

Kombinatorische Chemie

DNA-Mikroarrays als Decodierungswerkzeuge in der kombinatorischen Chemie und der chemischen Biologie**

Marina Lovrinovic und Christof M. Niemeyer*

Stichwörter:

DNA · Immobilisierung · Kombinatorische Chemie · Mikroarrays · Proteine

Lateral mikrostrukturierte Arrays aus DNA^[1] oder Proteinsonden^[2-4] haben sich in den letzten Jahren als äußerst nützliche Werkzeuge für Hochdurchsatzversuche in der biomedizinischen Forschung erwiesen. Solche Mikroarrays haben den Vorteil der räumlichen Adressierbarkeit der Sonden und erfordern nur geringe Probenmengen. Die Entwicklung von Protein-Mikroarrays ist nach wie vor schwierig, da wegen der intrinsischen Instabilität vieler Proteine häufig ihre Funktion bei der automatisierten Immobilisierung an chemisch aktivierte Oberflächen beeinträchtigt wird. Die Anwendung von DNA-Mikroarrays ist dagegen fast Routine, weil sie chemisch stabil und häufig bereits seriell von akademischen und kommerziellen Anbietern erhältlich sind. Demzufolge ist die Verwendung der DNA-Mikroarrays für die Untersuchung der Genexpression durch die Quantifizierung der mRNA-Menge unter unterschiedlichen Umgebungsbedin-



Abbildung 1. DNA-vermittelte Immobilisierung von DNA-Protein-Konjugaten mithilfe oberflächengebundener Fängeroligomere auf einem DNA-Mikroarray.

gungen mittlerweile ein gut etablierter Ansatz in Grundlagen- und Industrieforschung.^[5] Zusätzlich zu diesen Hauptanwendungsbereichen der DNA-Arrays in der Genomforschung zeichnen sich zurzeit weitere Einsatzgebiete ab, in denen solche Mikroarrays als Werkzeuge zur Decodierung kombinatorischer Bibliotheken in Chemie und chemischer Biologie verwendet werden.

DNA-Arrays können z.B. als programmierte Matrix für die ortsspezifische Immobilisierung DNA-markierter Proteine und Wirkstoffe eingesetzt werden (Abbildung 1). Diese Vorgehensweise, die als DNA-vermittelte Immobilisierung (DDI, DNA-directed immobilization) bezeichnet wird, ist eine chemisch milde Methode für die hochgradig parallele, ortsspezifische und reversible Anbindung von Proteinbibliotheken an Festphasen.^[6] Als besonderer Vorteil gilt die Erhaltung der Proteinaktivität, da diese über eine kurze Doppelstrang-DNA-Brücke an die Oberfläche binden und nicht über mehrere kovalente und/oder nichtkovale Kontakte fixiert sind, die ihre konformative Freiheit einschränken und zur (partiellen) Denaturierung der Tertiärstruktur führen können.^[6b] Die Vorteile einer Herstellung von Protein-Mikroarrays durch die DDI-Methode wurden für Antikör-

per,^[6c,f,g] Rezeptoren^[6d] und Enzyme^[6b,j] demonstriert.

Winssinger et al. verwendeten das Prinzip der Nucleinsäuren-vermittelten Immobilisierung für die Durchmusterung von Wirkstoffbibliotheken nach Molekülen, die an die Zielproteine binden.^[7-10] Die Technik basiert auf Peptidnucleinsäure(PNA)-codierten Wirkstoffsonden, die über kombinatorische Festphasensynthese erhältlich sind (Abbildung 2). Der Wirkstoffsreich des Sondenmoleküls ist so aufgebaut, dass er mechanismusabhängig spezifisch an die Proteine bindet und so zwischen aktiven und inaktiven Proteinen unterscheidet. Der PNA-Anteil der Sonde fungiert als Code für die präparative Herkunft des Wirkstoffanteils und ermöglicht so die Entschlüsselung der Sonden durch Hybridisierung auf dem Oligonucleotid-Mikroarray. Durch die Array-basierte Entschlüsselung kann eine Vielzahl von Sonden simultan in miniaturisierter Form untersucht werden (bis zu 400 000 Sonden in weniger als 300 µL Reaktionslösung). Die Validierung dieser Methode wurde zunächst anhand spezifischer Inhibitorschalen durchgeführt, die auf der Peptidsubstrat-Spezifität bekannter Proteasen wie Cathepsine^[7] und Caspasen^[8] beruhen.

