wässriger Lösung auf eine Maleimidoberfläche aufgebracht. Mit fluoreszenzmarkiertem Biotin wurde nur das funktionalisierte Protein auf der Oberfläche detektiert.^[321] Sun et al. kombinierten die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition mit der Diels-Alder-Reaktion.^[322] Ein difunktionaler PEG-Abstandhalter, der sowohl eine Dien- als auch eine Alkinfunktion trägt, wurde auf Maleimidoberflächen immobilisiert und nachfolgend zur Immobilisierung von azidfunktionalisierten Verbindungen und Proteinen, wie Biotin, Lactose und einem rekombinanten Thrombomodulin, verwendet. Es wurden keine Nebenprodukte detektiert.^[322] Die Diels-Alder-Reaktion wurde auch zur selektiven Immobilisierung von SAV auf elektroaktiven goldgebundenen SAMs genutzt, um diese nachfolgend gezielt funktionalisieren zu können.^[319]

3.2.2.6. Andere Beispiele

Nach einem elektrochemischen Ansatz immobilisierten Corgier et al. selektiv Proteine und andere Biomoleküle auf Oberflächen.^[323] Sie funktionalisierten dazu Oligonucleotide,

Antikörper und Meerrettichperoxidase mit Anilingroupen, die nach Oxidation zu Aryldiazoniumsalzen kovalent und regioselektiv auf einer Graphitelektrode immobilisiert wurden. Die Aktivität der immobilisierten Proteine wurde in Folgeuntersuchungen nachgewiesen. Derzeit wird die Methode zur Herstellung von Biochips weiterentwickelt.^[323]

Zhang et al. nutzten die nichtnatürliche Aminosäure Azidophenylalanin für die Photoimmobilisierung von Proteinen.^[324] Ein Polypeptid mit einer hydrophobe Oberflächen bindenden, Elastin nachahmenden, Azidophenylalanin-haltigen Domäne sowie einer Domäne eines Leucin-Zipper-Domänenpaars wurde in *E. coli* exprimiert. Nach Aufbringen des Polypeptids auf Alkyloberflächen führte die Aktivierung der Arylazidgruppe mit UV-Licht bei 254 nm zur kovalenten Immobilisierung des Peptids über die Elastin nachahmende Domäne.^[324] Eine Inkubation der Oberfläche mit Fusionsproteinen aus GST oder GFP, die mit der zweiten Domäne des heterodimeren Leucin-Zipper-Paares funktionalisiert worden waren, führte wegen der hohen Affinität des Leucin-Zipper-Paares von 10^{-15} M nachfolgend zur nichtkovalenten Immobilisierung der Fusionsproteine.^[324]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung neuer chemischer Strategien zur Herstellung von Proteinbiochips legt den Grundstein für neue Technologien in diesem noch jungen Forschungsfeld. Die chemische Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen kann chemo- und regioselektiv (d.h. gerichtet) durchgeführt werden, sodass – anders als bei herkömmlichen, ungerichteten Strategien – eine steuerbare, einheitliche Proteinorientierung auf der Oberfläche möglich ist. Auf diese Weise kann z.B. eine schlechte Zugänglichkeit von aktiven Zentren wegen zufälliger Orientierung der Proteine auf der Chipoberfläche vermieden werden. Ferner ist es möglich, die Form und die Ausdehnungen von Proteinmustern auf Chipoberflächen frei zu bestimmen.

Proteinbiochips werden derzeit insbesondere für die Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Es ist anzunehmen, dass chemische Immobilisierungsstrategien, die steuer- und anpassbar sind, einen großen Einfluss auf die Eigenschaften von Proteinbiochips haben werden. Die Kombination von chemo- und regioselektiver Proteinimmobilisierung sowie die freie Bestimmbarkeit der Geometrie und der Ausmaße von Proteinmustern auf Oberflächen werden neue Möglichkeiten im Bereich der Proteinwechselwirkungsforschung (Proteomik) eröffnen. Auch sind entscheidende Einflüsse auf die Biomaterialentwicklung vorhersehbar. Allerdings sind dabei einige Hindernisse zu überwinden: Zum einen müssen chemische Immobilisierungsmethoden optimiert werden, um eine große Vielfalt von Proteinen unter kontrollierten Bedingungen einfach und schnell immobilisieren zu können. Einstufige Strategien ohne die Erfordernis einer zusätzlichen Reinigung von Proteinen nach deren Expression sind hier erstrebenswert. Zum anderen fehlen robuste Prozesse für die schnelle Immobilisierung von Hunderten oder Tausenden von Proteinen in nanometer-großen Mustern.

Jüngste Fortschritte im Bereich der Nanotechnologie könnten Lösungsansätze bieten.^[29,325,326] Delamarche et al. entwickelten eine elegante Nanodruckmethode zur Immobilisierung von Antikörpern auf Oberflächen,^[327] während Gaub et al. mit einer hochpräzisen, DNA-basierten Immobilisierungsmethode Strukturen von Biomolekülen im Nanometerbereich herstellen konnten.^[17]

Die kontinuierliche Weiterentwicklung der Synthesemethoden führt zu neuen Strategien für die chemo- und regio-selektive Immobilisierung von Biomolekülen.^[219,323,324] Die Einführung der nichtnatürlichen Aminosäure Azidophenylalanin in Proteine ermöglicht z.B. deren kovalente Immobilisierung auf funktionalisierten Glasoberflächen mit UV-Licht.^[324] Eine andere elegante Methode nutzt die photoaktivierbare Thiol-En-Reaktion, die eine einstufige Photoimmobilisierung von funktionalen Biomolekülen wie Phosphopeptiden möglich macht.^[219]

