

Bioanalytik

DOI: 10.1002/ange.200502908

Direkter Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Massenspektrometrie an Protein-DNA-Mikroarrays**

Christian F. W. Becker, Ron Wacker, Werner Bouschen,
Ralf Seidel, Branko Kolaric, Pascal Lang,
Hendrik Schroeder, Oliver Müller,
Christof M. Niemeyer, Bernhard Spengler,
Roger S. Goody und Martin Engelhard**

Die Mikroarray-Technik ermöglicht die gleichzeitige Analyse einer großen Zahl von Parametern durch Verwendung verschiedenster Auslesesysteme, die auf Fluoreszenz, Chemilumineszenz, elektrochemische Eigenschaften, Radioaktivität oder Massenspektrometrie ansprechen.^[1] Unter diesen Auslesemethoden zeichnet sich die Massenspektrometrie dadurch aus, dass sie Informationen über einen intrinsischen Parameter des Analyten, nämlich das Molekulargewicht, liefert. Solch eine Auslesemethode ist besonders nützlich für die Bestimmung von Proteinexpressionsraten, z.B. mithilfe

[*] Dr. C. F. W. Becker, Dr. R. Seidel, B. Kolaric, P. Lang,
Priv.-Doz. Dr. O. Müller, Prof. Dr. R. S. Goody, Prof. Dr. M. Engelhard
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2399
E-mail: christian.becker@mpi-dortmund.mpg.de
martin.engelhard@mpi-dortmund.mpg.de

Dr. R. Wacker, Dr. H. Schroeder
Chimera Biotec GmbH
Emil-Figge-Straße 76A, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. W. Bouschen, Prof. Dr. B. Spengler
Justus-Liebig Universität Gießen
Anorganische und Analytische Chemie
Schubertstraße 60, 35392 Gießen (Deutschland)
Dr. H. Schroeder, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Wir danken W. Hecker für die Hilfe bei der Oligonucleotidsynthese.
Für finanzielle Unterstützung danken wir der MPG, der DFG, dem
BMBF und dem VCI.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor
angefordert werden.

von SELDI (oberflächenverstärkte Laser-Desorptionsionisation), von Enzymaktivitäten durch Peptid-basierte Ansätze wie SAMDI (selbstorganisierte Monolagen für MALDI) und für die direkte Bestimmung der Kreuzhybridisierung auf DNA-Chips.^[2-7] Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit, mit Massenspektrometrie Protein-Protein-Wechselwirkungen eindeutig zu identifizieren, indem das exakte Molekulargewicht eines Bindungspartners bestimmt wird.^[7]

Um ein Mikroarray-basiertes Testsystem zu entwickeln, das die reversible Immobilisierung von Proteinen mit dem Auslesen durch Massenspektrometrie verbindet, haben wir Protein-DNA-Konjugate verwendet (basierend auf der DNA-gerichteten Immobilisierung, DDI). Diese Methode ermöglicht die hochspezifische, aber nichtkovalente und damit reversible Bindung von Protein-DNA-Konjugaten an komplementäre oberflächengebundene Oligonucleotide. Der DDI-Ansatz verknüpft die effiziente Bindung von Protein-DNA-Konjugaten mit örtlich aufgelöster Detektion im Mikroarrayformat.^[8-10] Dies ist eine Erweiterung der häufig genutzten Antikörper-basierten Immobilisierung von Fängerproteinen auf Mikroarrays.^[11,12]

