
Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift behelst de specifieke hechting van eiwitten op zelf-geassembleerde monolagen (SAMs) van β -cyclodextrine (β CD), door middel van multivalente orthogonale linkers. Er is aangetoond dat het mogelijk is om op deze moleculaire printplaten complexe bionanostructuren op te bouwen. In dit assemblageproces is er controle over de stabiliteit, de stoichiometrie en de oriëntatie van de bionanostructuren. Een monovalente supramoleculaire inhibitor kan gebruikt worden om niet-specifieke eiwit-adsorptie op de moleculaire printplaat te verhinderen, waarbij tegelijkertijd de hechting van eiwitten op een specifieke manier via de gebruikte assemblageschema's met behulp van multivalentie wel mogelijk is.

In Hoofdstuk 2 wordt een literatuuroverzicht gegeven over de ontwikkeling van de moleculaire printplaat. Daar wordt onder meer getoond dat de (reversibele) hechting van moleculen op de moleculaire printplaat gebaseerd is op de valentie van de interactie tussen een molecuul met gast-groepen en het oppervlak. De hoge effectieve concentratie van β CD op de moleculaire printplaat is verantwoordelijk voor de hoge stabiliteit van multivalent gehechte moleculen. Dit maakt het mogelijk om 3-dimensionale (3D) structuren op de SAMs op te bouwen, en om van deze 3D-structuren patronen op deze SAMs te maken. Verder wordt de hechting van eiwitten en cellen op oppervlakken in algemene termen besproken. Belangrijke vereisten zijn onder andere selectiviteit, functie, stabiliteit en controle over de oriëntatie. Eiwit-afstotende oppervlakken, bestaande uit poly(ethyleen glycol) (PEG), zoals ontwikkeld door onder andere Whitesides, worden besproken als een methode om niet-specifieke eiwit-adsorptie tegen te gaan. Controle over de oriëntatie kan bijvoorbeeld worden verkregen door een 6-voudige histidine-keten (His_6) te verankeren aan een eiwit door middel van bio-engineering. Deze eiwitten kunnen worden gehecht op oppervlakken welke Ni-N-nitriлотriazijnzuur (Ni-NTA) bevatten. Het is gebleken dat deze methode

in een hoog percentage functioneel gehecht eiwit resulteert, dit in tegenstelling tot methoden waarbij van lithografie gebruik wordt gemaakt.

De stapsgewijze, reversibele hechting van een niet-covalente capsule op een moleculaire printplaat wordt beschreven in Hoofdstuk 3. De capsule bestaat uit twee verschillende calix[4]arenen. De onderste helft van de capsule is een calix[4]areen die aan de onderkant gemodificeerd is met vier adamantyl groepen, en aan de bovenkant met vier guanidinium-groepen. De bovenste helft van de capsule is aan de bovenrand gemodificeerd met vier sulfonaat-groepen, die een interactie kunnen aangaan met de vier guanidinium-groepen op de onderste helft van de capsule. De bindingsconstanten (K_a) van de capsule vorming in oplossing en aan het oppervlak zijn vergelijkbaar. De mogelijkheid om de capsule stapsgewijs te adsorberen op, en te desorberen van het oppervlak is aangetoond met behulp van oppervlakte-plasmonresonantie-spectroscopie (SPR).

De hechting van streptavidine (SAv) op de moleculaire printplaat via orthogonale linker-moleculen en de hetero-functionaliserings van gebonden SAv worden besproken in Hoofdstuk 4. SAv kan op het oppervlak gehecht worden via monovalente en divalente orthogonale linker-moleculen. Het tetravalente linker-eiwit-complex is veel stabiel op het oppervlak dan het divalente linker-eiwit-complex, zoals is aangetoond met behulp van competitie-experimenten. De divalente linker maakt de stapsgewijze assemblage van SAv op het oppervlak mogelijk, hetgeen is aangetoond met behulp van SPR en atomaire kracht-microscopie (AFM). De mogelijkheid om de vrije biotine-bindingsplaatsen in het stapsgewijs gehechte SAv te gebruiken, is aangetoond met behulp van experimenten waarin de divalente linker in patronen op het oppervlak is aangebracht door middel van microcontact-druk (μ CP). Na het stempelen van de divalente linker, is SAv op dit oppervlak vastgezet, waarna biotine-4-fluoresceïne is gehecht op de vrije biotine-bindingsplaatsen. Cytochroom *c* (cyt *c*) is het eerste functionele eiwit waarmee het stapsgewijs gehechte SAv is gefunctionaliseerd. Er is aangetoond dat de experimenteel gevonden bezettingsgraad van cyt *c* vergelijkbaar is met de theoretische bezettingsgraad.

