

## Proteinbiochips in der Biomedizin und Biotechnologie

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

Biomarker · Proteinbiochips · Proteinmikroarrays ·

Proteomik · Wirkstoff-Forschung

**D**ank Fortschritten bei Immobilisierungsstrategien für Proteine sind Proteinbiochips in den letzten Jahren immer besser verfügbar geworden. Durch die Integration dieser Assay- und Analyseplattformen in die biomedizinische und biotechnologische Forschung konnte das Repertoire an Methoden für die Proteomik, die Biomarkerforschung und die Wirkstoffentwicklung deutlich vergrößert werden. In diesem Kurzaufsatz werden ausgewählte Entwicklungen bei der Anwendung von Proteinbiochips auf diesen Forschungsgebieten beleuchtet.

### 1. Einleitung

Oberflächen, die immobilisierte Proteine präsentieren, – so genannte „Proteinbiochips“ – versprechen eine Vielzahl von Anwendungen, darunter eine schnelle und umfassende Detektion von Biomarkern in klinischen Proben,<sup>[1]</sup> das proteomweite Screening von Wechselwirkungen<sup>[2]</sup> sowie Anwendungen bei der Wirkstoff-Forschung.<sup>[3]</sup> Die Vorteile von Proteinbiochips gegenüber traditionellen Methoden wie ELISA (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) bestehen in der geringen erforderlichen Probenmenge sowie in ihrer guten Eignung zur Miniaturisierung. Im Fall von Proteinmikroarrays, die mehrere Proteine zugleich präsentieren, resultieren diese Merkmale in der Fähigkeit, viele tausend Proben parallel zu prozessieren – einer Eigenschaft, die für proteomweite Analysen wesentlich ist.

Die Herstellung von Proteinmikroarrays profitiert von den Fortschritten bei DNA-Mikroarrays, da viele der Apparaturen für deren Produktion und Analyse auch bei der Fertigung von Proteinmikroarrays eingesetzt werden können. Dennoch ist der Übergang von DNA- zu Proteinmikroarrays

wegen der größeren Empfindlichkeit von Proteinen kompliziert und erfordert speziell zugeschnittene Methoden zur Proteinimmobilisierung, die eine Erhaltung der Integrität und Funktionalität der Proteine gewährleisten.<sup>[4]</sup>

Proteinbiochips, die definierte Proteinstrukturen präsentieren sollen, erfordern sogar noch komplexere Herstellungsansätze.<sup>[4]</sup> Auf diesen Gebieten sind allerdings bereits beachtliche Fortschritte erzielt worden. Kürzlich beschrieben wir in einem Übersichtsartikel chemische Strategien zur Herstellung von Proteinbiochips,<sup>[4]</sup> während wir uns im vorliegenden Kurzaufsatz auf deren Anwendungen in ausgewählten Gebieten der biomedizinischen und biotechnologischen Forschung konzentrieren wollen, nämlich bei der Proteomforschung, der Biomarkerdetektion und der Wirkstoff-Forschung.

### 2. Proteomik

Proteinmikroarrays, die eine Vielzahl verschiedener Proteine an ihrer Oberfläche präsentieren, sind eine vielversprechende Plattform für biomedizinische Analysen und die Proteomforschung.<sup>[5-7]</sup>

In einem der fortgeschrittensten Anwendungsbeispiele untersuchten MacBeath und Mitarbeiter den Phosphorylierungszustand von ErbB-Rezeptorkinasen mithilfe funktionaler Proteinmikroarrays.<sup>[8,9]</sup> Die Rezeptoren ErbB2 und ErbB3 (EGFR) des epidermalen Wachstumsfaktors sind gut erforschte Mitglieder der ErbB-Familie und als potente Onkogene bekannt. ErbB4, das nicht eingehend untersucht wurde, ist kein Onkogen und hat in einigen Tumoren gar eine Schutzfunktion. Um seine Bedeutung näher zu untersuchen, identifizierten MacBeath et al. mithilfe der Tandem-Massenspektrometrie zunächst phosphorylierte Tyrosinseitenketten an ErbB4. Im Anschluss wurde ein Mikroarray aus aldehydmodifizierten Glasplatten für die Präsentation von 96 SH2- und 37 PTB-Domänen hergestellt, an dem fluoreszenzmarkierte Phosphopeptide untersucht wurden, die den ermittelten Phosphorylierungsstellen aus ErbB4 entsprachen.

[\*] Prof. Dr. C. M. Niemeyer

Technische Universität Dortmund, Fachbereich Chemie  
Biologisch-chemische Mikrostrukturtechnik  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+ 49) 231-755-7082

E-Mail: christof.niemeyer@tu-dortmund.de

Dipl.-Chem. D. Weinrich, Prof. Dr. H. Waldmann  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und  
Technische Universität Dortmund, Fachbereich Chemie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+ 49) 231-133-2499

E-Mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

Dr. P. Jonkheijm  
MESA+ Institute for Nanotechnology, University of Twente  
P.O. Box 217, 7500 AE Enschede (Niederlande)

Dieser Ansatz ermöglichte die Konstruktion eines quantitativen Wechselwirkungsnetzwerks für ErbB4, wobei neue Wechselwirkungen zwischen ErbB4 und dem DNA bindenden Protein STAT1 ausgemacht werden konnten, das vermutlich eine Rolle bei der Apoptose spielt (Abbildung 1). Die Autoren führen die Schutzfunktion von ErbB4 in Tumoren auf seine Fähigkeit zurück, unschädliche Heterodimere mit anderen ErbB-Rezeptoren zu bilden und somit durch eine Art „Puffermechanismus“ die Menge an onkogenen Heterodimeren von EGFR, ErbB2 und ErbB3 zu verringern.<sup>[9]</sup>

Gong et al. verwendeten ein funktionelles Proteinmikroarray für die Charakterisierung der globalen Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen der Pflanze *Arabidopsis thaliana*.<sup>[10]</sup> Ausgehend von FAST-Nitrocellulose-Membranplatten konstruierten sie ein Mikroarray für die Präsentation von 802 Transkriptionsfaktoren (TF) aus *Arabidopsis thaliana*, die durch Expression in Hefe gewonnen worden waren. An diesem Mikroarray wurden fluoreszenzmarkierte Oligonucleotide untersucht, die bekannten Bindestellen für die TF-Familie AP2/ERF entsprechen. So waren die Autoren in der Lage, sowohl bekannte DNA-TF-Wechselwirkungen zu bestätigen als auch neue Wechselwirkungen von 48 zuvor uncharakterisierten Transkriptionsfaktoren der AP2/ERF-Familie zu identifizieren.

In einer zweiten Experimentreihe wurde ein 440 Transkriptionsfaktoren präsentierendes Proteinmikroarray verwendet, um die TF-Bindung an das so genannte „evening element“ (EE) zu untersuchen. Bei diesem handelt es sich um

ein Motiv, das in nachphasentypischen Genen besonders häufig auftritt und mit einer tageszeitabhängigen Expressionsregulation in Verbindung steht. Durch Inkubation des TF-Mikroarrays mit fluoreszenzmarkierten EE-Oligonucleotiden ermittelten Gong et al. 41 EE-Motiv bindende Kandidaten, von denen bei 11 bereits zuvor eine tageszeitregulierte Expression festgestellt worden war. Schließlich untersuchten die Autoren den biotinylierten, GST-markierten Transkriptionsfaktor HY5, einen positiven Regulator der Photomorphogenese, an einem Mikroarray mit 802 Transkriptionsfaktoren (GST=Glutathion-S-Transferase). Dabei wurden durch Detektion mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin 20 reproduzierbare Wechselwirkungen identifiziert, aus denen 4 von 10 zufällig ausgewählten Treffern durch ein Hefe-Zwei-Hybridsystem bestätigt werden konnten. Die Befunde lassen darauf schließen, dass HY5 über unterschiedliche Zielmotive an verschiedene Proteine bindet, und sind in Einklang mit seiner Rolle als Hauptregulator des lichtabhängigen Signallnetzwerks in *Arabidopsis thaliana*.<sup>[10]</sup>

