

- [21] W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2697–2699.
 [22] W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4440–4446.
 [23] P. Franchi, M. Lucarini, G. F. Pedulli, D. Sciotto, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 269–272; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 263–266.
 [24] Y.-S. Byun, O. Vadhat, M. T. Blanda, C. B. Knobler, D. J. Cram, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1825–1827.
 [25] C. Sheu, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8056–8070.
 [26] P. D. Kirchhoff, M. B. Bass, B. A. Hanks, J. M. Briggs, A. Collet, J. A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3237–3246.
 [27] K. N. Houk, K. Nakamura, C. Sheu, A. E. Keating, *Science* **1996**, *273*, 627–629.
 [28] J. Yoon, D. J. Cram, *Chem. Commun.* **1997**, 1505–1506.
 [29] R. C. Helgeson, C. B. Knobler, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3229–3244.
 [30] D. J. Cram, M. T. Blanda, K. Paek, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7765–7773.
 [31] G. Girault-Vexlearschi, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, 577–613.
 [32] J. Rao, I. J. Colton, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9336–9340.
 [33] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* **1997**, *30*, 4966–4972.
 [34] S. Chiu, S. J. Rowan, S. J. Cantrill, P. T. Glink, R. L. Garrell, J. F. Stoddart, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3631–3634.
 [35] M. Ghosh, R. Zhang, R. G. Lawler, C. T. Seto, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 735–741.
 [36] Die Rechnungen wurden in vacuo mit dem Programm HyperChem 6.0, Hypercube Inc., und dem implementierten Kraftfeld MM+ mit dem zugehörigen Parametersatz durchgeführt. Die Anfangsgeometrien der Einschlusskomplexe wurden über eine Konformationssuche mit AM1-berechneten Atomladungen optimiert. In den Moleküldynamikrechnungen wurde der Austritt aus dem optimierten Komplex untersucht, wobei für den Eintrittsprozess eine mikroskopische Reversibilität angenommen wurde. Bei einer konstanten Simulationstemperatur von 398 K, die erforderlich war, um innerhalb einer akzeptablen Simulationszeit die Reaktion zu verfolgen, einer Badrelaxationszeit von 0.1 ps und einer Schrittgröße von 1 fs war der Prozess innerhalb einer Simulationszeit von 2 ps abgeschlossen. Das Ausmaß der Bindung der Ammoniumgruppe durch die Carbonylgruppen am CB6-Rand wird in den Gasphasenberechnungen überschätzt. Allerdings weisen die Bindungskonstanten der Assoziationskomplexe in wässriger Lösung signifikant große Werte auf,^[37] was darauf hindeutet, dass Solvatationseffekte diese Bindung nicht vollständig aufheben.
 [37] R. Hoffmann, W. Knoche, C. Fenn, H. J. Buschmann, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 1507–1511.
 [38] G. W. Liesegang, M. M. Farrow, F. A. Vazquez, N. Purdie, E. M. Eyring, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3240–3243.
 [39] J. Rebek, Jr., S. V. Luis, L. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5011–5012.
 [40] G. Wenz, *Clin. Drug Invest.* **2000**, *19*, 21–25.
 [41] T. Haino, D. M. Rudkevich, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11253–11254.
 [42] SwaN-MR 3.2.0, Menarini Ricerche S.p.A, Florenz (Italien).
 [43] H. Mauser, *Formale Kinetik*, Bertelsmann Universitätsverlag, Düsseldorf, **1974**.

Von Split-Pool-Molekülbibliotheken zu räumlich adressierbaren Mikro-Arrays und deren Einsatz in der funktionellen Proteomik**

Nicolas Winssinger, Jennifer L. Harris,
Bradley J. Backes und Peter G. Schultz*

Zur Untersuchung zellulärer, das gesamte Genom umfassender Vorgänge wurden bereits zahlreiche Verfahren entwickelt. Oligonucleotid-Arrays liefern wichtige Informationen über Änderungen des mRNA-Expressionsniveaus als Antwort auf eine Reihe von physiologischen Stimuli.^[1, 2] Zweidimensionale Gelelektrophorese^[3] sowie andere chromatographische Trennverfahren ermöglichen in Kombination mit der Massenspektrometrie^[4] eine direktere Analyse von Proteom-Funktionen.^[5] Auch zur Genom-umfassenden Analyse von Proteinstrukturen wurden bereits Verfahren entwickelt.^[6] Zielgerichtete Untersuchungen von Protein-Funktionen führten zur Kartierung von Protein-Protein-^[7] und Protein-DNA-Wechselwirkungen^[8] und gelten als Wegbereiter der Entwicklung von Proteinchips.^[9] Methoden, mit denen die katalytische Aktivität von Proteinen eines gesamten Genoms festgestellt werden kann, liefern auch entscheidende Erkenntnisse über zelluläre Aktivitäten.^[10, 11]