Als Modellsystem für den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch DDI in Verbindung mit Massenspektrometrie wurde (aufgrund der medizinischen Relevanz) ein Proteinpaar bestehend aus dem Ras-Protein und der Ras-bindenden Domäne (RBD) seines Effektorproteins c-Raf1 ausgewählt.^[13] Zusätzlich wurde noch ein zweites Paar gewählt, nämlich Ras und ein Ras-spezifischer Antikörper. Das Ras-Protein hat eine entscheidende Funktion bei der Signalweiterleitung in Zellen, indem es zwischen einem aktivierte, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand hin und her schaltet.^[14] Die Affinität von Ras:GTP für die RBD beträgt ca. 160 nm, während die Affinität von Ras:GDP für die RBD ca. 200fach schwächer ist.^[15] Mutationen im Ras-Protein können zur konstitutiven Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden führen und treten in 30 % aller menschlichen Tumore auf.^[16] Ein weiterer wichtiger Grund für die Auswahl dieses Systems war, dass es bisher keinen Antikörper gibt, der zwischen Ras:GTP und Ras:GDP unterscheiden kann.

Die funktionale Immobilisierung von Proteinen wurde durch die Synthese von Protein-DNA-Fusionsproteinen durch Ligation exprimierter Proteine („expressed-protein ligation“) erreicht.^[17,18] Ähnliche Ansätze wurden bisher für Peptid-DNA- und Peptid-PNA-Konjugate beschrieben.^[9,19,20]

Die DNA-gerichtete Immobilisierung von Protein-DNA-Konjugaten durch Hybridisierung auf Oligonucleotid-modifizierten Oberflächen ist eine sanfte Methode, die hohe Adsorptionseffizienz und Reversibilität mit hoher Spezifität verbindet. Diese Immobilisierungsstrategie wurde zuerst mit Ras- und RBD-DNA-Konjugaten auf Glasmikroarrays getestet. Dabei wurde die Glasoberfläche mit einer dendritischen Zwischenschicht modifiziert, auf die anschließend 5'-Amino-modifizierte Oligonucleotide kovalent aufgebracht wurden.^[21] Drei unterschiedliche DNA-Sequenzen wurden verwendet, um die Ras- und RBD-DNA-Konjugate zu binden. Zwei davon waren komplementär zu der DNA, die an die Proteine gekuppelt wurde, unterschieden sich aber in der Zahl der Basen (**1**, **2**). Zusätzlich wurde ein nichtkomple-

mentärer DNA-Strang (**3**) verwendet, um die Spezifität der Hybridisierung zu überprüfen.

Die Synthese der Protein-DNA-Konjugate erfolgte durch Expression von Ras und RBD in *E. coli* als Fusionsproteine mit einem Mxe-Intein und einer Chitin-bindenden Domäne (CBD), die für die Affinitätsreinigung genutzt wurde.^[22] Die Zugabe von Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) zu den gereinigten Fusionsproteinen setzte das Ras (**4**) und die RBD (**5**) mit den entsprechenden C-terminalen Thioestern frei (siehe Hintergrundinformationen). Diese wurden anschließend mit einem Oligonucleotid, das einen Cysteinrest am 5'-Ende trägt, ligiert. Die 5'-Modifikation des Oligonucleotids wurde auf zweierlei Weise erreicht. In einem ersten Ansatz wurde ein modifiziertes Thymidin-3'-O-phosphoramidit **6** während der Festphasensynthese in ein Oligonucleotid **7** eingeführt. Das Amidit **6** enthält einen 5'-Cysteinrest und war ausgehend von 5'-Aminothymidin synthetisiert worden (Abbildung 1). Im zweiten Ansatz wurde ein 5'-Amino-modifiziertes Oligonucleotid, das noch an die Festphase gekuppelt ist (**8**), mit dem Fmoc-geschützten Cystein Fmoc-Cys(SBu)-OH zum 5'-Cystein-modifizierten Oligonucleotid **9** umgesetzt (siehe Hintergrundinformationen).^[23] Die Oligonucleotide **7** und **9** wurden mit dem Ras- (**4**) und dem RBD-Thioester (**5**) zu den Protein-DNA-Konjugaten **10** bzw. **11** umgesetzt (Abbildung 1a-c).^[19,24,25]