Die Herstellung von Mikroarrays ganzer Proteome ist technisch anspruchsvoll, da solche Mikroarrays eine Vielzahl von funktionellen Proteinen enthalten, die isoliert werden müssen. Was die Analyse vollständiger Proteome weiter erschwert, ist die Tatsache, dass es sich bei einem gegebenen Proteom nur um eine Momentaufnahme des Proteinvorrates einer bestimmten Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt handelt. Proteine unterscheiden sich nicht nur in ihrer Struktur, Funktion, Lokalisation, ihren Wechselwirkungen und Umsatzgeschwindigkeiten, sondern auch merk-



Dirk Weinrich wurde 1980 in Berlin geboren. Er studierte Chemie an der Technischen Universität Berlin mit den Schwerpunkten organische Chemie, technische Chemie und Biochemie. Er beendete sein Studium im Jahr 2005 mit einer Diplomarbeit über lichtschaltbare Peptide und spurlose Linker unter Anleitung von Karola Rück-Braun. Derzeit beendet er seine Promotion über Proteinbiochips bei Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut in Dortmund.



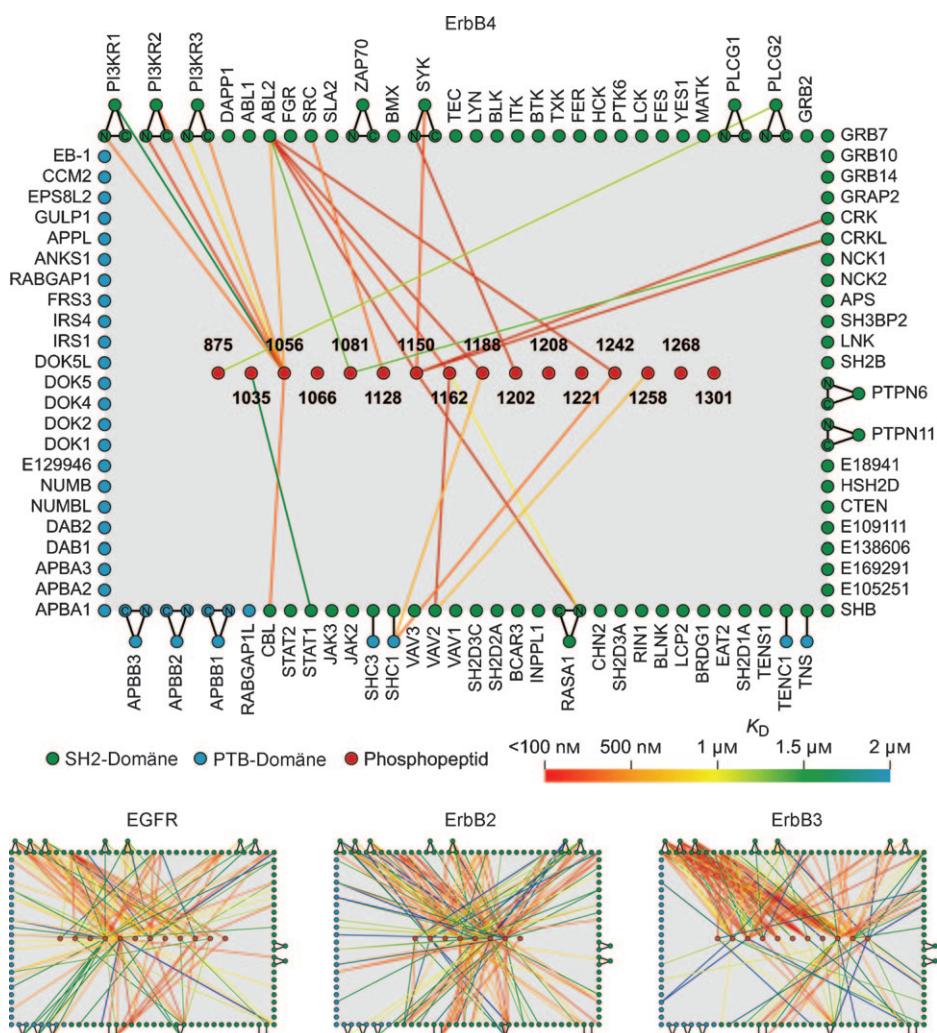
Christof M. Niemeyer studierte Chemie an der Universität Marburg und erhielt seinen Doktortitel am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr in der Arbeitsgruppe von Manfred T. Reetz. Nach einem Forschungsaufenthalt bei Charles R. Cantor am Center for Advanced Biotechnology in Boston habilitierte er an der Universität Bremen. Seit 2002 ist er Inhaber des Lehrstuhls für Biologische und Chemische Mikrostrukturierung in Dortmund. Er ist Gründer der Firma Chimera Biotec, welche die Kommerzialisierung diagnostischer Anwendungen für DNA-Protein-Konjugate zum Ziel hat.



Pascal Jonkheim wurde 1978 in Vogelwaarde in den Niederlanden geboren. Er promovierte 2005 bei E. W. (Bert) Meijer in supramolekularer Chemie an der Technischen Universität Eindhoven. Als Forschungsstipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung arbeitete er in der Gruppe von Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut in Dortmund. 2008 erhielt er im Rahmen des niederländischen VENI-Stipendiums eine Stelle als Gruppenleiter am Mesa+ Institut für Nanotechnologie an der Universität Twente. Seine Forschungsschwerpunkte sind supramolekulare Chemie, molekulare Nanofabrikation sowie Oberflächenstrukturierung mit Proteinen.



Herbert Waldmann erhielt 1985 seinen Doktortitel in organischer Chemie in der Arbeitsgruppe von Horst Kunz an der Universität Mainz und arbeitete anschließend in der Gruppe von George Whitesides an der Harvard University. Nach Professuren für Organische Chemie an den Universitäten Bonn (ab 1991) und Karlsruhe (ab 1993) wurde er 1999 Direktor des MPI für Molekulare Physiologie in Dortmund sowie Professor für Organische Chemie an der Universität Dortmund. Seine Forschungsinteressen liegen in der Untersuchung chemisch-biologischer Zusammenhänge mithilfe niedermolekularer Sonden und Proteinsonden sowie in der Mikroarraytechnik.



**Abbildung 1.** Quantitative Wechselwirkungsnetzwerke der mit den Rezeptoren der ErbB-Familie assoziierten Tyrosinkinasen. Die Daten wurden durch Präsentation von 96 SH2- und 37 PTB-Domänen auf Proteinkreiseln erhalten. Die SH2/PTB-Mikroarrays wurden mit fluoreszenzmarkierten Polypeptiden untersucht, die Phosphotyrosine an den ErbB-Kinasen repräsentierten. Die Detektion der Peptidbindung erfolgte durch Fluoreszenzmessungen. Wechselwirkungsnetzwerke wurden aus den ermittelten, quantitativen Wechselwirkungsdaten konstruiert.<sup>[9]</sup> Wiedergabe aus Lit. [9] mit Genehmigung von Elsevier.

lich im Dynamikbereich (Quotient aus Maximal- und Minimalwert) ihrer Häufigkeit ( $10^7$ – $10^8$  Kopien in menschlichen Zellen,  $10^{12}$  Kopien in Plasma).<sup>[11,12]</sup> Dennoch überwiegen in der Proteomik die Vorteile von Gesamtproteomkroarrays bei weitem die Schwierigkeiten bei ihrer Präparation, besonders wegen der Möglichkeit, Tausende von Proben gleichzeitig zu verarbeiten.