Niedermolekulare organische Verbindungen werden bereits seit geraumer Zeit als Agonisten oder Antagonisten von Rezeptoren sowohl zur Analyse und Steuerung der katalytischen Aktivität von Enzymen als auch zur Modulierung biologischer Netzwerke eingesetzt.^[12] Demnach sind Mikro-Arrays mit niedermolekularen Inhibitoren oder Substraten ein Instrument zur Charakterisierung zellulärer Aktivitäten. Um zwischen mehr als 30 000 potentiellen Genprodukten im Menschen unterscheiden zu können, braucht man unbedingt Mikro-Arrays mit einer großen Zahl an Verbindungen. Es wurde bereits von hochdichten Mikro-Arrays mit Peptiden oder nichtnatürlichen Oligomeren berichtet (40 000 Verbindungen pro cm²),^[13] doch ist wegen der angewendeten photolithographischen Techniken die zugängliche molekulare Diversität stark eingeschränkt. Unlängst wurden mehrere niedermolekulare Verbindungen auf eine Glasplatte gedruckt, mit dem Bestreben, automatische Druckvorgänge mit Split-Pool-Molekülbibliotheken zu verbinden.^[14] Das Split-Pool-Verfahren^[15] ist bei der Erzeugung molekularer Diversität viel effizienter als die Parallelsynthese,^[16] jedoch ist bei ihm die Identität jedes Mitglieds der Molekülbibliothek

[*] P. G. Schultz, N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes
Department of Chemistry and
the Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-9440
E-mail: schultz@scripps.edu
und
The Genomics Institute of the Novartis Research Foundation
3115 Merryfield Row, Suite 200, San Diego, CA 92121 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch das Skaggs Institute for Chemical Biology (P.G.S.), das Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (J.L.H. und B.J.B.) und die National Institutes of Health (Stipendium für N.W.) unterstützt. Wir danken Affymetrix für die generöse Spende des GenFlex-Marker-Arrays.

zunächst unbekannt und muss für jedes aktive Mitglied individuell entschlüsselt werden.^[17, 18] Will man solche Bibliotheken gegen mehr als 30000 Genprodukte testen, wird das Entschlüsseln der einzelnen Verbindungen allerdings problematisch.

Wir stellen hier eine Methode zur Herstellung von Mikro-Arrays mit niedermolekularen Verbindungen durch Ortskodierung und ihre Anwendung in der funktionellen Proteomik an einem Modellsystem vor. Abbildung 1 zeigt die Konstruktion von Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen, die

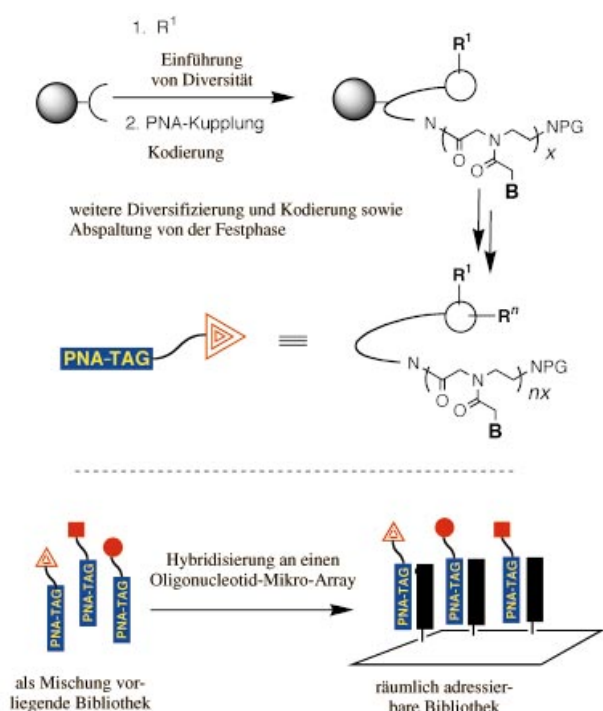


Abbildung 1. Split-Pool-Synthese von PNA-kodierten kombinatorischen Bibliotheken. R^n = Diversitätselemente, **B** = Base der PNA, x = Zahl der für ein bestimmtes Diversitätselement kodierenden Basen, n = Zahl der chemischen Diversifizierungsschritte, PG = Schutzgruppe.