Aus Sicht des Chemikers ist es notwendig, die klassischen Disziplinen der organischen Chemie, Biochemie, Materialwissenschaften und Physik zu vereinen. Die Kombination von chemischer Effizienz und chemischer Selektivität mit der gezielten Modifizierung semisynthetischer Proteine und anderer Biomoleküle wird eine effiziente Herstellung von Proteinbiochips höchster Qualität ermöglichen. Wegen der wachsenden Zahl von Hochdurchsatzanlagen zur Proteinwechselwirkungsforschung und der Fortschritte im Bereich der Nanofabrikation ist zu vermuten, dass eine neue Generation von Proteinbiochips, die auf molekularer Ebene gezielt manipuliert werden können, in nicht zu ferner Zukunft für den Einsatz in Forschung und Anwendungen zur Verfügung stehen wird.

Wir bedanken uns für die vielen Diskussion und Beiträge unserer ehemaligen und jetzigen Kollegen, deren Namen in den Literaturstellen aufgeführt sind. Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft, der TU Dortmund, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Zentrum für Angewandte Chemische Genomik, gefördert durch das Land Nordrhein-Westfalen und die EU, für die finanzielle Unterstützung unserer Forschung in Dortmund. Pascal Jonkheijm dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium.

Eingegangen am 11. April 2008

- [1] E. Phizicky, P. I. H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, 422, 208–215.
- [2] P. Mitchell, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 225–229.
- [3] A. Talapatra, R. Rouse, G. Hardiman, *Pharmacogenomics* **2002**, 3, 527–536.
- [4] J. LaBaer, N. Ramachandran, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 14–19.
- [5] H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 55–63.
- [6] J. S. Merkel, G. A. Michaud, M. Salcius, B. Schweitzer, P. F. Predki, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 447–452.
- [7] D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 510–517; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 494–500.
- [8] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 160–166.
- [9] K.-y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, 6, 782–799.

- [10] B. Schweitzer, P. Predki, M. Snyder, *Proteomics* **2003**, 3, 2190–2199.
- [11] P. F. Predki, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 8–13.
- [12] C. M. Niemeyer, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 395–401.
- [13] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Y. Jiang, D. E. Ingber, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2001**, 3, 335–373.
- [14] M. M. Stevens, J. H. George, *Science* **2005**, 310, 1135–1138.
- [15] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1230–1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1180–1218.
- [16] C. M. Niemeyer, *Nanotoday* **2007**, 2, 42–52.
- [17] K. Blank, T. Mai, I. Gilbert, S. Schiffmann, J. Rankl, R. Zivin, C. Tackney, T. Nicolaus, K. Spinnler, F. Oesterheld, M. Benoit, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100.
- [18] N. Sniadecki, R. A. Desai, S. A. Ruiz, C. S. Chen, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, 34, 59–74.
- [19] W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, 16, 165–176.
- [20] W. Kusnezow, A. Jacob, A. Walijew, F. Diehl, J. D. Hoheisel, *Proteomics* **2003**, 3, 254–264.
- [21] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, *Mikrochim. Acta* **1998**, 128, 127–143.
- [22] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* **2001**, 293, 2101–2105.
- [23] Y.-Y. Luk, M. L. Tingey, K. A. Dickson, R. T. Raines, N. L. Abbott, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9024–9032.
- [24] P.-C. Lin, S.-H. Ueng, M.-C. Tseng, J.-L. Ko, K.-T. Huang, S.-C. Yu, A. K. Adak, Y.-J. Chen, C.-C. Lin, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4392–4396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4286–4290.
- [25] A. A. H. Talasaz, M. Nemat-Gorgani, Y. Liu, P. Stahl, R. W. Dutton, M. Ronaghi, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 14773–14778.
- [26] F. Rusmini, Y. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1775–1789.
- [27] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3039–3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2865–2869.
- [28] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1276–1289.
- [29] *Nanobiotechnology, Vol. I & II*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, **2007**.
- [30] K. Salaita, Y. Wang, C. A. Mirkin, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 145–155.
- [31] D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 30–46; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 30–45.
- [32] R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* **1999**, 283, 661–663.
- [33] N. Ramachandran, D. N. Larson, P. R. H. Stark, E. Hainsworth, J. LaBaer, *FEBS J.* **2005**, 272, 5412–5425.
- [34] H. J. Lee, Y. Yan, G. Marriott, R. M. Corn, *J. Physiol.* **2005**, 563.1, 61–71.
- [35] A. J. Holloway, R. K. van Laar, R. W. Tothill, D. D. Bowtell, *Nat. Genet.* **2002**, 32, 481–489.
- [36] E. Southern, M. Mir, M. Shchepinov, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 5–9.
- [37] V. G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucheralapati, G. Childs, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 15–19.
- [38] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7967–7968.
- [39] P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7849–7850.
- [40] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 92–98.
- [41] A. del Campo, I. J. Bruce, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 260, 77–111.
- [42] J. Heise, F. F. Bier, *Top. Curr. Chem.* **2006**, 267, 1–25.
- [43] J. A. Howarter, J. P. Youngblood, *Langmuir* **2006**, 22, 11142–11147.