### 3. Biomarkerforschung

Die Verwendung von Mikroarrays für die Suche nach Biomarkern genießt besonders in der Krebsmedizin große Aufmerksamkeit. Ein Biomarker kann als ein Molekül oder Satz von Molekülen verstanden werden, das bzw. der mit einem definierten Zustand einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus in Zusammenhang steht. Bei diesem biologischen Zustand kann es sich beispielsweise um ein bestimmtes

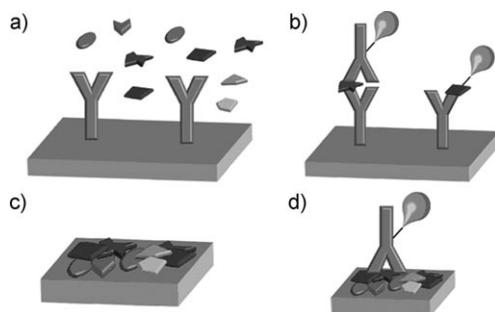
Bedeutung ist dieser Ansatz bei der Untersuchung von proteinabhängigen Signalnetzwerken, die häufig an Krebskrankungen beteiligt sind. Die Analyse derartiger Modifikationen mithilfe konventioneller, mit rekombinanten Proteinen beladener Mikroarrays ist problematisch, da ihre Einführung in diese Proteine durch Expression in Bakterien oder Hefen oft nicht möglich ist.<sup>[21]</sup> Daher sind RPPAs ein vielversprechendes Hilfsmittel für die klinische Diagnostik, das folgende Vorteile mit sich bringt:<sup>[22–24]</sup>

- 1) Es werden nur geringe Probenmengen benötigt.
- 2) Es ist keine Markierung zellulärer Proteinlysate erforderlich.
- 3) Die Methode ermöglicht eine quantitative Detektion.
- 4) Eine Vielzahl verschiedener Proben kann im Hochdurchsatz verglichen werden.
- 5) Parallel Mehrfachanalysen sind möglich.
- 6) Die Methode eignet sich zur Detektion posttranskriptionaler Modifikationen, z. B. Phosphorylierungen.

Stadium einer Krebserkrankung handeln. So könnte die Identifizierung von Biomarkern früher Tumorstadien verbesserte Therapien ermöglichen und die Überlebensraten von Patienten erhöhen.<sup>[13]</sup> Antikörperarrays sind die meistverwendeten Proteinarrays bei der Biomarkersuche und in der Proteomik.<sup>[1,6,14–20]</sup> Typischerweise werden entweder Normalphasen-Proteinarrays (forward-phase protein arrays, FPPAs) oder Umkehrphasen-Proteinarrays (reverse-phase protein arrays, RPPAs) verwendet (Abbildung 2).

Bei einem FPPA binden spezifische Antikörper, die an definierten Stellen auf dem Mikroarray immobilisiert wurden, Proteine aus einer Probe, z. B. menschlichem Serum. Idealerweise können mehrere Proteine gleichzeitig auf einem Array detektiert werden. Diese Proteine werden üblicherweise durch die Fluoreszenz farbstoffmarkierter sekundärer Antikörper oder markierter Probenproteine detektiert.

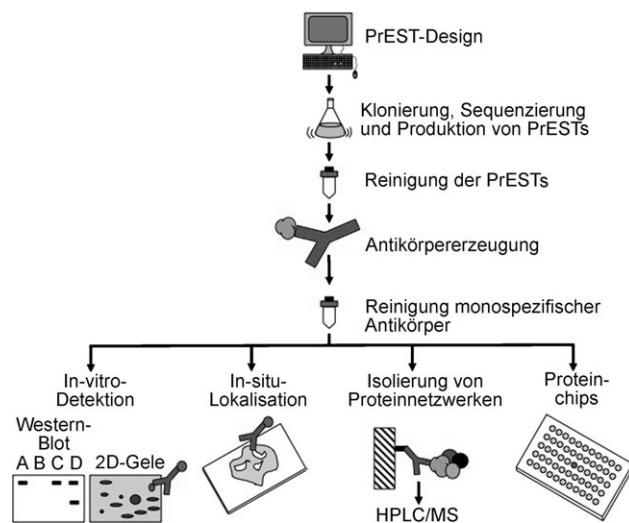
Auf RPPAs werden mehrere Proben, beispielsweise von Gewebelysaten oder Patientenserien, direkt auf einem Mikroarray immobilisiert und mit einem einzigen markierten Antikörper analysiert, der spezifisch für ein bestimmtes Protein ist. Die RPPA-Methode eignet sich vor allem für die Analyse posttranskriptionaler Modifikationen. Von besonderer



**Abbildung 2.** Normal- (FPPAs) und Umkehrphasen-Proteinarrays (RPPAs). a) Beim FPPA wird ein bestimmtes, in einer Probe mit verschiedenen Proteinen enthaltenes Protein von Antikörpern gebunden, die immobilisiert auf verschiedenen Spots des Mikroarrays vorliegen. Dabei wird jedes Array mit einer Probe inkubiert. b) Entweder wird ein markierter sekundärer Antikörper (links) oder ein markiertes Analytprotein (rechts) zum Auslesen des FPPA verwendet. In einer Probe können die Endpunkte mehrerer Analyten bestimmt werden. c) Beim RPPA wird eine verschiedene Proteine enthaltende Probe (z. B. Patientenproben oder Zell-Lysat) auf einem Mikroarray-Spot immobilisiert, sodass ein Array hunderte von Proben enthält. d) Zur Detektion auf einem RPPA wird nur ein einziger markierter, für ein bestimmtes Protein spezifischer Antikörper zur Signalerzeugung und -verstärkung verwendet. Dies ermöglicht die Endpunktbestimmung eines Analyten über hunderte von Proben hinweg.

Die RPPA-Methode ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass ausschließlich bekannte Zielmotive nachgewiesen werden können. Zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit von RPPAs verwendeten Tibes et al. Zell-Lysate von Leukämiepatienten zur Erstellung von RPPA-Mikroarrays auf FAST-Nitrocelluloseplatten und analysierten diese mit 22 geeigneten Antikörpern.<sup>[25]</sup> Die Bindung wurde dabei mithilfe sekundärer Antikörper und Fluoreszenzmessungen nachgewiesen. Von der Präparation der RPPA-Proben bis zum Auslesen der Ergebnisse validierten die Autoren jeden Schritt mithilfe entsprechender Analysetechniken, z.B. Western-Blot. Anhand dieses sorgfältigen Vergleiches konnten die Leistungsfähigkeit und Verlässlichkeit der RPPA-Methode bei der schnellen Analyse einer Vielzahl von Biomarkern demonstriert werden.<sup>[25]</sup>

Die Verwendung spezieller Polypeptidsequenzen, die unter der Bezeichnung „Proteinepitop-Signaturmarker“ bekannt sind (protein epitope signature tags, PrESTs; Abbildung 3), ermöglicht die Erzeugung zahlreicher Antikörper gegen ein bestimmtes Proteom.<sup>[26]</sup> Diese Sequenzen werden durch heterologe Expression offener Leserahmen (open reading frames, ORFs) hergestellt, die in Genomuntersuchungen ermittelt wurden. Die PrEST-Peptide werden nun entweder direkt auf einem Mikroarray platziert oder in einer Hochdurchsatz-Immunisierung zur Erzeugung von Antikörpern eingesetzt. PrEST-Peptidmikroarrays können für die Spezifitätscharakterisierung von Antikörpern verwendet werden.<sup>[27,28]</sup> Allgemein ist die Anwendbarkeit von Antikörperarrays stark durch die Verfügbarkeit und Qualität der entsprechenden Antikörper limitiert. Jeder Schritt bei der Erzeugung und Verwendung von Antikörpermikroarrays umfasst daher eine Qualitätskontrolle und Validierung mithilfe unabhängiger Methoden, um falsch positive oder falsch