an Peptidnucleinsäure(PNA)-Marker^[19] gebunden sind. Der PNA-Marker erfüllt zwei Aufgaben: Zum einen kodiert er den Ablauf der Synthese der niedermolekularen Verbindung, zum anderen kodiert er ihre Position durch die Hybridisierung mit einem Oligonucleotid-Mikro-Array. Die Wahl fiel auf PNAs als kodierende Oligonucleotide wegen ihrer günstigen Hybridisierungseigenschaften, der Flexibilität ihrer Synthese und ihrer chemischen Robustheit.^[20] Bei dieser Molekülbibliothekssynthese werden die PNAs durch Bildung einer Amidbindung, eine der mildesten Reaktionen in der Organischen Chemie, oligomerisiert. Darüber hinaus sollte dank der Vielzahl an möglichen Schutzgruppen für den N-Terminus der PNAs die Auswahl an Diversität einführenden Reaktionen groß sein. Was die Hybridisierungseigenschaften betrifft, so verstärkt das Fehlen von negativen Ladungen im PNA-Rückgrat deren Affinität für DNA und reduziert den Einfluss der Salzkonzentration auf die Hybridisierungsstärke.

PNA-kodierte Bibliotheken von Protein-Liganden, die unterschiedliche Fluorophore tragen, können für mehrere Zielverbindungen gleichzeitig durchsucht werden. Nach der Hybridisierung des Gemisches mit einem Oligonucleotid-Array lässt sich für jede Zielverbindung die Identität und Selektivität der an sie bindenden Bibliotheksmitglieder durch Fluoreszenzdetektion ermitteln. Diese Strategie ist für die Wirkstoff-Forschung attraktiv, kann aber nicht zur Erstellung eines Profils bei biologischen Proben verwendet werden, da es schwierig ist, alle Proteine in einer solchen Probe gleichmäßig zu markieren. Dagegen kann bei einem Fluorophor-markierten Konjugat aus PNA und niedermolekularer Verbindung nach Inkubation mit der zu untersuchenden Probe das an ein Makromolekül gebundene Konjugat vom ungebundenen Konjugat durch Ausschluss-Chromatographie getrennt werden.^[21] In Abbildung 2 ist schematisch gezeigt, wie die

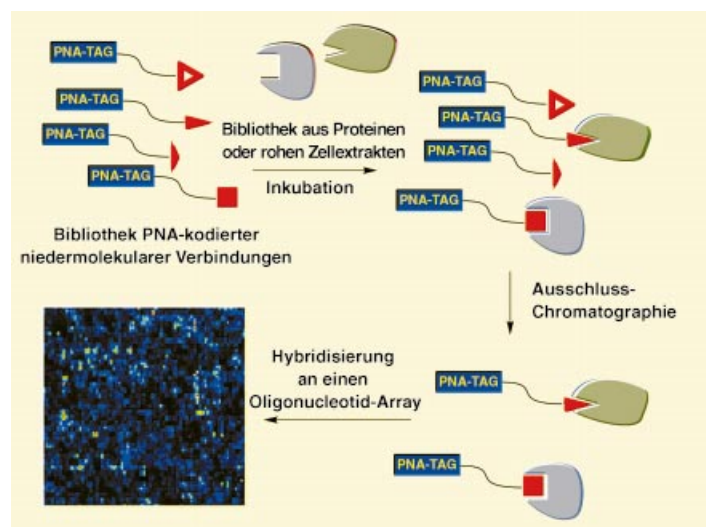
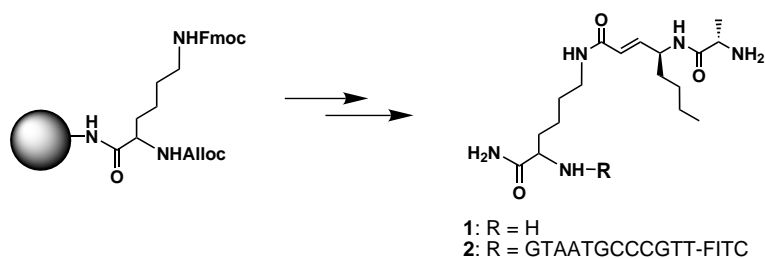


Abbildung 2. Screening einer PNA-kodierten Bibliothek.