- [44] A. V. Krasnoslobodtsev, S. N. Smirnov, *Langmuir* **2002**, *18*, 3181–3184.
- [45] P. Silberzan, L. Léger, D. Ausserré, J. J. Benattar, *Langmuir* **1991**, *7*, 1647–1651.
- [46] Beispiel für eine Oberflächenfunktionalisierung mit APTES: Eine gereinigte und plasmabehandelte Glasoberfläche wird in eine Lösung aus Ethanol/Wasser/APTES (95:3:2) überführt. Nachfolgend wird vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wird die Oberfläche mit Ethanol und Aceton gereinigt. R. Benders, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686–694.
- [47] M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1970–1977.
- [48] R. Benders, C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, D. Wöhrle, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 10e.
- [49] P. K. Ajikumar, J. K. Ng, Y. C. Tang, J. Y. Lee, G. Stephanopoulos, H. P. Too, *Langmuir* **2007**, *23*, 5670–5677.
- [50] V. Le Berre, E. Trevisiol, A. Dagkessamanskaia, A.-M. Caminade, J. P. Majoral, B. Meunier, J. François, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 88e.
- [51] S. Pathak, A. K. Singh, J. R. McElhanon, P. M. Dentinger, *Langmuir* **2004**, *20*, 6075–6079.
- [52] T. Strother, W. Cai, X. S. Zhao, R. J. Hamers, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205–1209.
- [53] G. M. Harbers, K. Emoto, C. Greef, S. W. Metzger, H. N. Woodward, J. J. Mascali, D. W. Grainger, M. J. Lochhead, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4405–4414.
- [54] C. S. Tang, M. Dusseiller, S. Makohliso, M. Heuschkel, S. Sharma, B. Keller, J. Vörös, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 711–717.
- [55] K. Kim, H. Yang, S. Jon, E. Kim, J. Kwak, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15368–15369.
- [56] K. Kim, J. Hwang, I. Seo, T. H. Hwan, J. Kwak, *Chem. Commun.* **2006**, 4723–4725.
- [57] W. Yang, J. E. Butler, J. N. Russell, R. J. Hamers, *Langmuir* **2004**, *20*, 6778–6787.
- [58] L. Szyk-Warszynska, A. Trybala, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *314*, 398–404.
- [59] A. Minarik, M. Humenik, S. Li, Y. Huang, G. Krausch, M. Sprinzl, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 124–130.
- [60] H. Okusa, K. Kurihara, T. Kunitake, *Langmuir* **1994**, *10*, 3577–3581.
- [61] N. P. Huang, R. Michel, J. Vörös, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, *Langmuir* **2001**, *17*, 489–498.
- [62] K. De Groot, R. Geesink, C. P. A. T. Klein, P. Serekian, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21*, 1375–1381.
- [63] S. Pallu, C. Bourget, R. Bareille, C. Labrugere, M. Dard, A. Sewing, A. Jonczyk, M. Vernizeau, M. Christine Durrieu, J. Amedee-Vilamitjana, *Biomaterials* **2005**, *26*, 6932–6940.
- [64] C. R. Kessel, S. Granick, *Langmuir* **1991**, *7*, 532–538.
- [65] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554.
- [66] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.
- [67] P. Wagner, M. Hegner, P. Kern, F. Zaugg, G. Semenza, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2052–2066.
- [68] C. D. Hodneland, Y.-S. Lee, D.-H. Min, M. Mrksich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5048–5052.
- [69] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7164–7175.
- [70] J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8044–8051.
- [71] R. Jakob, *BioEngineering* **1994**, *10*, 16–19.
- [72] J. R. Crowther, *ELISA: Theory and Practice*, Humana, New Jersey, **1995**.
- [73] R. S. Matson, R. C. Milton, M. C. Cress, T. S. Chan, J. B. Rampal, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *381*, 339–362.
- [74] U. B. Nielsen, M. H. Cardone, A. J. Sinskey, G. MacBeath, P. K. Sorger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9330–9335.
- [75] F. Fixe, M. Dufva, P. Tellemann, C. B. V. Christensen, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 9e.
- [76] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, *Science* **1997**, *276*, 779–781.
- [77] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 283–289.
- [78] M. Nishikawa, T. Yamamoto, N. Kojima, K. Kikuo, T. Fujii, Y. Sakai, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1472–1481.
- [79] S. A. Soper, A. C. Henry, B. Vaidya, M. Galloway, M. Wabuyele, R. L. McCarley, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *470*, 87–99.
- [80] S. C. Popescu, G. V. Popescu, S. Bachan, Z. Zhang, M. Seay, M. Gerstein, M. Snyder, S. P. Dinesh-Kumar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4730–4735.
- [81] S. Lemeer, R. Ruijtenbeek, M. W. H. Pinkse, C. Jopling, A. J. R. Heck, J. den Hertog, M. Slijper, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2088–2099.
- [82] E. N. Timofeev, A. D. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3142–3148.
- [83] D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmel, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. D. Mirzabekov, *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 203–211.
- [84] C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 98–105.
- [85] S. Piletsky, E. Piletska, A. Bossi, N. Turner, A. Turner, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 86–92.
- [86] M. M. Dominguez, M. Wathier, M. W. Grinstaff, S. E. Schaus, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1064–1066.
- [87] S. Kiyonaka, K. Sada, I. Yoshimura, S. Shinkai, N. Kato, I. Hamachi, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 58–64.
- [88] J. J. Yoon, Y. S. Nam, J. H. Kim, T. G. Park, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 1–10.
- [89] V. Hlady, J. Buijs, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 72–77.
- [90] J. J. Gray, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 110–115.
- [91] C. M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 1918–1930.
- [92] N. Nath, J. Hyun, H. Ma, A. Chilkoti, *Surf. Sci.* **2004**, *570*, 98–110.
- [93] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 5605–5620.
- [94] J. Ponten, L. Stolt, *Exp. Cell Res.* **1980**, *129*, 367–375.
- [95] S. B. Carter, *Nature* **1965**, *208*, 1183–1187.
- [96] Y. Y. Luk, M. Kato, M. Mrksich, *Langmuir* **2000**, *16*, 9604–9608.
- [97] T. G. Vargo, E. J. Bekos, Y. S. Kim, J. P. Ranieri, R. Bellamkonda, P. Aebischer, D. E. Margevich, P. M. Thompson, F. V. Bright, J. A. Gardella, Jr., *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 767–778.
- [98] K. S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162–13163.
- [99] J. Groll, E. V. Amirgoulova, T. Ameringer, C. D. Heyes, C. Röcker, G. U. Nienhaus, M. Möller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4234–4239.
- [100] R. Michel, S. Pasche, M. Textor, D. G. Castner, *Langmuir* **2005**, *21*, 12327–12332.
- [101] T. Sugawara, T. Matsuda, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 1047–1052.
- [102] D. Batra, S. Vogt, P. D. Laible, M. A. Firestone, *Langmuir* **2005**, *21*, 10301–10306.
- [103] J. D. Mendelsohn, S. Y. Yang, J. A. Hiller, A. I. Hochbaum, M. F. Rubner, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 96–106.
- [104] C. M. Yam, M. Deluge, D. Tang, A. Kumar, C. Cai, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296*, 118–130.
- [105] M. Mrksich, G. B. Sigal, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1995**, *11*, 4383–4385.