**Abbildung 3.** PrESTs (Proteininsequenzen von ausreichender Länge, um gute Epitope zu enthalten, die jedoch klein genug für eine Expression in *Escherichia coli* sind) werden durch ein sorgfältiges, computergestütztes Auswahlverfahren generiert. Nach Expression und Immunisierung eines Wirtes erfolgt die Reinigung des so gewonnenen polyclonalen Antikörpers durch Affinitätschromatographie mit dem entsprechenden Signaturmarker. Auf diese Art wird ein hochwertiger monospezifischer Antikörper erhalten.<sup>[26]</sup> Wiedergabe aus Lit. [26].

negative Treffer zu vermeiden und systematische Fehler zu reduzieren. Außerdem ist es unabdingbar, dass die verwendeten Antikörper ausreichende Spezifitäts- und Affinitätskonstanten sowie geeignete Dynamikbereiche aufweisen. Allerdings werden diese Größen von den experimentellen Bedingungen beeinflusst, weshalb Parameter wie die Immobilisierungsbedingungen, der pH-Wert, die Temperatur und der Aufbewahrungszustand eine maßgebliche Rolle spielen. Die Optimierung und Validierung dieser Parameter sind daher für die Verlässlichkeit der Daten aus Biochipexperimenten entscheidend.

Antikörpermikroarrays wurden bereits erfolgreich in der Krebsforschung eingesetzt. Beispielsweise verwendeten Sanchez-Carbayo et al. mit 254 Antikörpern bedruckte Arrays zum Vergleich von Blasenkrebspatienten mit einer Kontrollgruppe ( $n = 95$ ). Die Erfolgsquote der Klassifizierung betrug hierbei 93.7 %,<sup>[29]</sup> sodass auf Basis der Mikroarraydaten und der Überlebensraten Vorhersagen über Patienten mit Blasenkrebs getroffen werden konnten. Des Weiteren wurden Serumproteine identifiziert, die als Biomarker zur Klassifikation bestimmter Blasentumorstadien dienen könnten. Zusätzliche immunhistologische Daten sowie die Befunde von Gewebemikroarrays stimmten mit den gewonnenen Resultaten überein.

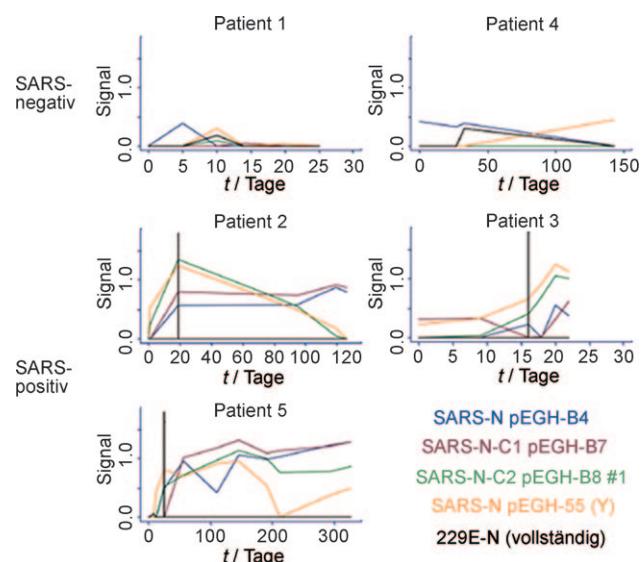
Hudson et al. verwendeten kommerziell erhältliche, hochdichte Proteinmikroarrays (ProtoArray Human Protein Mikroarray v3.0, Invitrogen) mit 5500 menschlichen Proteinen.<sup>[30]</sup> Die offenen Leserahmen wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine exprimiert und in doppelter Ausfertigung auf Nitrocelluloseplatten aufgebracht. Die Autoren untersuchten die Seren von 30 gesunden Testpersonen und von 30 Probanden mit Ovarialkarzinom in verschiedenen

Tumorstadien. Die Motivation dieser Untersuchung lag darin, dass der am weitesten verbreitete Marker für das Ovarialkarzinom, CA-125, keinen ausreichenden Vorhersagewert für Patienten in frühen Stadien der Erkrankung aufweist (Stadien I und II). Dementsprechend bestand das Ziel der Untersuchung in der Identifizierung von Proteinbiomarkern für frühe Erkrankungsstadien, da diese, basierend auf dem Proteinmikroarrayansatz, zukünftig bei der Krebstherapie und -prognose von Nutzen sein könnten. Von den 5500 Proteinen des Mikroarrays wurden 1845 von Autoantikörpern erkrankter Probanden sowie 1441 von Autoantikörpern gesunder Probanden gebunden. Aus diesen Proteinen wurden 730 selektiv von Autoantikörpern in Tumorpatienten gebunden, dagegen nur 326 selektiv in gesunden Probanden.

Leider konnten bei dieser Untersuchung keine Antigene oder Antigenkombinationen ermittelt werden, die ausschließlich von den Seren entweder aller Tumorpatienten oder aller gesunden Probanden gebunden wurden. Dennoch wurden mithilfe statistischer Methoden 90 tumorassoziierte Autoantigene sowie zwei mit dem gesunden Zustand assoziierte Antigene identifiziert. Vier davon – Lamin A/C, das strukturspezifische Erkennungsprotein 1 (structure-specific recognition protein 1, SSRP1), Ral-bindendes Protein 1 (RALBP1) und ZNF265 – wurden für weitere Validierungsuntersuchungen aus den zehn Proteinen mit der größten statistischen Varianz zwischen erkrankten und gesunden Probanden ausgewählt. Dabei kamen Western-Blots und Gewebemikroarrays zur Anwendung. Drei der vier Biomarkerkandidaten erwiesen sich bei der Analyse von Biopsiematerial als nützlich. Damit konnte das Potenzial von Proteinmikroarrays für die Suche nach Biomarkern klar nachgewiesen werden, wenngleich sich noch herausstellen muss, ob dieser Ansatz auch bei der Routineuntersuchung von Patientenserien umsetzbar ist.<sup>[30]</sup>

Snyder und Mitarbeiter verwendeten Proteinmikroarrays zur Identifizierung von Antikörpern gegen das schwere akute Atemwegssyndrom (severe acute respiratory syndrome, SARS), und verwandte Coronaviren. Dies gelang in den Seren zweier Patientengruppen (>600 Proben aus China und Kanada) mit einer Genauigkeit von ca. 90%.<sup>[31]</sup> Hierzu exprimierte man in Hefe 82 GST-Fusionsproteine und immobilisierte diese als Umkehrphasen-Proteinarray auf Nitrocelluloseplatten (Schleicher & Schuell). Durch Analyse des Mikroarrays war eine Differenzierung zwischen den beiden humanen Coronaviren SARS und HCoV-229E möglich. Das Screening der Patientenserien konnte dabei mithilfe von statistischen Methoden und ELISA validiert werden. Dabei stellte man fest, dass der auf Proteinmikroarrays beruhende Ansatz mindestens die gleiche Empfindlichkeit wie die ELISA-Standardmethode, aber eine höhere Spezifität aufwies. Weiterhin wurden mehrere Antigene aus verschiedenen Coronaviren gleichzeitig überprüft. Wie durch Langzeitbeobachtung der Serumaktivität gegen ausgewählte Proben (Abbildung 4) gezeigt wurde, haben einige Patienten über längere Zeiträume (120–320 Tage) reaktive Antikörper. Diese Untersuchung ist ein Beispiel für die Leistungsfähigkeit von Proteinmikroarrays in der biomedizinischen Diagnostik.<sup>[31]</sup>

Anderson et al. beobachteten Tumorantigene bei Brustkrebs mithilfe eines 1705 Antigene präsentierenden Mikro-