Hybridisierung der hochmolekularen Fraktion mit einem Chip die Identität der an die Makromoleküle gebundenen niedermolekularen Verbindungen preisgibt und so ein Profil der Proteinfunktion generiert. Die Korrelation zwischen diesen Profilen und den Phänotypen im biologischen System kann mittels Identifizierung der niedermolekularen Verbindungen rasch ermittelt werden, während die Zielverbindungen durch Affinitäts-Chromatographie bestimmt werden können.

Um die Eignung dieser Methode zu demonstrieren, wurden auf mechanistischen Studien basierende Cystein-Protease-Inhibitoren mit Acrylamid-Funktionalität als Bibliothek der niedermolekularen Verbindungen gewählt.^[22] Untersuchungen zur optimalen PNA-Länge ergaben, dass 12mere gute Hybridisierungseigenschaften haben und eine Vielzahl an Sequenzvariationen zur Kodierung sehr großer Bibliotheken erlauben. Die Synthese wurde an einem säurelabilen Rink-Harz mit den orthogonalen Fmoc- und Alloc-Schutzgruppen für Inhibitor- bzw. PNA-Synthese durchgeführt. Die Seitenketten und Basen wurden säurelabil geschützt (Schema 1).^[23] Das Design der Inhibitoren basierte auf Informationen, die mit einer bereits bekannten Methode zur raschen Beurteilung



Schema 1. Synthese des gezielt entworfenen Cathepsin-L-Inhibitors mit (2) und ohne PNA-Marker (1) an einem Rink-Amidharz. Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Alloc = Allyloxycarbonyl.

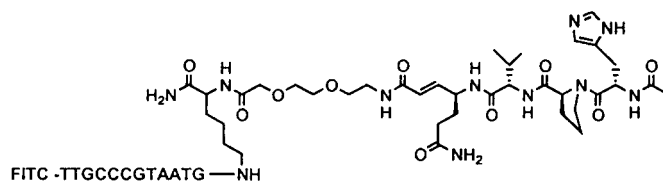
der Substratspezifität von Proteasen erhalten worden waren.^[24] Ein Vergleich der Aktivitäten von **1** und **2** (Schema 1) gegen Cathepsin C und Cathepsin L zeigt, dass der PNA-Marker weder Aktivität noch Selektivität des Inhibitors bezüglich dieser Zielverbindungen signifikant beeinflusst (Tabelle 1). Zusätzlich wurde ein PEG-Spacer in die Bibliothek eingebracht, um eine gute Wasserlöslichkeit der Verbindungen zu garantieren.

Tabelle 1. Kinetische Hemmung von Cathepsinen durch die Acrylamid-Inhibitoren **1** und **2**.

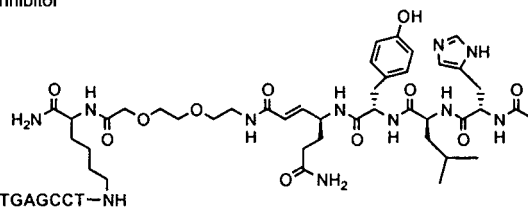
	Cathepsin C		Cathepsin L	
	IC ₅₀ [μM]	k _{inakt} /K _i [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [μM]	k _{inakt} /K _i [M ⁻¹ s ⁻¹]
1	17.6	40	> 2000	–
2	14.1	70	> 2000	–

Anschließend wurde eine Serie von Verbindungen synthetisiert, die zur Hemmung von Cathepsin S, L, H, B, C und Calpain entworfen waren (Schema 2). Die PNA-Sequenzen wurden so gewählt, dass sie mit den terminalen zwölf Einheiten der 20mer-Proben auf einem GenFlex-Marker-Array^[25] (Arrays diesen Typs sind gegenwärtig in einer Dichte von 400 000 Elementen pro cm² erhältlich) hybridisierten. Der PNA-Marker hybridisiert nur mit einem Teil der Array-Probe, und es wurde erwartet, dass jede Probe andere Hybridisierungseigenschaften haben würde. Hybridisierung eines Gemisches der sechs Proben (je 0.45 pmol in 150 μL) resultierte in Platte A in Abbildung 3. Die Intensitätsunterschiede der Array-Merkmale reflektieren die Schmelzpunktunterschiede der Proben. Trotz solcher Schmelzpunktunterschiede konnten Änderungen der Probenkonzentration von 30 % zuverlässig detektiert werden. Eine äquimolare Mischung aus den sechs Verbindungen **3–8** (28 pmol) wurde mit käuflichem, gereinigtem Cathepsin C (100 μM, 20 μL^[26]) 2 h bei 23 °C inkubiert, anschließend auf eine Ausschluss-Chromatographiesäule (BioRad, Bio-Sil, SEC 125-5) gegeben, um das Material unter 10 kDa zu entfernen, und schließlich mit einem GenFlex-Marker-Array hybridisiert. Wie aus Abbildung 3, Platte C ersichtlich, ergab die Hybridisierung das erwartete Signal für die dem Cathepsin C entsprechende Probe, während die Kontrolle ohne Cathepsin C kein Signal lieferte (Platte B). Dasselbe Experiment wurde mit Cathepsin L (10 μM, 20 μL^[26]) durchgeführt, wobei zehnmal weniger Protein verwendet wurde.