In ersten Tests wurde ein Fluoreszenzsignal ausgelesen, um Ras:GppNHp-DNA (GppNHp ist ein nichthydrolisierbares GTP-Derivat) auf Glasmikroarrays mithilfe eines Cy5-markierten Ras-spezifischen Antikörpers nachzuweisen. Die spezifische Wechselwirkung zwischen dem vollständig komplementären oberflächengebundenen Oligonucleotid **1** und dem Ras-DNA-Konjugat **10** wurde durch ein starkes Fluoreszenzsignal eindeutig nachgewiesen (Abbildung 1d). Ein wesentlich schwächeres Fluoreszenzsignal wurde mit dem komplementären, aber verkürzten Oligonucleotid **2** beobachtet (Abbildung 1d). Das nichtkomplementäre Oligonucleotid **3** zeigte kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 1d) und wurde in allen weiteren Experimenten als Negativkontrolle genutzt, um einen Einfluss von oberflächengebundenen Oligonucleotiden auf das ausgelesene Signal auszuschließen.

Für den Nachweis der Analytproteine durch MALDI-MS musste ein neues Material für die Mikroarrays gefunden werden, da Glas wegen seiner schlechten elektrischen Leitfähigkeit ungeeignet ist. Siliciumscheiben sind kommerziell erhältlich, weisen eine adäquate elektrische Leitfähigkeit auf und lassen eine dem Glas ähnliche Oberflächenchemie zu. Die Arrays wurden im Objektträgerformat hergestellt und bestanden aus jeweils 5 Subarrays (18 × 9 mm). Jeder Subarray enthielt zwischen 18 und 36 Spots mit einem Durchmesser von ca. 200 µm (Abbildung 2b). In den ersten Experimenten wurden drei unterschiedliche Fänger-Oligonucleotide (**1-3**) in Reihen mit jeweils 6 Spots aufgebracht. Die Siliciumchips wurden gewaschen und mit Albumin und detergenshaltigem (Tween20) Puffer blockiert (siehe Hintergrundinformationen). Danach wurden die Fängerproteine RBD-DNA oder Ras-DNA auf der Oberfläche immobilisiert, gefolgt von mehreren Waschschritten und der Inkubation mit den Analytproteinen (Ras:GppNHp/Ras-Antikörper). Abschließend wurde eine Schicht der organischen Matrix (Sinapinsäure) auf