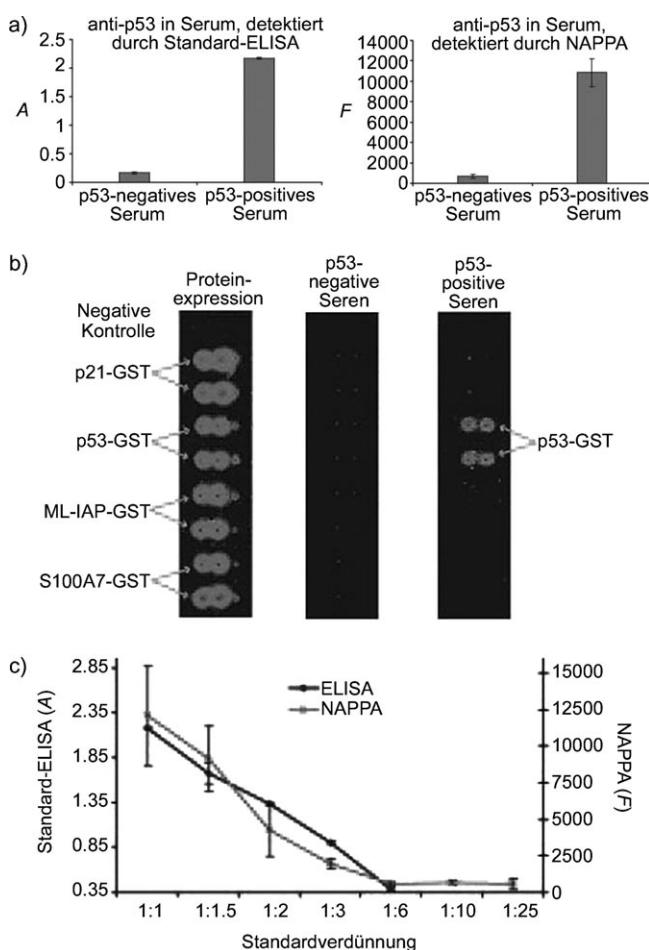
**Abbildung 4.** Zeitaufgelöste Analyse der Serumreaktivität SARS-spezifischer Antikörper aus fünf kanadischen Probanden. Oben: Testergebnisse der Probanden mit anderen Atemwegserkrankungen. Unten: Testergebnisse dreier SARS-Patienten. Die relativen Antikörpermengen gegen vier der SARS-N-Proteinkonstrukte sowie gegen das Protein HCoV-229E N wurden zu verschiedenen Zeiten durch Analyse von Proteinmikroarrays beobachtet. Die vertikalen Linien markieren die Zeitpunkte, an denen Probanden mithilfe biochemischer Assays als SARS-positiv diagnostiziert wurden. Wiedergabe aus Lit. [31] mit Genehmigung. Copyright 2006 National Academy of Sciences (USA).

arrays, das mithilfe eines Nucleinsäure-programmierten Proteinarrays (nucleic acid programmed protein array, NAPPA) konstruiert wurde (Abbildung 5).<sup>[32]</sup> NAPPA beruht auf der In-situ-Expression von Proteinen durch auf der Chipoberfläche immobilisierte DNA-Template. Auf diese Art sollten sich die Probleme bei der Proteinisolierung, -reinigung, -aufbewahrung oder -immobilisierung in ELISA-Anwendungen verringern lassen. Darüber hinaus ermöglicht die Methode auch Parallelanalysen. Allerdings ist der NAPPA-Ansatz äußerst arbeitsintensiv und führt zu „verunreinigten“ Proteinarrays, die zusätzlich DNA-Plasmide und Capture-Antikörper für die erzeugten GST-Proteine enthalten. Seren von Brustkrebspatientinnen wurden mit dieser Methode auf p53-spezifische Antikörper überprüft und die Befunde durch ELISA und Western-Blot bestätigt.<sup>[32]</sup>

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Beispiele sowie zahlreiche weitere Untersuchungen demonstrieren das Potenzial von Proteinmikroarrays als nützlichen Hilfsmitteln für die Biomarkersuche. Weitere Forschungen werden zeigen, ob die mit dieser Technik entdeckten Biomarker gut genug für die klinische Diagnostik und pharmazeutische Anwendungen sind.

## 4. Wirkstoff-Forschung

Eine Reihe von In-vitro-Methoden, z.B. Affinitätschromatographie und Proteindisplaytechniken wie Phagendisplays, werden zur Identifizierung und Validierung pharmazeutischer Wirkstoffe eingesetzt.



**Abbildung 5.** a) Die Detektion p53-spezifischer Antikörper mit ELISA oder NAPPA führte zu ähnlichen Ergebnissen. b) NAPPA, das die erfolgreiche Expression von vier Proteinen nach Detektion mit anti-GST-Antikörpern anzeigt. Anti-p53-Antikörper wurden in p53-positiven Seren mithilfe eines sekundären Antikörpers nachgewiesen, während negative Seren kein Signal zeigten. c) Vergleich der Empfindlichkeit von ELISA und NAPPA.<sup>[32]</sup> Adaptiert aus Lit. [32] mit Genehmigung. Copyright 2008 American Chemical Society.

zeutischer Zielstrukturen verwendet.<sup>[3,33,34]</sup> Proteinmikroarrays kommen häufig in Verbindung mit dem In-vivo-Screening von Ganzzellmodellen zum Einsatz. Trotz der Vorteile Biochip-basierter Analysen gegenüber der traditionell verwendeten Affinitätschromatographie sind Beispiele für die Anwendung von Proteinmikroarrays bei der Identifizierung von Zielstrukturen noch immer selten. Affinitätschromatographie ist ein zeitaufwändiger Prozess mit einer Tendenz zur Bindung häufiger Proteine, die dazu neigen, die Bindung weniger häufiger Proteine an immobilisierte niedermolekulare Liganden zu stören, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden können.<sup>[3]</sup> Proteinmikroarrays sind von dieser Schwäche jedoch nicht betroffen, da auf ihnen alle Proteine in der gleichen Menge präsentiert werden.<sup>[3]</sup> Außerdem ermöglichen sie ein schnelles Auslesen der Daten und eignen sich prinzipiell für ein Parallel-Screening.<sup>[3,33,34]</sup>

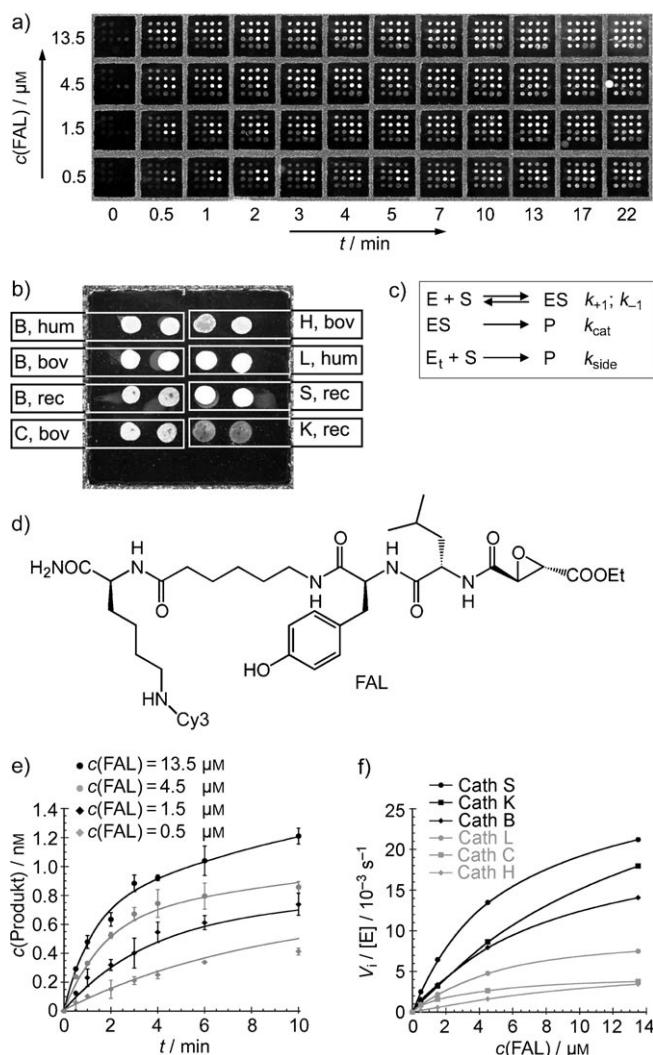
2004 beschrieben Schreiber et al. die Verwendung eines Proteinmikroarrays zur Dekonvolution pharmazeutischer