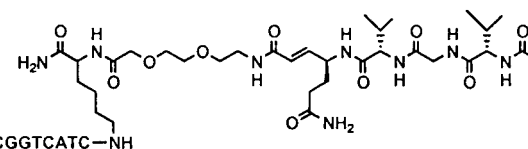
Die direkte Detektion des Fluoresceins lieferte nur ein schwaches Signal, doch konnte dieses durch die Bindung eines Anti-Fluorescein-Antikörpers aus Ziege, eines biotinylierten Anti-Ziege-Antikörpers und von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin verstärkt werden (Abbildung 3, Platte D). Diese Resultate belegen, dass die vorgeschlagene Trennung nach Teilchengröße effektiv die gebundenen PNA-Ligand-Konjugate von den ungebundenen trennt, dass PNAs effizient zur Positionsmarkierung eingesetzt werden können und dass Konjugate aus PNAs und niedermolekularen Verbindungen in einem Mikro-Array-Format zur Erforschung von Proteinfunktionen genutzt werden können.



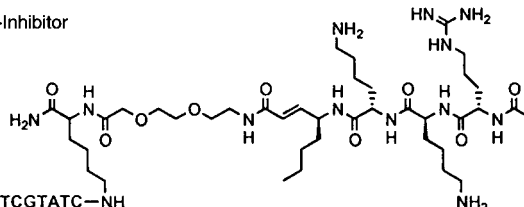
3: Cathepsin-S-Inhibitor



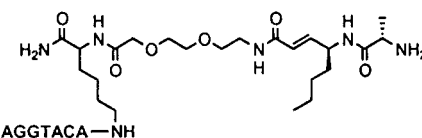
4: Cathepsin-L-Inhibitor



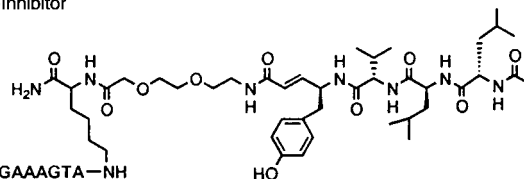
5: Cathepsin-H-Inhibitor



6: Cathepsin-B-Inhibitor



7: Cathepsin-C-Inhibitor



8: Calpain-Inhibitor

Schema 2. Chemische Struktur der gezielt entworfenen, PNA-Marker tragenden Cystein-Protease-Inhibitoren **3–8**. FITC = Fluorescein.