[*] Dipl.-Chem. M. Lovrinovic,

Prof. Dr. C. M. Niemeyer

Universität Dortmund

Fachbereich Chemie

Biologisch-Chemische

Mikrostrukturtechnik

Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund

(Deutschland)

Fax: (+49) 231-755-7082

E-mail:

christof.niemeyer@uni-dortmund.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Universität Dortmund für die finanzielle Förderung unserer Arbeiten im Rahmen des Forschungsprogramms „Molekulare Grundlagen der Biowissenschaften“.

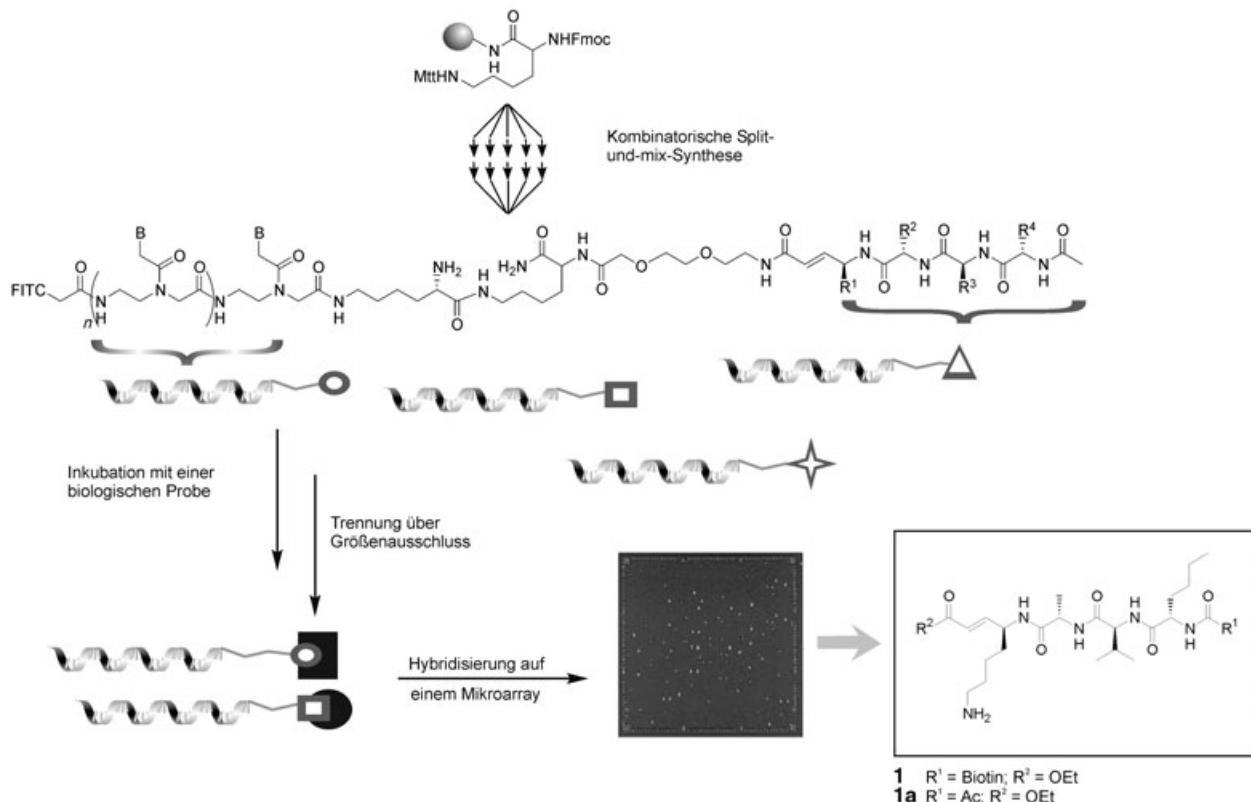


Abbildung 2. Synthese und Decodierung einer PNA-codierten Bibliothek. Übernommen aus Lit. [10]. Die an alle Substanzen der Bibliothek gebundene Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Einheit ermöglicht es, die Anbindung an das räumlich codierende DNA-Array durch Fluoreszenzmessungen zu detektieren. Mtt = 4-Methyltrityl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

Vor kurzem führte diese Methode zur Entdeckung neuer proteolytischer Aktivitäten im Extrakt der Hausstaubmilbe.^[10] Hausstaubmilben verursachen häufig Allergien und tragen damit zum Anstieg der Zahl allergischer Krankheiten wie des Bronchialasthmas bei. Einige dieser Allergene zeigen proteaseenzymatische Aktivität, die, wie schon länger bekannt, allergische Reaktion hervorrufen kann. Zur Aufklärung der zellulären Mechanismen, in die solche Allergene bei der Entstehung von Allergien eingreifen, muss man die proteolytische Aktivität der beteiligten Proteasen erfassen.