Zielstrukturen im Rahmen eines niedermolekularen Hochdurchsatz-Screenings.<sup>[35]</sup> In einem ersten phänotypenbasierten, chemisch/genetischen Suppressorassay wurden 16 320 niedermolekulare Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet, eine Wiederaufnahme der Vermehrung von Hefezellen auszulösen, die zuvor dem antiproliferativen Wirkstoff Rapamycin ausgesetzt worden waren. Die Autoren ermittelten sechs niedermolekulare Inhibitoren von Rapamycin (small-molecule inhibitors of rapamycin, SMIR), von denen zwei anschließend auf Hefe-Proteomchips zur Identifizierung ihrer Zielproteine untersucht wurden. Die dazu verwendeten Arrays enthielten die dem vollständigen Hefeproteom nahe kommende Zahl von 5800 Proteinen und wurden durch Bedrucken von Aldehyd- oder Nickel-beschichteten Platten mit GST- oder Polyhistidin-markierten Hefeproteinen erstellt. Zusätzlich wurden biotinylierte Varianten der beiden SMIRs synthetisiert und auf dem Proteomchip inkubiert. Für die Detektion der SMIR-Bindung an Proteine auf der Chipoberfläche wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin eingesetzt. So waren die Autoren in der Lage, ein zuvor unbekanntes Mitglied des Rapamycin-abhängigen Signalnetzwerks zu identifizieren.<sup>[35]</sup>

Bei der Wirkstoffsuche ist außer der Bestimmung von Zielstrukturen auch die Charakterisierung der Aktivität niedermolekularer Substanzen von Interesse. Eine aktivitätsbasierte Charakterisierung (activity-based profiling, ABP) ermöglicht die Aufklärung der Enzymaktivität in komplexen biologischen Mischungen mithilfe aktivitätsbasierter Sonden. Diese binden irreversibel an aktive Enzyme und können anschließend durch eine Reportergruppe detektiert werden.<sup>[36]</sup> Eine Kombination von ABP mit Proteinmikroarrays ermöglicht quantitative „Fingerabdruck“-Analysen von Inhibitoren gegen Reihen immobilisierter Enzyme im Hochdurchsatz.<sup>[37]</sup>

Miyake et al. stellten Mikroarrays mit sechs Mitgliedern aus der Cathepsinfamilie der Cysteinproteasen her und untersuchten damit 194 niedermolekulare Substanzen, von denen acht bereits als Inhibitoren von Cysteinproteasen bekannt waren (Abbildung 6).<sup>[38]</sup> In einem kompetitiven Hochdurchsatzassay wurden die mit Proteasen beladenen Mikroarrays mit einem Inhibitor vorinkubiert. Im Anschluss wurde eine fluoreszierende Affinitätsmarkierung (fluorescent affinity label, FAL) hinzugefügt, bei der es sich um einen fluorophormarkierten, irreversiblen Cysteinprotease-Inhibitor handelte. Dieser konkurrierte nun mit dem vorinkubierten Inhibitor um Bindung an die immobilisierten Enzyme. Nach einem Waschschritt gab daher die Menge an verbleibender Fluoreszenz Auskunft über die Bindungscharakteristika der vorinkubierten Substanz. Mit dieser Methode konnte die Wirksamkeit aller acht bekannten Cysteinprotease-Inhibitoren bestätigt werden, wobei die gemessenen Inhibitionssprofile (Fingerabdrücke) mit den Literaturwerten übereinstimmten.

In einer weiteren Reihe von Experimenten untersuchten Miyake und Mitarbeiter die Cysteinprotease-Inhibitoren konzentrationsabhängig zur Bestimmung von Inhibitionskonstanten, also quantitativer kinetischer Daten. Dabei stimmten die mit dem Assay gewonnenen Inhibitionskonstanten wiederum gut mit den entsprechenden Literaturdaten überein.<sup>[38]</sup> Dieser Ansatz wurde im Anschluss von Yao et al.



**Abbildung 6.** a) Fluoreszenz-Scans eines mit verschiedenen Konzentrationen an Proteaseinhibitor FAL behandelten Proteasemikroarrays zu unterschiedlichen Zeitpunkten. b) Fluoreszenzaufnahme eines Subarrays mit immobilisierten Cathepsin-Protease-Spots in doppelter Ausführung (hum: Mensch, bov: Rind, rec: rekombinant; Cathepsin-Subtypen sind mit Buchstaben bezeichnet). c) Reaktionsgleichungen für den Proteasemikroarray, die aus einer Anpassung an die experimentellen Kurven gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik abgeleitet wurden ( $E_t = E_{total}$ ). d) Struktur der fluoreszierenden Affinitätsmarkierung (FAL). e) Aus dem Mikroarray in (a) erhaltene Daten für Cathepsin L bei mehreren FAL-Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten. f) Aus dem Mikroarray in (a) erhaltene Anfangsgeschwindigkeiten für alle Proteasen bei verschiedenen FAL-Konzentrationen.<sup>[38]</sup> Wiedergabe aus Lit. [38] mit Genehmigung. Copyright 2005 Macmillan Publishers Ltd: Nature Biotechnology.

optimiert und erweitert. Durch die Verwendung eines in mehrere Subarrays aufgeteilten Proteasemikroarrays war man in der Lage, gleichzeitig quantitative Inhibitor-Fingerabdrücke an mehreren Proteasen zu erstellen. Anhand dieser Experimente konnten zusätzliche Selektivitätsinformationen über die Inhibitoren gewonnen werden.<sup>[39]</sup>

Proteinmikroarrays können bei der Wirkstoffsuche für den indirekten Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und niedermolekularen Liganden zum Einsatz

kommen. Beispielsweise können Antikörperarrays dazu verwendet werden, den Einfluss von Wirkstoffen auf das Proteom eines Organismus durch Vergleich der Expressionsmengen in dessen An- und Abwesenheit zu ermitteln.

Sokolov und Cadet wendeten eine Mikroarraytechnik an, um die Korrelation zwischen Proteinexpressionsmengen und dem Verhaltensphänotyp von mit Methamphetamin behandelten Mäusen zu untersuchen. Interessiert war man dabei an der Erkennung neuronaler Anpassungen, die mit Methamphetamin-Missbrauch einhergehen könnten.<sup>[40]</sup> Diese Substanz gilt bei Menschen, aber auch bei einer Reihe von Tieren, z. B. Katzen, Nagetieren und nichtmenschlichen Primaten, als Auslöser aggressiven Verhaltens. Bei den mehrere Wochen lang chronisch mit Methamphetamin behandelten Mäusen wurde eine höhere Aggressivität und Mobilität als bei der Kontrollgruppe festgestellt. Zum Vergleich der Proteinexpressionsmengen wurde ein käufliches Antikörperarray mit 378 monoklonalen Antikörpern herangezogen, die unter anderem von Bedeutung für die Signaltransduktion und Neurobiologie waren. Nach Entnahme von Hirngewebe aus den Mäusen wurden die Proteine extrahiert, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend auf dem Antikörperarray inkubiert. Die Datenauswertung zeigte eine Herunterregulation von sieben Proteinen und eine Hochregulation von einem Protein. Unter den herunterregulierten befanden sich Erk2, eine Hauptkomponente des MAP-Kinase-Wegs (MAP-Kinase = Mitogen-aktivierte Proteinkinase), und 14-3-3e, ein Inhibitor von Proteinkinase C. Diese Befunde wiesen zusammen mit einem anschließenden Kinase-Screening auf eine Beteiligung des MAP-Kinase-Wegs an der Verhaltensänderung hin, wie dies bereits in anderen Tiermodellen beobachtet wurde. Zwar sind noch weitere Untersuchungen notwendig, diese Ergebnisse demonstrieren aber bereits klar die Anwendbarkeit Mikroarray-basierter Ansätze.