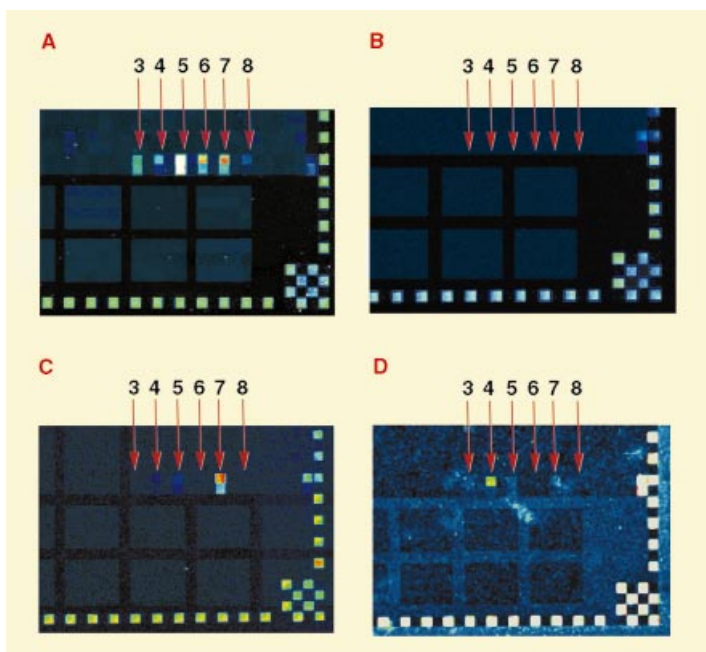


Abbildung 3. Hybridisierung der Proben 3–8. A) Hybridisierung von 0,45 pmol (3,0 nM) einer jeden Probe; B) Kontrolle: Inkubation von 3–8 (1,4 µM, 20 µL) 2 h bei pH 5,5;^[26] Ausschluss-Chromatographie, Hybridisierung; C) Inkubation von 3–8 (1,4 µM) mit Cathepsin C (100 µM, 20 µL) 2 h bei pH 5,5;^[26] Ausschluss-Chromatographie, Hybridisierung; D) Inkubation von 3–8 (1,4 µM) mit Cathepsin L (10 µM, 20 µL) 2 h bei pH 5,5;^[26] Ausschluss-Chromatographie, Hybridisierung.

Cathepsine sollen bei vielen physiologischen und pathologischen Funktionen, einschließlich Antigen-Präsentation,^[27] Tumorentwicklung,^[28] Osteoporose,^[29] grauer Star^[30] und Virulenz von Parasiten,^[31] eine bedeutende Rolle spielen. Eine auf dem hier beschriebenen Weg hergestellte Bibliothek erlaubt nicht nur die Identifizierung von spezifischen Cathepsin-Inhibitoren, sondern ermöglicht auch eine rasche diagnostische Identifizierung spezifischer Cathepsin-Aktivitäten und neuartiger Proteasen in biologischen Proben. Die Fähigkeit, Split-Pool-Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen in einem räumlich adressierbaren Format anzuordnen, ermöglicht ein gebündeltes Screening in einem hoch miniaturisierten Format, das Profile zellulärer Aktivität liefert. Dieser Ansatz sollte auch auf andere Klassen von Proteasen, Kinasen und Phosphatasen sowie auf Rezeptoren anwendbar sein. Das Screening großer Bibliotheken als Gemisch in Lösung vor der Hybridisierung kann sich als nützlich erweisen, da nichtspezifische Wechselwirkungen von Oberflächen mit den Zielverbindungen minimiert werden. Schließlich könnte dieses Verfahren eine generelle und praktische Lösung sein, um Mikro-Arrays mit anderen Biomolekülen einschließlich Antikörpern und anderen Proteinen herzustellen und zu testen.

Eingegangen am 10. Mai 2001 [Z17078]

- [1] a) D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E. L. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1675; b) J. L. DeRisi, V. R. Lyer, P. O. Brown, *Science* **1997**, *278*, 680.
[2] D. J. Lockhart, E. A. Winzler, *Nature* **2000**, *405*, 827.