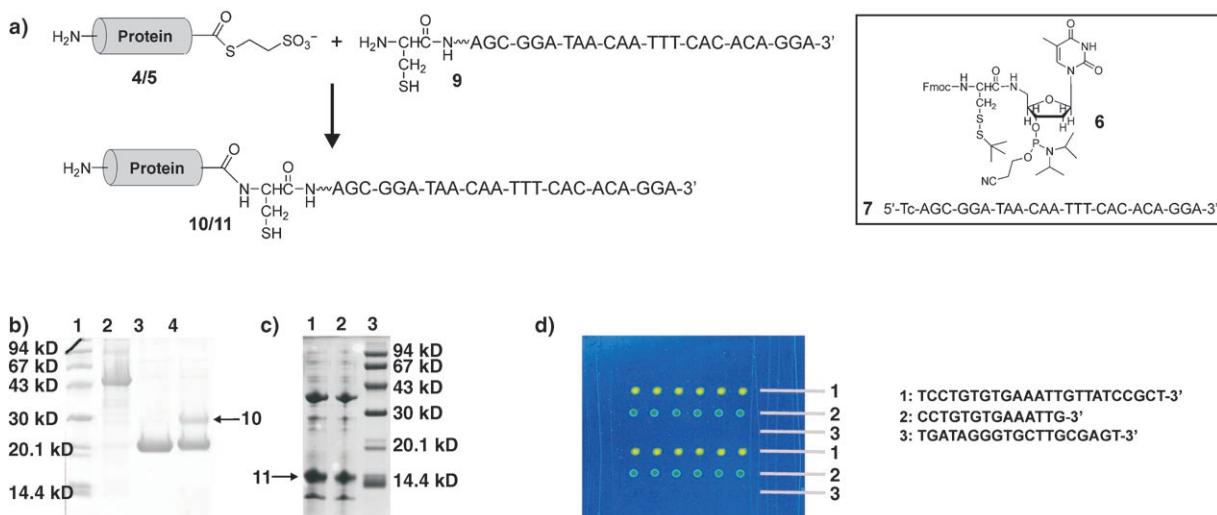


Abbildung 1. a) Schematische Darstellung der Ligation zwischen den Protein-Thioestern (**4** oder **5**) und dem 5'-Cys-modifizierten Oligonukleotid **9** zu den Fängerproteinen RBD-DNA (**10**) und Ras:GppNHP-DNA (**11**). b) SDS-PAGE-Gel (12%) der Ras-Ligation. 1: Molekulargewichtsmarker, 2: gereinigtes Ras-Mxe-Fusionsprotein (**2**), 3: Ras-Thioester (**4**), 4: Ras-Thioester **4** + **9** nach 12 h Ligation. c) SDS-PAGE-Gel (12%) der RBD-Ligation. 1: RBD-Thioester **5** + **9** (10 µL) nach Ligation, 2: RBD-Thioester **5** + **9** (5 µL) nach Ligation, 3: Molekulargewichtsmarker. d) Fluoreszenzbild des Glasmikroarrays; DNA-gerichtete Immobilisierung von Ras-DNA **10** auf einem Subarray mit drei Reihen der folgenden Oligonukleotide: vollständig komplementäres (**1**), verkürzt komplementäres (**2**), nichtkomplementäres (**3**).

den Mikroarrays aufgebracht und getrocknet (Abbildung 2 a).

Die MALDI-Messungen wurden mit einem Post-Source-Decay(PSD)-MALDI-Massenspektrometer (Aladim II, Eigenbau) durchgeführt, das die Ausrichtung der Mikroarrayplatte in *x*-, *y*- und *z*-Richtung ermöglicht.^[26,27] Mehrfache Kontrollen wurden durchgeführt, indem jeweils eine Reihe mit nichtkomplementärem Oligonukleotid **3** in jedem Subarray aufgetragen wurde und indem Subarrays vermessen wurden, die kein Fänger- und Analytprotein oder nur das Fängerprotein RBD-DNA enthielten. Im Falle des oberflächengebundenen nichtkomplementären Oligonukleotids wurde kein Signal erhalten, weder für das Fänger- noch für das Analytprotein. Die Subarrays mit immobilisiertem RBD-DNA oder Ras-DNA zeigten ebenfalls kein Signal, was darauf hinweist, dass entweder die Protein-DNA-Konjugate nicht von der Oberfläche gelöst oder unter den gewählten Bedingungen nicht ausreichend gut ionisiert werden (Abbildung 2 c). Messungen im Modus für negativ geladene Ionen zeigten ebenfalls kein Signal für die Fängerproteine.

Die Inkubation eines mit RBD-DNA beladenen Subarrays mit einer 3-µM-Lösung des C-terminal verkürzten Ras:GppNHP führte jedoch schon nach 2 bis 20 Laserpulsen zu einem MALDI-Signal bei 18862 Da für das Ras-Protein (berechnete Masse 18853 Da, Abbildung 2 d). Inkubation des Arrays mit Ras:GDP führte zu keinem Signal, was belegt, dass die immobilisierte RBD-DNA selektiv aktiviertes Ras:GppNHP bindet und nicht die inaktive Form (Ras:GDP). Positive Ergebnisse wurden ausschließlich in den Spots erhalten, die mit den Oligonukleotiden **1** und **2** beladen waren, aber in keinem Fall mit dem nichtkomplementären Oligonukleotid **3**. Dies unterstreicht die hohe Spezifität der Methode zur Immobilisierung der Fänger- als auch der Analytproteine.