Hierfür wurde durch kombinatorische Split-und-mix-Synthese eine PNA-codierte Tetrapeptidinhibitor-Bibliothek mit 4000 Substanzen hergestellt, deren Zielmoleküle Cysteinproteasen sind (Abbildung 2). Diese Bibliothek wurde zunächst mit dem Lysat der Hausstaubmilbe inkubiert und die nicht gebundenen Sonden anschließend über Filtration durch einen 30-kDa-Cutoff-Filter abgetrennt. Die zurückgehaltenen

Proben mit den proteingebundenen Sonden wurden auf einem Oligonucleotid-Mikroarray hybridisiert, das die Fängeroligonukleotide für alle Substanzen der PNA-codierten Inhibitorbibliothek enthielt. Durch Fluoreszenz-Imaging konnten die Tetrapeptide identifiziert werden, die tatsächlich an die Zielproteasen gebunden hatten. Die Ergebnisse zeigten, dass Inhibitoren mit Lysin oder Norleucin an Position P1 und Alanin an Position P2 aktiv waren (Abbildung 2). Die P3- und P4-Positionen des Inhibitors schienen weniger wichtig für die Bindung; Inhibitoren mit Histidin, Phenylalanin oder Prolin an Position P3 wiesen überhaupt keine Aktivität auf. Die Sonde mit der höchsten Intensität auf dem Mikroarray hatte die Inhibitorsequenz Nle-Val-Ala-Lys (P1-P4). Diese Sonde (Verbindung 1 in Abbildung 2) wurde anschließend mit einem biotinylierten Linker neu synthetisiert, um die wechselwirkenden Proteine zu isolieren und zu identifizieren. Nach der Inkubation von 1 mit dem Lysat der Hausstaubmilbe wurden die Sonden

und die an sie gekoppelten Proteine an Streptavidin gebunden und die Proteine massenspektrometrisch sequenziert.

Zwei Hauptproteine, Derp1 und Derp10, wurden identifiziert: Derp1 ist ein 25-kDa-Protein und homolog zur Papainfamilie der Cysteinproteasen; Derp10 ist ein zu Tropomyosin homologes 33-kDa-Protein. Derp1 wurde aus den Exkrementen der Hausstaubmilbe mittels Immunaffinitäts-Chromatographie an immobilisierten monoklonalen Antikörpern isoliert und seine Substratspezifität mit der Tetrapeptidsubstrat-Bibliothek im „positional scanning format“ getestet. Das Ergebnis bestätigte, dass der bestimmende Faktor für die Hauptsubstratspezifität von Derp1 das Vorliegen von Alanin in der Position P2 des Tetrapeptids ist. Darüber hinaus wurde für Derp1 eine geringe Bevorzugung basischer Aminosäuren an P1 und P3 sowie aliphatischer Aminosäuren wie Isoleucin, Prolin, Valin, Leucin und Norleucin an P4 beobachtet. Schließlich wurde die phänotypische Relevanz der Der-p-1-Funktion für die Entwicklung

von Allergien dadurch nachgewiesen, dass der Tetrapeptidinhibitor **1a** in der Lage war, die Abspaltung von CD25 (α -Kette des Interleukin-2-Zelloberflächenrezeptors) von T-Zellen zu inhibieren.^[9]

In einer konzeptionell ähnlichen Studie haben Melkko et al. DNA-co-dierte selbstorganisierte chemische (ESAC) Bibliotheken für eine einfache Identifizierung von Wirkstoffen eingesetzt, die an makromolekulare Zielmoleküle binden.^[11] Die Bibliotheken der organischen Moleküle, verknüpft mit einzelnen DNA-Oligomeren, wurden durch DNA-Stränge mit komplementären Sequenzen positioniert und lieferten so die Codes der einzelnen organischen Gruppen. Nach der Inkubation der ESAC-Bibliotheken mit Festphasen-immobilisierten zu untersuchenden Proteinen und dem Entfernen des ungebundenen Materials wurden die codierenden Sequenzen der ausgesuchten Verbindungen mit einem DNA-Mikroarray analysiert. Die Wiederholung des Selektionszyklus führte zur Affinitätsanreicherung von Substanzen, die an humaines Serum-Albumin und Rinder-Carboanhydrase im nanomolaren Bereich binden.^[11] Diese Beispiele belegen eindrucksvoll das Potenzial von DNA-Mikroarrays bei der Decodierung von Nucleinsäure-codierten Wirkstoffbibliotheken.