In Hoofdstuk 5 is de hechting van antilichamen op moleculaire printplaten via meerdere orthogonale bindingsmotieven beschreven. Er zijn experimenten beschreven waarin een bionanostructuur bestaande uit SAv, gebiotinyleerd proteïne A en een fluorescent gemerkt Fc-fragment van een menselijk immunoglobine, in patronen op

het oppervlak is opgebouwd. Deze experimenten laten zien dat deze bionanostructuur met een hoge selectiviteit op het oppervlak kan worden opgebouwd. Antilichaamstructuren kunnen via twee verschillende assemblage-routes op de moleculaire printplaat worden opgebouwd: via een gebiotinyleerd immunoglobine en via een Fc-receptor-eiwit. Zowel AFM als SPR hebben de opbouw van de bionanostructuren aangetoond. Moleculaire printplaten kunnen ook als basis worden gebruikt voor specifieke cel-hechting. Uit fluorescentie-experimenten is gebleken dat CD3⁺-lymfocyten op een specifieke manier op de printplaat kunnen worden vastgezet. De cel-hechting blijkt bij benadering lineair met de concentratie. Een microchip bestaande uit een groot kanaal, dat gesplitst wordt in vier kleinere, parallelle kanalen, is gebruikt voor de hechting van eiwitten in microkanalen. In deze chip kan op stapsgewijze manier een β CD-monolaag worden gemaakt. De vier kleinere kanalen kunnen individueel worden aangestuurd door middel van de stapsgewijze opbouw van de bionanostructuren en de hoge selectiviteit van dit groeiproces.

De ontwikkeling van een supramoleculaire methode voor het tegengaan van niet-specifieke eiwit-adsorptie op oppervlakken wordt geïntroduceerd in Hoofdstuk 6. Voor dit doel is een adamantyl-gemodificeerd hexa(ethyleen glycol)-gastmolecuul (AdHEG) gesynthetiseerd. De hexa(ethyleen glycol)-keten verhindert niet-specifieke eiwit-adsorptie, terwijl de adamantylgroep zorgt voor specifieke binding met het oppervlak. Er wordt aangetoond dat AdHEG effectief is in het voorkomen van niet-specifieke eiwitadsorptie op de β CD-oppervlakken van SA_v, het met een histidineketen gefunctionaliseerde maltose bindings eiwit (His₆-MBP), en met runder-serumalbumine (BSA). De bezettingsgraad van AdHEG om niet-specifieke eiwit-adsorptie te verhinderen is ongeveer een orde van grootte lager dan voor de standaard eiwit-afstotende PEG-oppervlakken, zoals ontwikkeld door Whitesides. Verder is ook aangetoond dat AdHEG de specifieke hechting van SA_v en His₆-MBP door middel van de divalente adamantyl-biotine-linker en een adamantyl-gemodificeerde Ni-NTA linker niet in de weg staat.

De hechting van eiwitten met een His₆-keten op β CD-SAMs wordt beschreven in Hoofdstuk 7. Titratie-experimenten van His₆-MBP op het oppervlak zijn uitgevoerd en gemodelleerd. Uit deze studie blijkt dat de binding van Ad-NiNTA aan His₆-MBP in oplossing grotendeels monovalent is. Op het oppervlak is de meerderheid van His₆-MBP echter op trivalente wijze gebonden aan Ad-NiNTA. Dit verschil wordt

veroorzaakt door de hoge effectieve concentratie van β CD aan het oppervlak, hetgeen zorgt voor een grote stabiliteit van multivalente complexen op β CD-monolagen. De toename van de vorming van de trivalente complexen op het oppervlak is een factor 30 hoger dan voor de divalente complexen. Het maken van patronen op een oppervlak is aangetoond met behulp van $(\text{His}_6)_4$ -DsRed-FT. Dit autofluorescente eiwit kon met een hoge graad van specificiteit in patronen op een oppervlak worden gebracht. Wanneer de patronen werden gemaakt in afwezigheid van Ad-NiNTA, dan konden de patronen worden weggespoeld met water. Daarentegen waren patronen bestaande uit $(\text{His}_6)_4$ -DsRed-FT in aanwezigheid van Ad-NiNTA wel stabiel. Controle over de orientatie van eiwitten met een His_6 -keten op de moleculaire printplaat kon worden aangetoond door middel van de hechting van het α - $(\text{His}_6)_{14}$ -20S proteasoom complex. SPR-experimenten hebben aangetoond dat de niet-specifieke interactie van het α - $(\text{His}_6)_{14}$ -20S-proteasoom met het β CD-oppervlak met ongeveer 60% kon worden gereduceerd.

Dit proefschrift beschrijft het gebruik van moleculaire printplaten voor de hechting van eiwitten en cellen. Het is mogelijk om complexe bionanostructuren op te bouwen, gebruik makend van meerdere orthogonale interacties, hetgeen resulteert in controle over de thermodynamica, oriëntatie en functionaliteit. Door middel van supramoleculaire chemie en multivalentie is een zeer effectieve methode ontwikkeld om niet-specifieke eiwit-adsorptie te voorkomen, terwijl specifieke hechting door middel van multivalente interacties nog steeds mogelijk blijft. Deze resultaten vormen een aanzet tot de ontwikkeling van toepassingen voor de hechting van functionele eiwitten, zoals antilichamen, en cellen, en de specifieke hechting van eiwitten in microkanalen op β CD-monolagen. De resultaten beschreven in dit proefschrift kunnen worden toegepast in de ontwikkeling van optische en elektronische biosensoren, die onder andere medische en milieu-technische toepassingen kunnen hebben. Een andere mogelijkheid is de ontwikkeling van complexere DNA-assays gebaseerd op de assemblageroutes beschreven in dit proefschrift.