Trotz der Vorteile von Proteinmikroarrays, wie der einfachen und schnellen Hochdurchsatzanalyse Tausender von parallelen Proben, kamen Proteinmikroarrays bei der Wirkstoffsuche bisher nur wenig zum Einsatz. Eine breitere (und möglicherweise standardmäßige) Anwendung wird vermutlich benutzerfreundlichere und robustere Proteinmikroarray-Plattformen erfordern als die derzeit verfügbaren; außerdem werden etablierte und standardisierte Prozeduren zur Datenanalyse und Qualitätskontrolle benötigt. Mit dem Aufkommen modernerer Methoden zur Erstellung von Proteinbiochips zusammen mit immer besser standardisierten Proteinmikroarrayverfahren ist zu erwarten, dass Proteinbiochips eine wachsende Verbreitung bei der Wirkstoffsuche finden werden.<sup>[41]</sup>

## 5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel dieses Kurzaufsatzes war es, den aktuellen Stand bei den Anwendungen der Proteinbiochiptechnik zu beleuchten. Auf vielen verschiedenen Forschungsgebieten ist eine steigende Zahl von Anwendungsbeispielen zu verzeichnen. Es gibt erstaunliche Fortschritte auf Gebieten wie der Biosensorentwicklung oder der Gewebezucht, die zwar nicht direkt

auf Proteinbiochips aufbauen, aber nichtsdestoweniger eine kontrollierte Immobilisierung von Proteinen auf Substraten erfordern.

Biosensoren versprechen eine direkte, empfindliche und schnelle Analyse komplexer Gemische (z.B. medizinischer Proben), die gegenwärtig noch zeit- und materialintensive Techniken wie ELISA nötig macht. Daher könnten Biosensoren die Analyse komplexer Proben im Gesundheitswesen, der Medizin und den Biowissenschaften revolutionieren.<sup>[41]</sup> Mit verschiedenen Ansätzen auf der Grundlage von Nanodrähten, Oberflächenplasmonenresonanz oder Mikrocantilever-Sensoren konnten hier bereits vielversprechende Resultate erzielt werden.<sup>[42,43]</sup> Die Forschungsgruppen von Whitesides<sup>[44]</sup> und Niemeyer<sup>[45]</sup> beschrieben unabhängig voneinander Produktionswege für finanziell erschwingliche Einweg-Biosensorplattformen. Lieber und Mitarbeiter demonstrierten die Verwendung von Nanodraht-Feldeffekttransistoren zur elektrischen Detektion erkrankungstypischer Markerproteine in klinisch relevanten Serumproben. Letztlich könnte dieser Ansatz eine Mustererkennung für bereits vorhandene wie auch für neue Biomarker in der Diagnostik ermöglichen.<sup>[41,46]</sup>

Matrices mit immobilisierten morphogenen Proteinen werden in der Gewebebezugstücherweise als Strukturbasis für Zellen in Knochen-,<sup>[47,48]</sup> Haut-,<sup>[49,50]</sup> Gelenkknorpel-<sup>[51]</sup> und Gefäßgewebe<sup>[52]</sup> sowie bei der Expansion neuronaler Stammzellen<sup>[53]</sup> verwendet. Iwata et al. entwickelten verbesserte Zellkultursubstrate für das selektive Wachstum neuronaler Stammzellen, die künstliche Dimere des epidermalen Wachstumsfaktors präsentieren, eines starken Aktivators der NSC-Proliferation. Ihr Ansatz ergab deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeiten als herkömmliche Methoden.<sup>[54]</sup> Radisic et al. gelang der Zusammenbau von Endothelzellen in einem dreidimensionalen Kollagengerüst, indem sie dieses mit vaskulärem endothelialem Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) funktionalisierten. So konnte gezeigt werden, dass in großen, dreidimensionalen Gewebekonstrukten eine Vaskularisierung, die zur Gewährleistung der Sauerstoffversorgung erforderlich wäre, mithilfe von immobilisiertem VEGF realisierbar ist.<sup>[55]</sup>

Ungeachtet der großen Zahl erfolgreicher Anwendungsbeispiele von Proteinbiochips in der biomedizinischen und biotechnologischen Forschung bleibt noch eine Reihe von Aufgaben zu bewältigen. Derzeit werden die meisten Proteinbiochips nach traditionellen Strategien hergestellt, die eine beliebige Orientierung der Proteine auf der Chipoberfläche zur Folge haben. Eine solch zufällige Ausrichtung kann jedoch durch sterische Hinderung negative Auswirkungen auf die Proteinaktivität oder Ligandenbindung haben, was zu einer Abnahme der Effizienz oder gar zu einer Verfälschung der Ergebnisse des Assays führen könnte.<sup>[34]</sup> Die Lösung dieses Problems liegt möglicherweise in der Weiterentwicklung der Methoden zur Proteinbiochipherstellung, und in den letzten Jahren wurden bereits viele entsprechende Methoden eingeführt.<sup>[4]</sup>

Die Expression und Reinigung Tausender Proteine unter Erhaltung ihrer Aktivität ist äußerst anspruchsvoll.<sup>[34]</sup> Dennoch befindet sich eine steigende Zahl von Methoden für die schnelle Produktion hochwertiger Proteinbiochips im Pro-

teom-Maßstab für einige Organismen in der Entwicklung. Als Beispiel kann die expressionsfertige Voll-Längen-Gensammlung FLEXgene („full-length expression-ready gene collection“) angeführt werden, die aus Sammlungen der kompletten ORF-Plasmide für einige Spezies besteht und der einfachen Klonierung und Expression ganzer Proteome dient.<sup>[56]</sup>

Die Einführung markierungsfreier Detektionsmethoden, wie der Massenspektrometrie und Oberflächenplasmonenresonanz, wird die Analyse von Mikroarrays spürbar vereinfachen, da keine Markierung der Wechselwirkungspartner mehr notwendig ist. Diese Eigenschaft ist vor allem für Biochip-basierte Analysen im großen Maßstab von Bedeutung. Evans-Nguyen et al. immobilisierten Antikörper auf einer superhydrophoben, mit selbstorganisierten Monoschichten modifizierten, porösen Goldoberfläche und inkubierten diese mit einem Plasma, das zuvor mit Peptidantigenen versetzt worden war. Die anschließende Detektion gebundener Peptide erfolgte direkt mit MALDI.<sup>[57]</sup> Ein Übersichtsartikel von Campbell und Kim diskutiert die vielversprechende Anwendung der Oberflächenplasmonenresonanz bei der markierungsfreien Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf Proteinmikroarrays.<sup>[58]</sup>

Die Standardisierung der Produktion, Anwendung und Datenanalyse von Mikroarrays würde die Qualität der mit ihnen gewonnenen Daten erhöhen und sicherstellen. Eine derartige Standardisierung würde anschließende Untersuchungen zur Verifizierung der Resultate des Proteinmikroarray-Screenings durch unabhängige Methoden umfassen.