Vor kurzem wurden DNA-Mikroarrays von Hu et al. zum Hochdurchsatz-Screening von Bibliotheken exprimierter Enzyme eingesetzt (Abbildung 3).^[12]

Die als „Expressions-Display“ bezeichnete Strategie beruht auf dem „Ribosom-Display“, das eine In-vitro-Proteinexpression in zellfreien Translationsreaktionen ermöglicht und dabei zur Markierung der Polypeptide mit deren eigenen codierenden mRNAs führt.^[13] Die Proteine wurden ausgehend von einer cDNA-Bibliothek mit 384 unterschiedlichen offenen Leserahmen (ORFs, open reading frames) der Hefe, von denen vier ORFs bekannte Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) codierten, durch In-vitro-Transkription und -Translation exprimiert. (Schritte 1 und 2 in Abbildung 3). Die resultierende Bibliothek von Ribosomenkomplexen wurde mit der an Streptavidin-Magnetpartikeln immobilisierten,aktivitätsabhängigen Sonde **2** inkubiert, die spezifisch und irreversibel an PTPs bindet (Schritt 3). Anschließend wurden die mRNAs eluiert und revers transkribiert (Schritte 4 und 5), um die entsprechende fluoreszenzmarkierte cDNA zu generieren. Die so entstandene cDNA-Bibliothek wurde schließlich zur parallelen Identifizierung der funktionalen PTPs auf einem decodierenden DNA-Mikroarray (mit 384 cDNAs) hybridisiert (Schritt 6). Aktive PTPs wurden über die Lage der Fluoreszenzsignale auf dem Array identifiziert (Abbildung 3). Die Mikroarrayanalyse ergab, dass die vier PTPs in der Bibliothek, die auch ORFs für andere Enzymklassen (Proteasen, Kinasen, Oxidoreduktasen) und nichtenzymatische Proteine enthielt, selektiv detektiert wurden – somit konnte

in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass durch die Kombination von aktivitätsabhängigen Sonden mit arraybasierter Hochdurchsatz-Identifizierung prinzipiell Tausende von Proteinen in einer einzigen Reaktion durchgemustert werden können, ohne dass paralleles Klopfen, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der einzelnen Proteine erforderlich sind.^[12]

DNA-Mikroarrays wurden kürzlich auch in der präparativen organischen Chemie als Selektionswerkzeug zum Auffinden einer neuen chemischen Reaktion eingesetzt, nämlich einer Pd-katalysierten C-C-Verknüpfungsreaktion, die zur Bildung eines Enons aus einem Alken und einem Alkin führte (Abbildung 4).^[14] Zu diesem Zweck hatte die Arbeitsgruppe von Liu, deren Arbeiten sich mit der Entwicklung der DNA-Templatsynthese befassen,^[15] zwei Bibliotheken von DNA-verknüpften Substraten synthetisiert, von denen jede zwölf unterschiedliche, potenziell reaktive funktionelle Gruppen enthielt, die entweder mit dem 5'- (Bibliothek A) oder dem 3'-Ende (Bibliothek B) der Oligonucleotide verknüpft waren. Die Oligomere der Gruppe A enthielten einen „codierenden Bereich“ zur eindeutigen Identifizierung der Substrate und einen von zwölf unterschiedlichen „Bindungsbereichen“ für die Substrate der Bibliothek B. Die Oligomere der Gruppe B enthielten ebenfalls einen „codierenden Bereich“ für die Substratcodierung sowie eine Sequenz, die zu einem der zwölf Bindungsbereiche der Grup-