Ein großer Vorteil dieses Ansatzes ist die räumliche Auflösung. Signale im Massenspektrum wurden ausschließlich in äquidistanten Bereichen auf den Subarrays gefunden, die sehr gut mit den Spots der immobilisierten Oligonukleotide korrelierten, die von einem automatisierten Spotter auf die Oberfläche aufgebracht wurden. Aus dieser Beobachtung schließen wir, dass die aufgetragene organische Matrix die Analytmoleküle nicht vollständig auflöste und nicht über den Spot hinaus verteilte.

Um den Anwendungsbereich dieser Methode zu bestimmen, wurde ein zweites Proteinpaar untersucht. Hierzu wurde Ras-DNA auf einem Subarray immobilisiert und mit einem Cy5-markierten Ras-spezifischen Antikörper markiert. Das Massenspektrum (Abbildung 2 e) zeigte einen Peak bei 11814 Da, der einer der leichten Ketten des (Fab)-Antikörpers zugeordnet werden kann. Andere Signale in diesem Spektrum stören nicht bei der Identifizierung des Analyten. Negativkontrollen, wie sie bereits beschrieben wurden, zeigten kein Signal.

Ein wichtiger Aspekt bei der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist die Affinität, die ein limitierender Faktor bei Messungen unter physiologischen Bedingungen sein kann. Die Nachweisgrenze für die Ras-RBD-Wechselwirkung (die als mittelstarke Wechselwirkung angesehen werden kann) wurde durch Inkubation von fünf Subarrays mit Lösungen von Ras:GppNHP in Konzentrationen von 3 µM, 300 nM, 30 nM, 3 nM und 0.3 nM bestimmt. In allen Fällen wurde über 80 Laserpulse gemittelt (siehe Abbildung 4 in den Hintergrundinformationen). Ras:GppNHP wurde bis zu einer Inkubationskonzentration von 3 nM detektiert. Diese Konzentration liegt um einen Faktor 50 unter dem K_D -Wert, der für die Ras:GppNHP-RBD-Wechselwirkung (160 nM) in Lösung bestimmt wurde.^[15] Das Experiment belegt, dass Messungen bei Konzentrationen deutlich unterhalb des K_D -