- [106] J. Hoffmann, J. Groll, J. Heuts, H. Rong, D. Klee, G. Ziemer, M. Möller, H. P. Wendel, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 985–996.
- [107] S. J. Dilly, M. P. Beecham, S. P. Brown, J. M. Griffin, A. J. Clark, C. D. Griffin, J. Marshall, R. M. Napier, P. C. Taylor, A. Marsh, *Langmuir* **2006**, *22*, 8144–8150.
- [108] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714–10721.
- [109] S. Chen, J. Zheng, L. Li, S. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14473–14478.
- [110] R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2003**, *19*, 2388–2391.
- [111] K. M. Rusin, T. L. Fare, J. Z. Stemple, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 367–371.
- [112] P.-C. Lin, S.-H. Ueng, M.-C. Tseng, J.-L. Ko, K.-T. Huang, S.-C. Yu, A. K. Adak, Y. J. Chen, C.-C. Lin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4392–4396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286–4290.
- [113] K. Holland-Nell, A. G. Beck-Sickinger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1071–1076.
- [114] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54–61.
- [115] B. A. Stillman, J. L. B. Tonkinson, *BioTechniques* **2000**, *29*, 630–635.
- [116] M. Reck, F. Stahl, J. G. Walter, M. Hollas, D. Melzner, T. Scheper, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 1498–1505.
- [117] D. L. Wilson, R. Martin, S. Hong, M. Cronin-Golomb, C. A. Mirkin, D. L. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13660–13664.
- [118] K.-B. Lee, J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5588–5589.
- [119] H. Zhang, K.-B. Lee, Z. Li, C. A. Mirkin, *Nanotechnology* **2003**, *14*, 1113–1117.
- [120] C. Wang, Y. Zhang, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 150–153.
- [121] J. M. Slocik, E. R. Beckel, H. Jiang, J. O. Enlow, J. S. Zabin-ski, Jr., T. J. Bunning, R. R. Naik, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2095–2100.
- [122] N. Kumar, J.-I. Hahn, *Langmuir* **2005**, *21*, 6652–6655.
- [123] L. M. Lee, R. L. Heimark, J. C. Baygents, Y. Zohar, *Nano-technology* **2006**, *17*, S29–S33.
- [124] J.-M. Jung, K. Y. Kwon, T.-H. Ha, B. H. Chung, H.-T. Jung, *Small* **2006**, *2*, 1010–1015.
- [125] J. Doh, D. J. Irvine, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9170–9171.
- [126] C. M. Yam, M. Deluge, D. Tang, A. Kumar, C. Cai, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296*, 118–130.
- [127] N. Patel, M. C. Davies, M. Hartshorne, R. J. Heaton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, *Langmuir* **1997**, *13*, 6485–6490.
- [128] B. Johnsson, S. Loefaas, G. Lindquist, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268–277.
- [129] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 389–396.
- [130] K. Jiang, L. S. Schadler, R. W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, M. Terrones, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37–39.
- [131] S. F. D'Souza, S. S. Godbole, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *52*, 59–62.
- [132] H. J. Choi, N. H. Kim, B. H. Chung, G. H. Seong, *Anal. Biochem.* **2005**, *347*, 60–66.
- [133] C. Mateo, R. Torres, G. Fernandez-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. Lopez-Gallego, O. Abian, J. M. Palomo, L. Betancor, B. C. C. Pessela, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 772–777.
- [134] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760–1763.
- [135] N. V. Avseenko, T. Y. Morozova, F. I. Ataullakhanov, V. N. Morozov, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6047–6052.
- [136] a) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 300–366; b) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 478–534; c) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 431–478; d) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 1–39; e) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 351–382; f) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 352–376; g) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 388–407; h) R. L. Rich, D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 223–228; i) S. Löfas, B. Johnsson, A. Edström, A. Hansson, G. Lindquist, R.-M. Müller Hillgren, L. Stigh, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 813–822.
- [137] R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, G. MacBeath, *Nature* **2006**, *439*, 168–174.
- [138] D. I. Rozkiewicz, Y. Kraan, M. W. T. Werten, F. A. de Wolf, V. Subramaniam, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6290–6297.
- [139] C. Mateo, O. Abian, G. Fernandez-Lorente, J. Pedroche, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, A. Tam, M. Daminati, *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 629–634.
- [140] V. Grazu, O. Abian, C. Mateo, F. Batista-Viera, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1495–1501.
- [141] P. Angenendt, J. Glokler, J. Sobek, H. Lehrach, D. J. Cahill, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 97–104.
- [142] S. L. Seurnyck-Servoss, C. L. Baird, K. D. Rodland, R. C. Zangar, *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 3956–3964.
- [143] S. L. Seurnyck-Servoss, A. M. White, C. L. Baird, K. D. Rodland, R. C. Zangar, *Anal. Biochem.* **2007**, *371*, 105–115.
- [144] B. Guillaume, A. Buneß, C. Schmidt, F. Klimek, G. Moldenhauer, W. Huber, D. Arlt, U. Korf, S. Wiemann, A. Poustka, *Proteomics* **2005**, *5*, 4705–4712.
- [145] C. Wingren, J. Ingvarsson, L. Dexlin, D. Szul, C. A. K. Borrebaeck, *Proteomics* **2007**, *7*, 3055–3065.
- [146] C. L. Feng, A. Embrechts, I. Bredebush, J. Schnakenburger, W. Domschke, G. J. Vancso, H. Schönherr, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 286–290.
- [147] S. M. Bhargale, V. Tjong, L. Wu, N. Yakovlev, P. M. Moran, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 809–813.
- [148] G.-Y. Liu, N. A. Amro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5165–5170.
- [149] K. Wadu-Mesthrige, S. Xu, N. A. Amro, G.-y. Liu, *Langmuir* **1999**, *15*, 8580–8583.
- [150] M. A. Case, G. L. McLendon, Y. Hu, T. K. Vanderlick, G. Scoles, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 425–429.
- [151] Y. Hu, A. Das, M. H. Hecht, G. Scoles, *Langmuir* **2005**, *21*, 9103–9109.
- [152] S. W. Lee, B.-K. Oh, R. G. Sanedrin, K. Salaita, T. Fujigaya, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1133–1136.
- [153] K.-B. Lee, S.-J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, M. Mrksich, *Science* **2002**, *295*, 1702–1705.
- [154] K.-B. Lee, E.-Y. Kim, C. A. Mirkin, S. M. Wolinsky, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1869–1872.
- [155] R. A. Vega, D. Maspocho, K. Salaita, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6167–6169; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6013–6015.
- [156] N. P. Reynolds, S. Janusz, M. Escalante-Marun, J. Timney, R. E. Ducker, J. D. Olsen, C. Otto, V. Subramaniam, G. J. Leggett, C. N. Hunter, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14625–14631.
- [157] R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida, J. M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 546–550.
- [158] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [159] K. R. Bhushan, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1857–1859.
- [160] A. S. Blawas, T. F. Oliver, M. C. Pirrung, W. M. Reichert, *Langmuir* **1998**, *14*, 4243–4250.
- [161] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479–12520.
- [162] I. Caelen, H. Gao, H. Sigrüst, *Langmuir* **2002**, *18*, 2463–2467.
- [163] A. Collioud, J. F. Clemence, M. Saenger, H. Sigrüst, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 528–536.