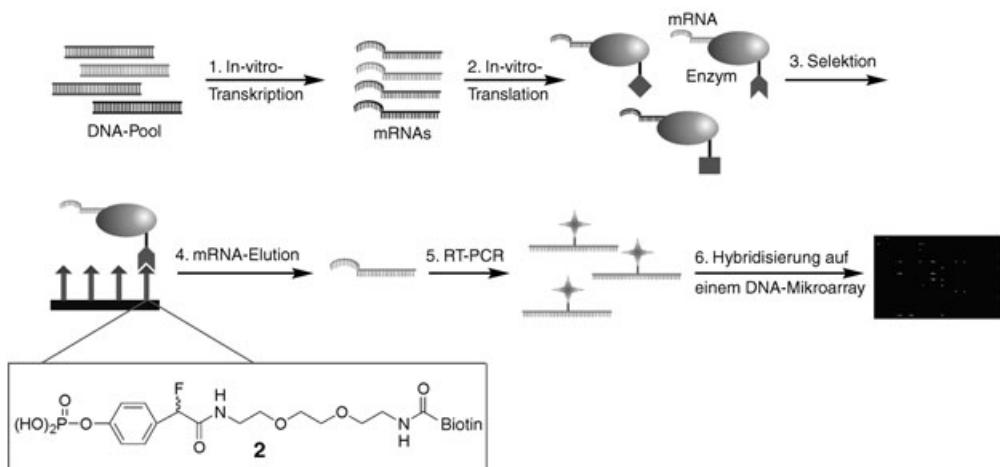


Abbildung 3. Expressions-Display einer Enzyrbibliothek (RT = Reverse Transkription). Ebenfalls gezeigt ist die Struktur der für Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) spezifischen aktivitätsabhängigen Sonde 2. Übernommen aus Lit. [12].

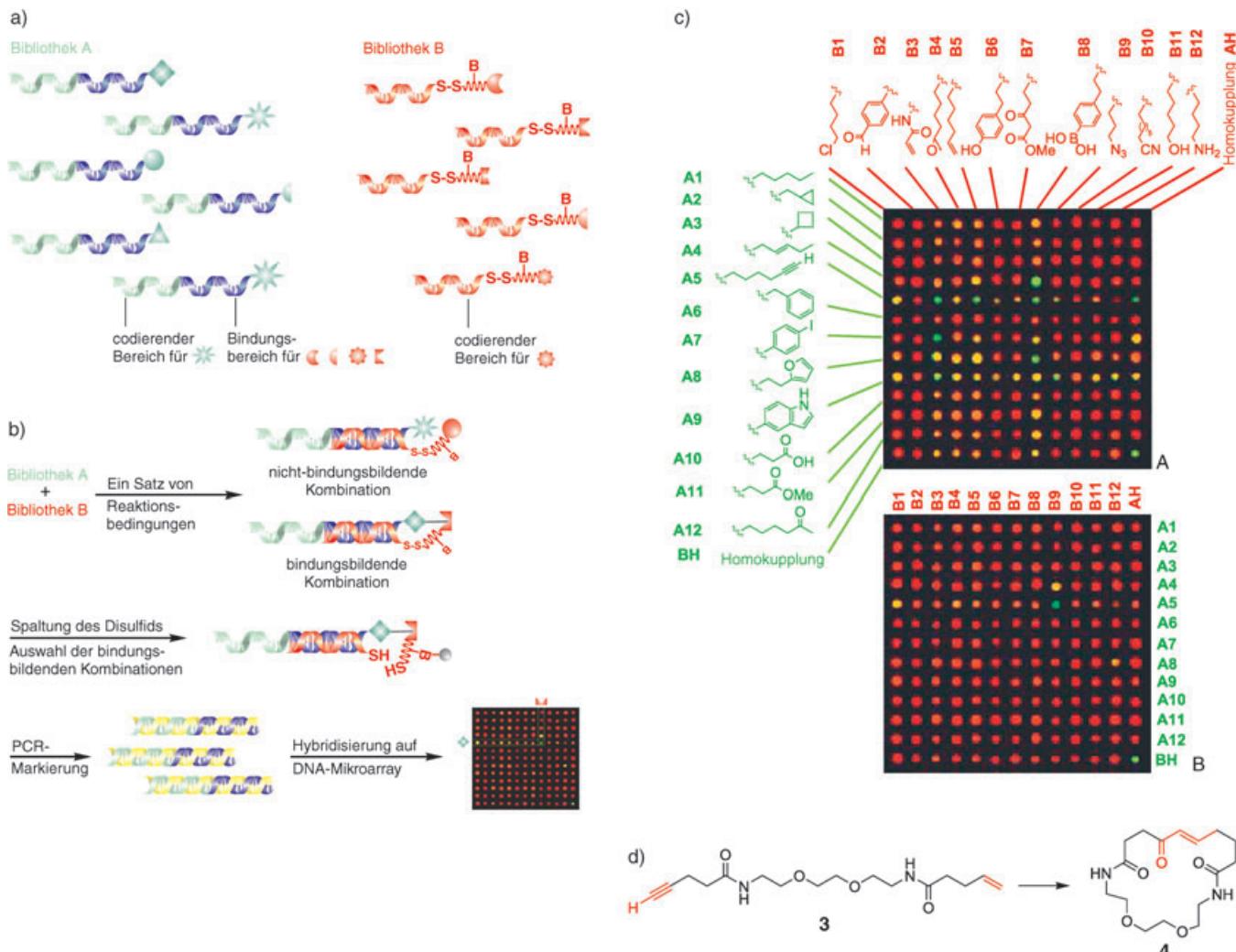


Abbildung 4. Suche nach neuartigen chemischen Reaktionen mithilfe von DNA-Templatreaktionen. Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [14].