- [3] N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853.
[4] D. Figeys, A. Ducret, J. R. Yates III, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *11*, 1544.
[5] a) G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, J. C. Sanchez, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1104; b) S. P. Gygi, G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, R. Aebersold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9390.
[6] a) E. Abola, P. Kuhn, T. Earnest, R. C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 973; b) R. C. Stevens, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 558.
[7] P. Uetz, L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson, J. R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, J. M. Rothberg, *Nature* **2000**, *403*, 623.
[8] V. R. Iyer, C. E. Horak, C. S. Scafe, D. Botstein, M. Snyder, P. O. Brown, *Nature* **2001**, *409*, 533.
[9] a) H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 283; b) P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 123; c) G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 2760.
[10] a) P. Goulet, *J. Gen. Microbiol.* **1975**, *87*, 97; b) C. M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 560; c) A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodward, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 400; d) Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694; e) D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, A. Burlingame, M. Bogoy, *Chem. Biol.* **2000**, *8*, 569.
[11] a) D. W. Nicholson, A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, N. A. Munday, S. M. Raju, M. E. Smulson, T.-T. Yamin, V. L. Yu, D. K. Miller, *Nature* **1995**, *376*, 37; b) B. J. Backes, J. L. Harris, F. Leonetti, C. S. Craik, J. A. Ellman, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 187; c) T. Nazif, M. Bogoy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2967.
[12] a) N. S. Gray, L. Wodicka, A.-M. W. H. Thunnissen, T. C. Norman, S. Kwon, F. H. Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.-H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Science* **1998**, *281*, 533; b) D. T. Hung, T. F. Jamison, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 623.
[13] a) S. P. A. Fodor, R. J. Leighton, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767; b) C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephens, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *261*, 1303.
[14] a) G. MacBeath, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967; b) P. J. Hergenrother, K. M. Deprew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7849.
[15] a) Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Highlights of Modern Biochemistry, Proceedings of the 14th International Congress of Biochemistry* (Prag, Tschechien, 1988), VSP, Utrecht, **1988**, S. 47; b) Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487; c) S. E. Lam, E. Salmon, M. Hersch, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82; d) R. A. Houghton, P. Clemencia, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84.
[16] In einer Split-Pool-Bibliothek ist die Zahl der Endprodukte exponentiell, in einer durch Parallelsynthese erhaltenen linear abhängig von der Zahl der Diversität erzeugenden Reaktionen.
[17] a) S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381; b) M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10700.
[18] a) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922; b) K. C. Nicolaou, X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyey, M. P. Nova, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2476; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2289.
[19] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
[20] PNAs sind beispielsweise mit 95-proz. TFA kompatibel, wie sie in zahlreichen Spaltungen eingesetzt wird.
[21] Es ist wichtig, dass die Dissoziation des Komplexes aus niedermolekularer Verbindung und Zielverbindung langsam ist im Vergleich zur Dauer der Ausschluss-Chromatographie.

- [22] a) J. S. Kong, S. Venkatraman, K. Furness, S. Nimkar, T. A. Shepherd, Q. M. Wang, J. Aube, R. P. Hanzlik, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2579; b) T. J. Caulfield, S. Patel, J. M. Salvino, L. Liester, R. Labaudiniere, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 600; c) C. Walsh, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 871.
- [23] Alle synthetisierten Verbindungen hatten zufriedenstellende analytische und funktionelle Charakteristika.
- [24] J. L. Harris, B. J. Backes, F. Leonetti, S. Mahrus, J. A. Ellman, C. S. Craik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7754.
- [25] http://www.affymetrix.com/products/gc_genflex.html. Die Sequenzen der Proben auf dem Chip sind von Affymetrix erhältlich.
- [26] Puffer: 100 mM NaOAc, pH 5.5; 100 mM NaCl; 1.0 mM EDTA, 0.01 % Brij-35; 2.0 mM DTT.
- [27] R. J. Riese, P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, H. A. Chapman, *Immunity* **1996**, *4*, 357.
- [28] I. M. Berquin, B. F. Sloane, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *389*, 281.
- [29] M. J. Bossard, T. A. Tomaszek, S. K. Thompson, B. Y. Amegadzie, C. R. Hanning, C. Jones, J. T. Kurdyla, D. E. McNulty, F. H. Drake, M. Gowen, M. A. Levy, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12517.
- [30] T. R. Shearer, M. Azuma, L. L. David, T. Murachi, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1991**, *32*, 533.
- [31] J. H. McKerrow, E. Sun, P. J. Rosenthal, J. Bouvier, *Annu. Rev. Microbiol.* **1993**, *47*, 821.

Kombinatorische Entdeckung neuer Photokatalysatoren zur Wasseraufbereitung mit sichtbarem Licht**

Christian Lettmann, Heike Hinrichs und Wilhelm F. Maier*

Der photokatalysierte Abbau von Schadstoffen in Luft und Wasser gehört zu den vielversprechendsten umweltfreundlichen Verfahren. Die Bestrahlung eines Halbleiteroxids (HLO) mit Licht, dessen Energie gleich oder größer der Bandlückenenergie des HLO ist, führt zur Bildung von Elektronen-Loch-Paaren, welche nachfolgend Redoxreaktionen an der HLO-Oberfläche initiieren. Diese heterogene Photokatalyse stellt eine umweltfreundliche und viel versprechende Methode zur Entgiftung von Wasser und Luft mit Tageslicht dar. Organische Schadstoffe werden zu CO₂, H₂O und Mineralsäuren umgewandelt. In neueren Übersichtsartikeln werden die diesem Prozess zu Grunde liegenden Mechanismen sowie der aktuelle Stand der Forschung zusammengefasst.^[1, 2] Seit vielen Jahren konzentriert sich die Forschung auf TiO₂, vorzugsweise Anatas, welches photostabil, nicht toxisch, preiswert und aktiv ist. Aufgrund seiner großen Bandlücke von 3.2 eV ist aber UV-Licht ($\lambda < 400$ nm) zur Erzeugung der Elektronen-Loch-Paare notwendig. Dies ist

ein großer Nachteil für eine effiziente, solar getriebene Wasserentgiftung, denn nur 3 % des Sonnenlichts liegt bei Wellenlängen < 400 nm.