- [164] C. Philipona, Y. Chevolot, D. Léonard, H. J. Mathieu, H. Sigrist, F. Marquis-Weible, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 332–336.
- [165] L. F. Rozsnyai, D. R. Benson, S. P. Fodor, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 801–802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 759–761.
- [166] P. Nahar, N. M. Wali, R. P. Gandhi, *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 148–153.
- [167] D. A. Nivens, D. W. Conrad, *Langmuir* **2002**, *18*, 499–504.
- [168] D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 84–86; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 91–93.
- [169] M. Yan, S. X. Cai, M. N. Wybourne, J. F. W. Keana, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 814–816.
- [170] S. K. Bhatia, J. J. Hickman, F. S. Ligler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4432–4433.
- [171] M. T. Neves-Petersen, T. Snabe, S. Klitgaard, M. Duroux, S. Petersen, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 343–351.
- [172] M. R. Martzen, S. M. McCraith, S. L. Spinelli, F. M. Torres, S. Fields, E. J. Grayhack, E. M. Phizicky, *Science* **1999**, *286*, 1153–1155.
- [173] P. Riggs, *Mol. Biotechnol.* **2000**, *15*, 51–63.
- [174] B. A. Bouchard, B. Furie, B. C. Furie, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9517–9523.
- [175] J. Schmitt, J. Hess, H. G. Stunnenberg, *Mol. Biol. Rep.* **1993**, *18*, 223–230.
- [176] S. Svendsen, C. Zimprich, M. McDougall, D. Klaubert, G. Los, *BMC Cell Biol.* **2008**, *9*, 17.
- [177] G. V. Los, K. Wood, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *356*, 195–208.
- [178] Y. Zhang, M.-K. So, A. M. Loening, H. Yao, S. S. Gambhir, J. Rao, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5058–5062; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4936–4940.
- [179] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1979–1985.
- [180] E. Gizeli, J. Glad, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3995–4001.
- [181] G. Zhen, D. Falconnet, E. Kuennemann, J. Vörös, N. D. Spencer, M. Textor, S. Zurcher, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 243–251.
- [182] P. D. Gershon, S. Khilko, *J. Immunol. Methods* **1995**, *183*, 65–76.
- [183] R. Gamsjaeger, B. Wimmer, H. Kahr, A. Tinazli, S. Picuric, S. Lata, R. Tampé, Y. Maulet, H. J. Gruber, P. Hinterdorfer, C. Romanin, *Langmuir* **2004**, *20*, 5885–5890.
- [184] K. Kato, H. Sato, H. Iwata, *Langmuir* **2005**, *21*, 7071–7075.
- [185] M. J. W. Ludden, A. Mulder, K. Schulze, V. Subramaniam, R. Tampé, J. Huskens, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2044–2051.
- [186] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752–5753.
- [187] A. Tinazli, J. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg, R. Tampé, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5249–5259.
- [188] G. J. Wegner, H. J. Lee, G. Marriott, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4740–4746.
- [189] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [190] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205–10215.
- [191] I. T. Dorn, K. Pawlitschko, S. C. Pettinger, R. Tampé, *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 1151–1159.
- [192] I. T. Dorn, R. Eschrich, E. Seemüller, R. Guckenberger, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 1027–1036.
- [193] S. Hutschenreiter, A. Tinazli, K. Model, R. Tampé, *EMBO J.* **2004**, *23*, 2488–2497.
- [194] A. Turchanin, A. Tinazli, M. El-Desawy, H. Großmann, M. Schnietz, H. H. Solak, R. Tampé, A. Götzhäuser, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 471–477.
- [195] J. A. Hansen, V. V. Sumbayev, K. V. Gothelf, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2831–2834.