pe-A-Oligomere komplementär war (Abbildung 4a).

Vereinigt man die Bibliotheken A und B in einer wässrigen Lösung in nanomolaren Konzentrationen, werden die Substanzen durch die Watson-Crick-Basenpaarung zu 12×12 separaten Substanzpaaren angeordnet, deren effektive Konzentration im millimolaren Bereich liegt. Dagegen liegen Substanzen, die mit nichtkomplementären Oligomeren verknüpft sind, in nanomolaren Konzentrationen vor und reagieren deshalb nicht in signifikanter Ausbeute miteinander. Um die Trennung der reaktiven Paare zu ermöglichen, wurde jedes Substrat der Bibliothek B über einen Linker, der eine Biotingruppe und eine spaltbare Disulfidbindung enthielt, kovalent mit seinem entsprechenden Oligomer ver-

knüpft (Abbildung 4b). Nach der Inkubation unter verschiedenen ausgewählten Reaktionsbedingungen wurden die Disulfidbindungen gespalten, sodass der Biotinrest nur dann kovalent an die Substanzen der Gruppe A gebunden blieb, wenn eine Bindungsbildung zwischen den Substanzen aus den Bibliotheken A und B stattgefunden hatte. Zur Trennung der biotinylierten von den nichtbiotinylierten Komponenten wurde die Avidinaffinität der Produkte genutzt. Anschließend wurden die reaktiven Substratpaare über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Wegen der besonders hohen Empfindlichkeit der PCR-Amplifikation konnte die gesamte Reaktionsfindung mit Substanzmengen im Femtomolbereich durchgeführt werden.

Da beide Gruppen jeweils zwölf Substrate enthielten, wurden 144 unterschiedliche DNA-verknüpfte Substrate der Bibliothek A hergestellt, die für alle kreuzreaktiven Kombinationen codierten. Zusätzlich wurden auch DNA-verknüpfte Substrate synthetisiert, die für die Homokupplung jedes der 24 Substrate codierten, was die Gesamtzahl der einzelnen Substratkombinationen auf 168 erhöhte. Somit erfordert diese Herangehensweise zwar die Herstellung einer großen Zahl DNA-verknüpfter Substrate – da diese aber typischerweise im Nanomolmaßstab synthetisiert werden, ist genügend Material für mehr als 1000 Reaktionsfindungsprozesse vorhanden.

Für eine halbquantitative Analyse der Effizienz der Bindungsbildung wurde zunächst die Mischung der Biblio-

theken A und B zweimal mittels PCR amplifiziert. Vor der Bindungsbildung und der Selektion wurde die PCR mit Cy5-markierten Primern durchgeführt, und nach der Selektion wurde die Mischung mit Cy3-markierten Primern amplifiziert. Gleiche Mengen der zwei PCR-Produkte wurden gemischt und auf einem DNA-Array immobilisiert, das alle möglichen Sequenzkombinationen enthielt. Das Verhältnis der Cy3-(grün) zur Cy5-Fluoreszenz (rot) wurde für alle Positionen auf dem Array ermittelt, und die Signale mit einem Grün/Rot-Fluoreszenzverhältnis von größer als 1.5:1 wurden als positiv betrachtet. Ein vorab quantifizierter interner Standard (rechte untere Ecke auf dem Array in Abbildung 4c) wurde als Positivkontrolle und als Referenz zum Vergleich verschiedener Arrays genutzt.