Kürzlich entdeckten wir, dass in Sol-Gel-basiertem TiO₂ eine Reihe von Dotierungssubstanzen, wie Pt, Ir und sogar während der Calcinierung gebildete Kohlenstoffreste, zu einer photokatalytischen Aktivität mit sichtbarem Licht führen.^[3, 6, 7, 12] Diese Entdeckungen überzeugten uns, dass es möglicherweise mehr photokatalytisch aktive Materialien als derzeit bekannt gibt. Daher entwickelten wir ein kombinatorisches Hochdurchsatzverfahren, um effektiver nach viel versprechenden Materialien mit neuen Zusammensetzungen zu suchen. In den vergangenen Jahren wurde das enorme Potential kombinatorischer Ansätze und Hochdurchsatzmethoden in der Material- und Katalysatorentwicklung bereits vielfach aufgezeigt.^[4] Trotzdem gibt es bis heute nur wenige Beispiele dafür, dass entsprechende Methoden zu neuen, verbesserten Materialien geführt haben.

Das Ziel unserer Arbeit war die Entwicklung eines zuverlässigen Hochdurchsatzverfahrens zur effizienteren Entdeckung neuer Photokatalysatoren, die in der Lage sind, mit sichtbarem Licht ($\lambda > 400$ nm) Schadstoffe photokatalytisch abzubauen. Aufgrund der bereits bekannten photokatalytischen Eigenschaften von dotierten Titanoxiden wurden diese als Referenzmaterialien in der Entwicklung des Verfahrens ausgewählt. Über die photokatalytischen Eigenschaften von dotiertem WO₃ und SnO₂ mit sichtbarem Licht ist nahezu nichts bekannt. Diese Oxide bilden daher die Basis der Bibliotheken.

Das gewählte Bibliotheks-Design bestand aus 45 transparenten HPLC-Fläschchen (2 mL), die in einem adressierbaren Block in neun Reihen und fünf Spalten angeordnet waren (Abbildung 1, C). Die potentiellen Katalysatoren wurden direkt in den HPLC-Fläschchen mit Hilfe eines Syntheseroboters (Tecan Miniprep 50) synthetisiert. Grund-

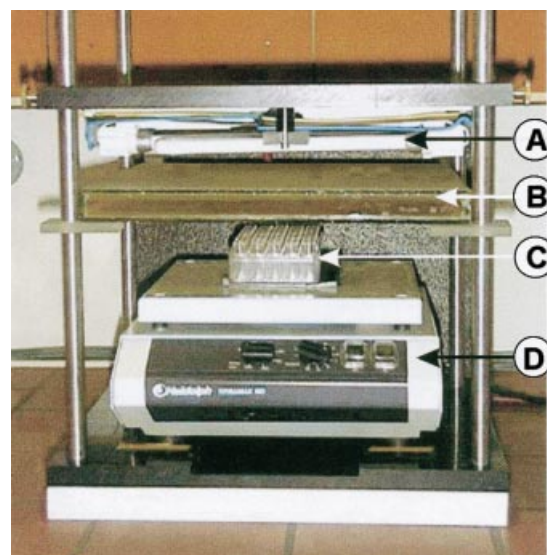


Abbildung 1. Vorderansicht der experimentellen Anordnung für die Bestrahlung der Bibliotheken mit sichtbarem Licht. A) Anordnung der Lampen (Osram Dulux SG23, 11 W); B) Küvette aus Milchglas, gefüllt mit 1 M K₂CrO₄-Lösung; C) Bibliothek, 45 HPLC-Fläschchen, angeordnet in fünf Spalten und neun Reihen; D) Orbitalschüttler (Heidolph Titramax 100).

[*] Prof. Dr. W. F. Maier
Technische Chemie
Universität des Saarlandes
66123 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-2343
E-mail: w.f.maier@mx.uni-saarland.de

Dr. C. Lettmann, H. Hinrichs
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. Horst Kisch, Universität Erlangen-Nürnberg, für hilfreiche Diskussionen und wertvolle Hinweise.