Angesichts der beeindruckenden Fortschritte der letzten zehn Jahre wird keine dieser Hürden unüberwindbar sein. Wir gehen dementsprechend davon aus, dass die Proteinbiochiptechnik schon sehr bald zu einem Standardwerkzeug der Forschung werden wird, wie es DNA-Mikroarrays bereits heute sind.

*Wir danken Sabine Borgmann für ihre Beiträge zur Rohfassung dieses Manuskripts, sowie Laura Koch für ihre Unterstützung bei einigen der Illustrationen. Wir danken für die zahlreichen Diskussionen mit allen ehemaligen und aktuellen Kollegen sowie für ihre wertvollen Beiträge. Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft, der Technischen Universität Dortmund, dem Fonds der Chemischen Industrie sowie dem Zentrum für Angewandte Chemische Genomik für die finanzielle Unterstützung der Forschung in Dortmund. Pascal Jonkheijm dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium sowie dem Chemierat der niederländischen Wissenschaftsstiftung für einen VENI-Stipendium.*

Eingegangen am 18. März 2009  
Online veröffentlicht am 15. September 2009

- [1] H. J. Lee, A. W. Wark, R. M. Corn, *Analyst* **2008**, *133*, 975–983.
- [2] E. Phizicky, P. I. H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, *422*, 208–215.
- [3] G. C. Terstappen, C. Schlupen, R. Raggiacchi, G. Gaviragli, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 891–903.

- [4] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762–9792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618–9647.
- [5] D. Stoll, M. F. Templin, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Front. Biosci.* **2002**, *7*, c13–c32.
- [6] L. L. Lv, B. C. Liu, *Expert Rev. Proteomics* **2007**, *4*, 505–513.
- [7] D. Stoll, M. F. Templin, J. Bachmann, T. O. Joos, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2005**, *8*, 239–252.
- [8] R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, G. MacBeath, *Nature* **2006**, *439*, 168–174.
- [9] A. Kaushansky, A. Gordus, B. A. Budnik, W. S. Lane, J. Rush, G. MacBeath, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 808–817.
- [10] W. Gong, K. He, M. Covington, S. P. Dinesh-Kumar, M. Snyder, S. L. Harmer, Y.-X. Zhu, X. W. Deng, *Mol. Plant* **2008**, *1*, 27–41.
- [11] N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853–1861.
- [12] G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, J. C. Sanchez, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1104–1115.
- [13] J. O. Lay, S. Borgmann, R. Liyanage, C. L. Wilkins, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 1046–1056.
- [14] C. Wingren, C. A. K. Borrebaeck, *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1*, 355–364.
- [15] C. Wingren, C. A. K. Borrebaeck, *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 813–819.
- [16] S. Hober, M. Uhlén, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 30–35.
- [17] L. A. Liotta, V. Espina, A. I. Mehta, V. Calvert, K. Rosenblatt, D. Geho, P. J. Munson, L. Young, J. Wulfkuhle, E. F. Petricoin, *Cancer Cell* **2003**, *3*, 317–325.
- [18] A. Lueking, D. J. Cahill, S. Mullner, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 789–794.
- [19] B. Spurrier, P. Honkanen, A. Holway, K. Kumamoto, M. Terasima, S. Takenoshita, G. Wakabayashi, J. Austin, S. Nishizuka, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 361–369.
- [20] L. L. Lv, B. C. Liu, *Proteomics Clin. Appl.* **2008**, *2*, 989–996.
- [21] J. Kreutzberger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 383–390.
- [22] H. B. Pollard, M. Srivastava, O. Eidelman, C. Jozwik, S. W. Rothwell, G. P. Mueller, D. M. Jacobowitz, T. Darling, W. B. Guggino, J. Wright, P. L. Zeitlin, C. P. Paweletz, *Proteomics Clin. Appl.* **2007**, *1*, 934–952.
- [23] A. Aguilar-Mahecha, S. Hassan, C. Ferrario, M. Basik, *OMICS* **2006**, *10*, 311–326.
- [24] D. A. Hall, J. Ptacek, M. Snyder, *Mech. Ageing Dev.* **2007**, *128*, 161–167.
- [25] R. Tibes, Y. H. Qiu, Y. Lu, B. Hennessy, M. Andreeff, G. B. Mills, S. M. Kornblau, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2512–2521.
- [26] C. Agaton, M. Uhlén, S. Hober, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1280–1288.
- [27] B. B. Haab, *Proteomics* **2003**, *3*, 2116–2122.
- [28] M. Uhlen, F. Ponten, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 384–393.
- [29] M. Sanchez-Carbayo, N. D. Socci, J. J. Lozano, B. B. Haab, C. Cordon-Cardo, *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 93–103.
- [30] M. E. Hudson, I. Pozdnyakova, K. Haines, G. Mor, M. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17494–17499.
- [31] H. Zhu, S. H. Hu, G. Jona, X. W. Zhu, N. Kreiswirth, B. M. Willey, T. Mazzulli, G. Z. Liu, Q. F. Song, P. Chen, M. Cameron, A. Tyler, J. Wang, J. Wen, W. J. Chen, S. Compton, M. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4011–4016.
- [32] K. S. Anderson, N. Ramachandran, J. Wong, J. V. Raphael, E. Hainsworth, G. Demirkhan, D. Cramer, D. Aronzon, F. S. Hodin, L. Harris, T. Logvinenko, J. LaBaer, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1490–1499.
- [33] H. Zhu, J. Huang, *Drug Discovery Ser.* **2007**, *8*, 261–274.
- [34] L. Seleno, A. Emili, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 46–54.
- [35] J. Huang, H. Zhu, S. J. Haggarty, D. R. Spring, H. Hwang, F. Jin, M. Snyder, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16594–16599.
- [36] M. Uttamchandani, J. Li, H. Sun, S. Q. Yao, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 667–675.
- [37] G. Y. J. Chen, M. Uttamchandani, Q. Zhu, G. Wang, S. Q. Yao, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 336–339.
- [38] D. P. Funeriu, J. Eppinger, L. Denizot, M. Miyake, J. Miyake, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 622–627.
- [39] M. Uttamchandani, K. Liu, R. C. Panicker, S. Q. Yao, *Chem. Commun.* **2007**, 1518–1520.
- [40] B. P. Sokolov, J. L. Cadet, *Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 956–966.
- [41] F. Patolsky, G. Zheng, C. M. Lieber, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1711–1724.
- [42] F. Patolsky, B. P. Timko, G. Zheng, C. M. Lieber, *MRS Bull.* **2007**, *32*, 142–149.
- [43] B. He, T. J. Morrow, C. D. Keating, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 522–528.
- [44] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19606–19611.
- [45] H. Schroeder, M. Adler, K. Gerigk, B. Müller-Chorus, F. Götz, C. M. Niemeyer, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1275–1279.
- [46] G. Zheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, C. M. Lieber, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1294–1301.
- [47] M. R. Rogel, H. Qiu, G. A. Ameer, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4233–4241.
- [48] M. M. Stevens, *Mater. Today* **2008**, *11*, 18–25.
- [49] S. G. Priya, H. Jungvid, A. Kumar, *Tissue Eng., Part B* **2008**, *14*, 105–118.
- [50] S. MacNeil, *Mater. Today* **2008**, *11*, 26–35.
- [51] K. Wescoe, R. Schugar, C. Chu, B. Deasy, *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *52*, 85–102.
- [52] V. Mironov, V. Kasyanov, R. R. Markwald, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 338–344.
- [53] L. Little, K. E. Healy, D. Schaffer, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1787–1796.
- [54] T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 102–110.
- [55] Y. H. Shen, M. S. Shoichet, M. Radisic, *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 477–489.
- [56] L. Brizuela, P. Braun, J. LaBaer, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *118*, 155–165.
- [57] K. M. Evans-Nguyen, S. C. Tao, H. Zhu, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1448–1458.
- [58] C. T. Campbell, G. Kim, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2380–2392.