- [196] W.-S. Yeo, D.-H. Min, R. W. Hsieh, G. L. Greene, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5616–5619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5480–5483.
- [197] V. L. Marin, T. H. Bayburt, S. G. Sligar, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8952–8954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8796–8798.
- [198] R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, R. Tampé, B. Liedberg, J. Piehler, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1325–1329.
- [199] J. Groll, W. Haubensak, T. Ameringer, M. Möller, *Langmuir* **2005**, *21*, 3076–3083.
- [200] P. Maury, M. Escalante-Marun, M. Péter, D. N. Reinhoudt, V. Subramaniam, J. Huskens, *Small* **2007**, *3*, 1584–1592.
- [201] A. Tinazli, J. Piehler, M. Beuttler, R. Guckenberger, R. Tampé, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 220–225.
- [202] J.-M. Nam, S. W. Han, K.-B. Lee, X. Liu, M. A. Ratner, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1266–1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1246–1249.
- [203] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85–133.
- [204] C. L. Smith, G. S. Milea, G. H. Nguyen, *Top. Curr. Chem.* **2006**, *261*, 63–90.
- [205] J. Spinke, M. Liley, F. J. Schmitt, H. J. Guder, L. Angermaier, W. Knoll, *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 7012–7019.
- [206] W. Muller, H. Ringsdorf, E. Rump, G. Wildburg, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, M. Liley, J. Spinke, *Science* **1993**, *262*, 1706–1708.
- [207] J. Spinke, M. Liley, H. J. Guder, L. Angermaier, W. Knoll, *Langmuir* **1993**, *9*, 1821–1825.
- [208] P. L. Edmiston, J. E. Lee, S. S. Cheng, S. S. Saavedra, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 560–570.
- [209] L. L. Wood, S.-S. Cheng, P. L. Edmiston, S. S. Saavedra, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 571–576.
- [210] F. Xu, G. Zhen, F. Yu, E. Kuennemann, M. Textor, W. Knoll, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13084–13085.
- [211] G. Romet-Lemonne, M. VanDuijn, M. Dogterom, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2350–2354.
- [212] M. J. W. Ludden, X. Y. Ling, T. Gang, W. P. Bula, H. J. G. E. Gardeniers, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 136–142.
- [213] M. C. Pirrung, C.-Y. Huang, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 317–321.
- [214] S. A. Sundberg, R. W. Barrett, M. Pirrung, A. L. Lu, B. Kiangoontra, C. P. Holmes, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12050–12057.
- [215] D. Ryan, B. A. Parviz, V. Linder, V. Semetey, S. K. Sia, J. Su, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2004**, *20*, 9080–9088.
- [216] A. Buxboim, M. Bar-Dagan, V. Frydan, D. Zbaida, M. Morpurgo, R. Bar-Ziv, *Small* **2007**, *3*, 500–510.
- [217] K. L. Christman, H. D. Maynard, *Langmuir* **2005**, *21*, 8389–8393.
- [218] K. L. Christman, M. V. Requa, V. D. Enriquez-Rios, S. C. Ward, K. A. Bradley, K. L. Turner, H. D. Maynard, *Langmuir* **2006**, *22*, 7444–7450.
- [219] P. Jonkhøj, D. Weinrich, M. Köhn, H. E. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nüsse, H. Schroeder, R. Wacker, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4493–4496; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421–4424.
- [220] Y. Chang, Y. S. Ahn, H. T. Hahn, Y. Chen, *Langmuir* **2007**, *23*, 4112–4114.
- [221] J. Lahiri, E. Ostuni, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1999**, *15*, 2055–2060.
- [222] J. Hyun, S. J. Ahn, W. K. Lee, A. Chilkoti, S. Zauscher, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1203–1207.
- [223] M. J. W. Ludden, M. Peter, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Small* **2006**, *2*, 1192–1202.
- [224] R. Dong, S. Krishnan, B. A. Baird, M. Lindau, C. K. Ober, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3082–3092.