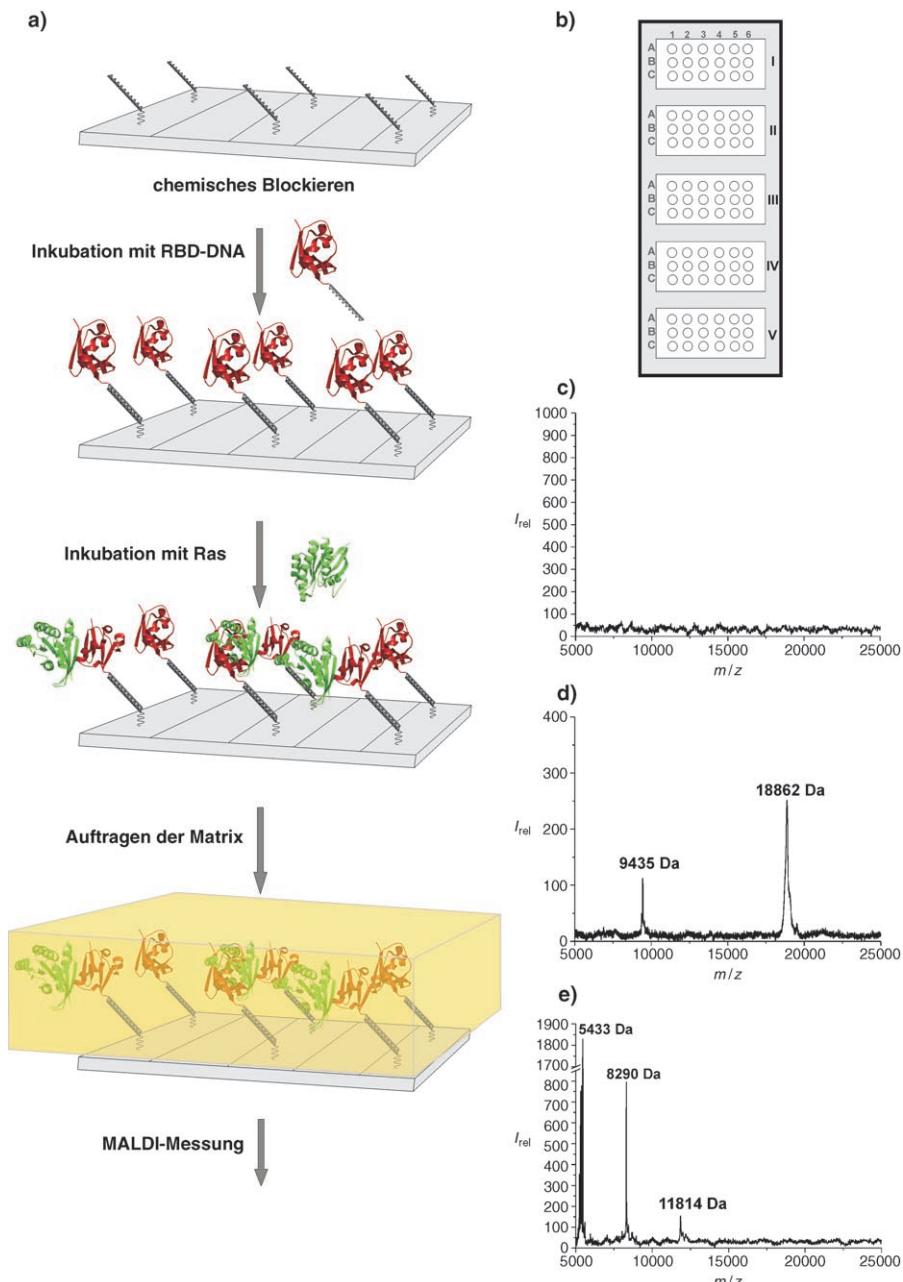


Abbildung 2. a) Präparation der Mikroarrays, von oben nach unten: chemisches Blockieren der Oberfläche nach kovalenter Verankerung der Oligonukleotide; DNA-gerichtete Immobilisierung der Fängermoleküle (RBD-DNA-Konjugate); Inkubation mit Analyten (Ras:GppNHP); b) Mikroarray im Objektträgerformat. c) Typisches MALDI-Spektrum des Hintergrundsignals (nur Fängermolekül auf der Oberfläche). d) MALDI-Spektrum des Mikroarrays nach Inkubation mit einer 3- μ M-Lösung von Ras:GppNHP. e) MALDI-Spektrum eines Mikroarray-Spots mit Ras-DNA als Fängermolekül und einem Ras-spezifischen Antikörper als Analyt.

Wertes einer bestimmten Wechselwirkung möglich sind, sodass auch schwach bindende Moleküle identifiziert werden. Des Weiteren könnte die Quantifizierung der Analytproteine durch MALDI-MS Aussagen über die Affinität zwischen Fänger- und Analytprotein und über die Konzentration des Analyten ermöglichen.^[28]

Messungen bei sehr niedrigen Konzentrationen von aktiviertem Ras ermöglichen den Nachweis von aktiviertem Ras

in komplexen Gemischen, z.B. Zelllysaten. Eine Säugerzelllinie (MDCK-Zellen; Madine Darby canine kidney) und eine sehr ähnliche MDCK-f3-Zelllinie, die mit dem *H-Ras*-Gen viral transformiert worden war,^[29-31] wurden zur Bildung fraktionierter Zelllysate verwendet. MDCK-f3-Zellen exprimieren erhöhte Mengen des Ras-Proteins und sollten deshalb aktiviertes Ras in Konzentrationen enthalten, die typisch sind für Krebszellen. Nach Lyse der Zellen wurden zytoplasmatische Fraktionen und Membranfraktionen getrennt. Die zytoplasmatischen Fraktionen wurden direkt eingesetzt, die Membranfraktionen mit Triton X100 enthaltendem Puffer extrahiert und der lösliche Anteil verwendet.