Zur Anfangsvalidierung der Methode wurde die bekannte Reaktion eines Alkins (A5) mit einem Azid (B9) in Gegenwart von Cu^I eingesetzt. Das Auftreten eines einzelnen grünen Signals (Grün/Rot-Verhältnis 8.5) bestätigte die Eignung dieser Methode zur Reaktionsfindung (unteres Array in Abbildung 4c). Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch die Selektion der Bindungsbildung nach Behandlung der Bibliotheken mit EDC/NHS (EDC=1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, NHS=N-Hydroxysuccinimid), die zum Auftreten eines einzelnen positiven Signals führte, das die Reaktion zwischen dem Amin (B12) und der Carbonsäure (A10) anzeigen (Grün/Rot-Verhältnis 15.6:1). Nach der erfolgreichen Wiederfindung von bekannten bindungsbildenden Reaktionen wurde von den Autoren die Reaktivität der Bibliotheken in Gegenwart von Pd^{II} untersucht. Die erste Reaktion, durchgeführt über eine Stunde bei 37°C, ergab fünf stark positive Signale (A7+B3, A5+B3, A4+B8, A5+B5 und A5-Homokupplung) und fünf schwächer positive Signale (A9+B3, A8+B3, A8+B8, A5+B8 und A5+B9, oberes Array in Abbildung 4c). Diese zehn wahrscheinlich bindungsbildenden Reaktionen wurden in gesonderten DNA-Templatreaktionen untersucht, und die gelelektrophoretische Auswertung deutete darauf hin, dass alle fünf stark positiven und drei der schwach positiven Signale tatsächlich von den authenti-

schen DNA-Templatreaktionen herührten. Für die zwei schwach positiven Signale A9+B3 und A5+B9 wurde nur wenig oder keine Produktbildung beobachtet.

Eine Wiederholung des Selektions-experiments unter stringenteren Bedingungen (20 min bei 25°C) reduzierte die Zahl der positiven Signale – dies ist ein Hinweis darauf, dass die Pd^{II}-vermittelte C-C-Verknüpfung zwischen dem terminalen Alkin (A5) und dem terminalen Alken (B5) unter Bildung des Enonproduktes tatsächlich effizient verläuft. Für eine detaillierte Untersuchung dieser Reaktion unter Nicht-DNA-Templat-Bedingungen wurde das Substrat 3 synthetisiert und seine intramolekulare Cyclisierung zum Enon 4 in Gegenwart von Pd^{II} untersucht. Diese Makrocyclisierung verlief in Milligramm-Mengen mit 5% Na₂PdCl₄, einem Moläquivalent CuCl₂ und verschiedenen Lösungsmitteln in Ausbeuten von mehr als 90%. Die Entdeckung dieser Alkin-Alken-Kupplungsreaktion belegt den Nutzen der Untersuchung einer großen Zahl von Substratkombinationen bei der Suche nach unerwarteten Reaktionen.

Die in diesem Highlight vorgestellten Beispiele demonstrieren die Vielseitigkeit von DNA-Mikroarrays als Werkzeugen zur Decodierung komplexer Bibliotheken DNA-gekuppelter Wirkstoffmoleküle^[16] und anderer biomolekularer Verbindungen. Diese Anwendungen sind allerdings nur dank der außerordentlichen Stabilität der Nucleinsäuren, ihrer leichten Zugänglichkeit durch die Festphasensynthese sowie dem stetigen Fortschritt der DNA-Array-Technik in den letzten 15 Jahren möglich geworden. Zwar sind DNA-Chips inzwischen zu Routinewerkzeugen geworden, jedoch müssen noch viele Probleme gelöst werden – so ist z.B. eine genaue Vorhersagbarkeit und Quantifizierung der Hybridisierungseffizienz einzelner Sonden wünschenswert. Eine noch schwierigere Aufgabe aber ist die Übertragung von Anwendungen wie den hier beschriebenen auf Protein-Mikroarrays. Solche Protein-Mikroarrays dürften einen noch tieferen Einblick in biologische Systeme auf der Proteom-Ebene geben. Allerdings wird diese faszinierende Aufgabe wegen der außerordentlich komplexen und oft empfindlichen Architektur die-

ser „Universalwerkzeuge der Natur“ die Forschung im Bereich der chemischen Biologie sicher noch einige Zeit beschäftigen.