- [225] J. Gu, C. M. Yam, S. Li, C. Cai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8098–8099.
- [226] M. Lee, D.-K. Kang, H.-K. Yang, K.-H. Park, S. Y. Choe, C. Kang, S.-I. Chang, M. H. Han, I.-C. Kang, *Proteomics* **2006**, *6*, 1094–1103.
- [227] J. Rundqvist, J. H. Hoh, D. B. Haviland, *Langmuir* **2006**, *22*, 5100–5107.
- [228] L. A. Ruiz-Taylor, T. L. Martin, F. G. Zaugg, K. Witte, P. Indermuhle, S. Nock, P. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 852–857.
- [229] D. Falconnet, D. Pasqui, S. Park, R. Eckert, H. Schiff, J. Gobrecht, R. Barbucci, M. Textor, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1909–1914.
- [230] J. D. Hoff, L.-J. Cheng, E. Meyhöfer, L. J. Guo, A. J. Hunt, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 853–857.
- [231] S. H. Park, P. Yin, Y. Liu, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 729–733.
- [232] H. Li, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 418–419.
- [233] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, *301*, 1882–1884.
- [234] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Lenhert, S. Gao, H. Fuchs, L. Chi, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 260–264.
- [235] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. Chi, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3183–3187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3055–3059.
- [236] Y. He, Y. Tian, A. E. Ribbe, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12664–12665.
- [237] A. Frago, J. Caballero, E. Almirall, R. Villalonga, R. Cao, *Langmuir* **2002**, *18*, 5051–5054.
- [238] I. Hwang, K. Baek, M. Jung, Y. Kim, K. M. Park, D.-W. Lee, N. Selvapalam, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4170–4171.
- [239] J. E. Cronan, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10327–10333.
- [240] D. Samols, C. G. Thornton, V. L. Murtif, G. K. Kumar, F. C. Haase, H. G. Wood, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6461–6464.
- [241] P. J. Schatz, *Biotechnology* **1993**, *11*, 1138–1143.
- [242] J. Yin, F. Liu, X. Li, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7754–7755.
- [243] C. M. Niemeyer, J. Koehler, C. Wuerdemann, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 242–245.
- [244] R. Y. P. Lue, G. Y. J. Chen, Y. Hu, Q. Zhu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1055–1062.
- [245] S. Chattopadhyaya, L.-P. Tan, S. Q. Yao, *Nat. Protocols* **2006**, *1*, 2386–2398.
- [246] M.-L. Lesachere, R. Y. P. Lue, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8768–8769.
- [247] B. Lu, M. R. Smyth, R. O’Kennedy, *Analyst* **1996**, *121*, 29R–32R.
- [248] J. Turkova, *J. Chromatogr. B* **1999**, *722*, 11–31.
- [249] A. Lueking, D. J. Cahill, S. Muellner, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 789–794.
- [250] a) C. A. K. Borrebaeck, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 379–382; b) Y. Jung, J. Y. Jeong, B. Y. Chung, *Analyst* **2008**, *133*, 697–701.
- [251] Y. Jung, J. M. Lee, H. Jung, B. H. Chung, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6534–6541.
- [252] O. Melnyk, X. Duburcq, C. Olivier, F. Urbes, C. Auriault, H. Gras-Masse, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 713–720.
- [253] X. Duburcq, C. Olivier, F. Malingue, R. Desmet, A. Bouzidi, F. Zhou, C. Auriault, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 307–316.
- [254] C. P. Johnson, I. E. Jensen, A. Prakasam, R. Vijayendran, D. Leckband, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 974–978.
- [255] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5530–5539.
- [256] S. Howorka, S. Cheley, H. Bayley, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 636–639.
- [257] K. Glynou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1024–1029.
- [258] I. A. Kozlov, P. C. Melnyk, K. E. Stromborg, M. S. Chee, D. L. Barker, C. Zhao, *Biopolymers* **2004**, *73*, 621–630.
- [259] R. Schlapak, P. Pammer, D. Armitage, R. Zhu, P. Hinterdorfer, M. Vaupel, T. Fruehwirth, S. Howorka, *Langmuir* **2006**, *22*, 277–285.
- [260] C. Boozer, J. Ladd, S. Chen, S. Jiang, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1515–1519.
- [261] C. Boozer, J. Ladd, S. Chen, Q. Yu, J. Homola, S. Jiang, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6967–6972.
- [262] P. Kumar, K. C. Gupta, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 507–512.
- [263] F. Kukulka, M. Lovrinovic, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Bioconjugation protocols: Strategies and methods*, Humana, New Jersey, **2004**.
- [264] F. Kukulka, C. M. Niemeyer, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2203–2206.
- [265] R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Current Protocols in nucleic acid chemistry*, Vol. 21, Wiley, New York, **2005**.
- [266] R. Wacker, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 453–459.
- [267] R. Wacker, H. Schroder, C. M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 281–287.
- [268] R. C. Bailey, G. A. Kwong, C. G. Radu, O. N. Witte, J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1959–1967.
- [269] S. Takeda, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2407–2410.
- [270] M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822–823.
- [271] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [272] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *335*, 943–948.
- [273] M. Lovrinovic, M. Spengler, C. Deutsch, C. M. Niemeyer, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 64–69.
- [274] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 61–67.
- [275] C. F. W. Becker, R. Wacker, W. Bouschen, R. Seidel, B. Kolaric, P. Lang, H. Schroeder, O. Müller, C. M. Niemeyer, B. Spengler, R. S. Goody, M. Engelhard, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7808–7812; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7635–7639.
- [276] J. Ladd, C. Boozer, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, S. Jiang, *Langmuir* **2004**, *20*, 8090–8095.
- [277] C. M. Niemeyer, R. Wacker, M. Adler, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 90e.
- [278] C. M. Niemeyer, L. Boldt, B. Ceyhan, D. Blohm, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 54–63.
- [279] L. Fruk, J. Müller, G. Weber, A. Narváez, E. Domínguez, C. M. Niemeyer, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5223–5231.
- [280] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3241–3246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3179–3183.
- [281] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 109–139.
- [282] U. Feldkamp, R. Wacker, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 367–372.
- [283] N. Ramachandran, E. Hainsworth, B. Bhullar, S. Eisenstein, B. Rosen, A. Y. Lau, J. C. Walter, J. LaBaer, *Science* **2004**, *305*, 86–90.
- [284] S.-C. Tao, H. Zhu, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1253–1254.
- [285] A. Lueking, Z. Konthur, H. Eickhoff, K. Bussow, H. Lehrach, D. J. Cahill, *Curr. Genomics* **2001**, *2*, 151–159.
- [286] G. Gutjahr, D. Murphy, A. Lueking, A. Koenig, M. Janitz, J. O’Brien, B. Korn, S. Horn, H. Lehrach, D. J. Cahill, *Genomics* **2005**, *85*, 285–296.
- [287] J. A. Camarero, *Biophys. Rev. Lett.* **2006**, *1*, 1–28.
- [288] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [289] V. Gauvreau, P. Chevallier, K. Vallieres, E. Petitclerc, R. C. Gaudreault, G. Laroche, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1146–1156.