Vier Subarrays wurden 30 Minuten jeweils mit den zytoplasmatischen Fraktionen und mit den Membranextrakten der MDCK- und MDCK-f3-Zellen inkubiert. Darauf folgten Waschschritte und das Auftragen der Matrix. Im Falle der beiden Membranfraktionen wurde nur eine Serie von äquidistanten Signalen im Bereich zwischen 500 und 2000 Da gefunden, die durch Detergensmoleküle verursacht wurden, die während der Probenvorbereitung auf der Oberfläche verblieben sind und vermutlich auch den Nachweis von aktiviertem Ras verhinderten. Hin gegen trat bei der zytoplasmatischen Fraktion der MDCK-f3-Zellen ein breites Signal auf, das von 21050 bis 21700 Da reicht und ein Maximum bei 21329 Da aufweist. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Masse des nichtmodifizierten ungekürzten Ras (Molekulargewicht 21298 Da;^[32] Abbildung 3). Dieses Ergebnis belegt, dass aktiviertes Ras in Zelllysaten bei Konzentrationen weit unterhalb des K_D -Wertes für die Ras-RBD-Wechselwirkung nachgewiesen werden kann. Eine Verbes-

serung der Auflösung sollte die Unterscheidung zwischen posttranslational modifizierten Isoformen von Ras in unterschiedlichen zellulären Umgebungen ermöglichen.

Wir haben gezeigt, dass Proteine unter Anwendung der Ligation mit exprimierten Proteinen mit einfach zugänglichen Cystein-modifizierten Oligonukleotiden leicht modifiziert werden können, was eine direkte funktionale und hoch selektive Immobilisierung der entstehenden Protein-DNA-

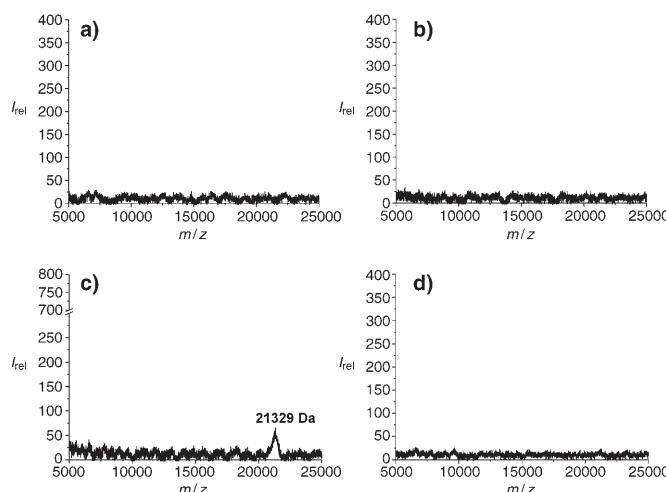


Abbildung 3. Mikroarray mit RBD-DNA als Fänger molekül nach Inkubationen mit zytoplasmatischen Fraktionen und Membranextrakten aus MDCK- und MDCK-f3-Zellen. MALDI-Spektren von Subarrays nach Inkubation mit a) der zytoplasmatischen Fraktion aus MDCK-Zellen; b) einem Membranextrakt aus MDCK-Zellen; c) der zytoplasmatischen Fraktion aus MDCK-f3-Zellen; es tritt ein Signal bei 21 329 Da auf; d) einem Membranextrakt aus MDCK-f3-Zellen.