Online veröffentlicht am 28. April 2005

- [1] Für Übersichtsartikel zur DNA-Mikroarray-Technik siehe: a) U. R. Müller, D. V. Nicolau, *Microarray Technology and Its Applications*, Springer, Berlin, 2005; b) R. L. Stears, T. Martinsky, M. Schena, *Nat. Med.* **2003**, 9, 140–145; c) M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1276–1289; d) C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3039–3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2865–2869; e) E. M. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 5–9.
- [2] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 160–166.
- [3] D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 510–517; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 494–500.
- [4] D. S. Yeo, R. C. Panicker, L. P. Tan, S. Q. Yao, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, 7, 213–221.
- [5] Die DNA-Mikroarray-Technik ist ein gut etabliertes Werkzeug in der chemischen Genomforschung für die Transkriptionsanalyse des Gesamtgenoms zur Identifizierung und Validierung von Zielstrukturen für Wirkstoffmoleküle (z.B. Kinase-Inhibitoren). Für Beispiele siehe: a) C. Kung, K. M. Shokat, *ChemBioChem* **2005**, 6, 523–526; b) D. W. Provance, Jr., C. R. Gourley, C. M. Silian, L. C. Cameron, K. M. Shokat, J. R. Goldenring, K. Shah, P. G. Gillespie, J. A. Mercer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 1868–1873; c) K. M. Specht, K. M. Shokat, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 155–159; d) A. S. Carroll, A. C. Bishop, J. L. DeRisi, K. M. Shokat, E. K. O’Shea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 12578–12583.
- [6] a) C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5530–5539; b) C. M. Niemeyer, L. Boldt, B. Ceyhan, D. Blohm, *Anal. Biochem.* **1999**, 268, 54–63; c) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3685–3688; d) M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. Goody, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822–823; e) U. Feldkamp, R. Wacker, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 367–372; f) R. Wacker, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2004**, 5, 453–459; g) R. Wacker, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**,

- 330, 281–287; h) F. Kukolka, C. M. Niemeyer, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2203–2206; i) L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2659–2662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2603–2606.
- [7] 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.
- [8] N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139–11144.
- [9] N. Winssinger, R. Damoiseaux, D. C. Tully, B. H. Geierstanger, K. Burdick, J. L. Harris, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351–1360.
- [10] J. Harris, D. E. Mason, J. Li, K. W. Burdick, B. J. Backes, T. Chen, A. Shipway, G. Van Heeke, L. Gough, A. Ghemmehgami, F. Shakib, F. Debaene, N. Winssinger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1361–1372.
- [11] S. Melkko, J. Scheuermann, C. E. Dumelin, D. Neri, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 568–574.
- [12] Y. Hu, G. Y. Chen, S. Q. Yao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1072–1077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1048–1053.
- [13] Eine verwandte Technik beruht auf der In-vitro-Translation der mRNA, die an ihrem 3'-Ende mit der Puromycingruppe derivatisiert ist. Das Peptidyl-Acceptor-Antibiotikum Puromycin kuppelt die mRNA kovalent an die am Ribosompartikel entstandene Polypeptidkette, was zur spezifischen Konjugation der informativen (mRNA) mit der funktionalen Einheit (Polypeptid) führt. Das gebildete kovalente Nucleinsäure-Protein-Konjugat kann möglicherweise für die Herstellung der Protein-Mikroarrays verwendet werden. P. A. Lohse, M. C. Wright, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2001**, *4*, 198–204; M. Kurz, K. Gu, A. Al-Gawari, P. A. Lohse, *Chem-BioChem* **2001**, *2*, 666–672.
- [14] M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, *431*, 545–549.
- [15] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870.
- [16] J. J. Diaz-Mochon, L. Bialy, L. Keinicke, M. Bradley, *Chem. Commun.* **2005**, 1384–1386.

The screenshot shows the Wiley InterScience homepage with a blue header. Below it, a large green button with the text "Manage your access easily with ‘MY PROFILE’". To its right, a smaller text box says "Simply register. Registration is fast and free to all internet users." Below this, two columns of icons represent "Easy Access" and "Enhanced Tools". At the bottom, the website address "www.interscience.wiley.com" is displayed.

WILEY
InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

Access some of the finest full text journals, reference works, books, and databases from around the globe. It's just what you need to make some important discoveries of your own.

ABOUT US
VIEW DEMO
CONTACT US
HELP

Manage your saved titles, articles, series and alerts in My Profile.
USER NAME
PASSWORD
 Remember Me
 Go
Register Now | Athens |
Forgot My Password

Manage your access easily with “MY PROFILE”

Simply register. Registration is fast and free to all internet users.

Easy Access

- Save Titles, Articles & Queries for quick access
- Set up roaming access to access content outside of your institutions network
- Get free online sample copies
- Get free online trial subscriptions
- View a complete list of your subscriptions and accessible products

Enhanced Tools

- Receive E-Mail Alerts when new content is available
- Purchase Article Select Tokens online
- Purchase individual articles online with Pay-Per-View

www.interscience.wiley.com

17340502 vo