- [290] T. Ichihara, J. K. Akada, S. Kamei, S. Ohshiro, D. Sato, M. Fujimoto, Y. Kuramitsu, K. Nakamura, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2144–2151.
- [291] K. Blank, J. Morfill, H. E. Gaub, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1349–1351.
- [292] C. L. Cheung, J. A. Camarero, B. W. Woods, T. Lin, J. E. Johnson, J. J. De Yoreo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6848–6849.
- [293] J. C. Smith, K.-B. Lee, Q. Wang, M. G. Finn, J. E. Johnson, M. Mrksich, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 883–886.
- [294] C. Staii, D. W. Wood, G. Scoles, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 640–646.
- [295] M. Morpurgo, F. M. Veronese, D. Kachensky, J. M. Harris, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 363–368.
- [296] J. A. Camarero, Y. Kwon, M. A. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14730–14731.
- [297] A. Girish, H. Sun, D. S. Y. Yeo, G. Y. J. Chen, T.-K. Chua, S. Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2447–2451.
- [298] B. Helms, I. van Baal, M. Merks, E. W. Meijer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1790–1794.
- [299] Y. Kwon, M. A. Coleman, J. A. Camarero, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1758–1761; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1726–1729.
- [300] A. J. Chmura, M. S. Orton, C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8480–8484.
- [301] N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139–11144.
- [302] N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3254–3258; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3152–3155.
- [303] Y. Kwon, Z. Han, E. Karatan, M. Mrksich, B. K. Kay, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5713–5720.
- [304] M. Kindermann, N. George, N. Johnsson, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7810–7811.
- [305] I. Sielaff, A. Arnold, G. Godin, S. Tugulu, H.-A. Klok, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 194–202.
- [306] S. K. Kufer, H. Dietz, C. Albrecht, K. Blank, A. Kardinal, M. Rief, H. E. Gaub, *Eur. Biophys. J.* **2005**, *35*, 72–78.
- [307] N. Kamiya, S. Doi, Y. Tanaka, H. Ichinose, M. Goto, *Soc. Biotechnol. Jpn.* **2007**, *104*, 195–199.
- [308] L. Chan, H. F. Cross, J. K. She, G. Cavalli, H. F. Martins, C. Neylon, *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1164.
- [309] S. J. Lee, J. P. Park, T. J. Park, S. Y. Lee, S. Lee, J. K. Park, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5755–5759.
- [310] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790–11791.
- [311] J. Kalia, N. L. Abbott, R. T. Raines, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1064–1069.
- [312] A. Watzke, M. Koehn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroeder, 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.
- [313] A. Watzke, M. Gutierrez-Rodriguez, M. Köhn, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *14*, 6288–6306.
- [314] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24.
- [315] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.
- [316] B. P. Duckworth, J. Xu, T. A. Taton, A. Guo, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 967–974.
- [317] T. Govindaraju, P. Jonkheijm, L. Gogolin, H. Schroeder, C. F. W. Becker, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2008**, 3723–3725.
- [318] B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270–274.
- [319] M. N. Yousaf, M. Mrksich, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4286–4287.
- [320] M. N. Yousaf, B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1127–1130; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1093–1096.
- [321] A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Koehn, H. Schroeder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 302–307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296–301.
- [322] X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52–57.
- [323] B. P. Corgier, A. Laurent, P. Perriat, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4186–4188; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4108–4110.
- [324] K. Zhang, M. R. Diehl, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10136–10137.
- [325] W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2810–2813; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2754–2757.
- [326] A. del Campo, E. Arzt, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 911–945.
- [327] S. R. Coyer, A. J. García, E. Delamarche, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6961–6964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6837–6840.