Konjugate ermöglicht. Eine Kombination der daraus resultierenden DDI-basierten Proteinmikroarrays mit MALDI-Massenspektrometrie führt zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen weit unterhalb ihrer K_D -Werte. Selektivität und Empfindlichkeit der Methode reichen aus, um Ras-Proteine in komplexen Gemischen wie Zelllysaten ohne störende Signale zu identifizieren.

Ein wichtiger Vorteil der reversiblen Immobilisierungsstrategie besteht darin, dass die Mikroarrays wiederverwendbar sind. Der Nachweis durch MALDI ist herkömmlichen Verfahren wie der Fluoreszenzdetektion durch die zusätzliche Information zum Molekulargewicht des Analyten überlegen. In Verbindung mit proteolytischem Verdau und hochentwickelten MALDI-Techniken wie PSD oder FT-ICR-MS mit kompositionsbasierter Sequenzierung könnte das Analytmolekül direkt identifiziert werden.^[33] Die hier beschriebene Methode wird die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die Selektion von neuen oder unbekannten Bindungspartnern sowie die Untersuchung des Einflusses von dritten Komponenten (Wirkstoffen) auf das Bindungereignis ermöglichen.

Eingegangen am 16. August 2005
Online veröffentlicht am 24. Oktober 2005

Stichwörter: Massenspektrometrie · Mikroarrays · Oligonucleotide · Protein-DNA-Konjugate · Proteine

- [1] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 160–166.
- [2] J. Su, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4909–4912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4715–4718.
- [3] V. Seibert, A. Wiesner, T. Buschmann, J. Meuer, *Pathol. Res. Pract.* **2004**, *200*, 83–94.

- [4] D. H. Min, J. Su, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6099–6103; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5973–5977.
- [5] D. H. Min, M. Mrksich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 554–558.
- [6] U. Plutowski, C. Richert, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 627–631; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 621–625.
- [7] 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.
- [8] C. M. Niemeyer, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 51–53.
- [9] M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822–823.
- [10] R. Wacker, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 281–287.
- [11] T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 105–115.
- [12] R. Barry, M. Solovjev, *Proteomics* **2004**, *4*, 3717–3726.
- [13] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4193–4214.
- [14] M. S. Boguski, F. McCormick, *Nature* **1993**, *366*, 643–654.
- [15] J. R. Sydor, M. Engelhard, A. Wittinghofer, R. S. Goody, C. Herrmann, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14292–14299.
- [16] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779–827.
- [17] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [18] S. Takeda, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2407–2410.
- [19] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4900–4908.
- [20] Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8544–8546.
- [21] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686–694.
- [22] T. C. Evans, J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2256–2264.
- [23] R. Vinayak, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7611–7613.
- [24] M. Lovrinovic, M. Spengler, C. Deutsch, C. M. Niemeyer, *Mol. Biosys.* **2005**, *1*, 64.
- [25] I. Burlulis, K. Yamaguchi, A. Gordon, R. Carlson, R. Brent, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 31–37.
- [26] B. Spengler, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1019–1036.
- [27] P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 91–103.
- [28] J. Reinders, U. Lewandrowski, J. Moebius, Y. Wagner, A. Sickmann, *Proteomics* **2004**, *4*, 3686–3703.
- [29] J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Vanroy, W. Birchmeier, *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 2435–2447.
- [30] P. L. Hordijk, J. P. ten Klooster, R. A. van der Kammen, F. Michiels, L. C. Oomen, J. G. Collard, *Science* **1997**, *278*, 1464–1466.
- [31] K. Vleminckx, L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, F. Van Roy, *Cell* **1991**, *66*, 107–119.
- [32] J. P. McGrath, D. J. Capon, D. H. Smith, E. Y. Chen, P. H. Seeburg, D. V. Goeddel, A. D. Levinson, *Nature* **1983**, *304*, 501–506.
- [33] B. Spengler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 703–714.