

- stein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-56044, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.
- [11] N. Walker, D. Stuart, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1983**, 39, 158–166.
- [12] R. C. Haushalter, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 412–413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 432–433.
- [13] M. G. Kanatzidis, S.-P. Huang, *Phosphorous Sulfur Silicon Relat. Elem.*, im Druck.
- [14] G. Marbach, J. Strähle, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 695–696; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 715–716.
- [15] P. Betz, B. Krebs, G. Henkel, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 293–294; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 311–312.
- [16] a) P. K. Mehrotra, R. Hoffmann, *Inorg. Chem.* **1978**, 17, 2187–2189; b) K. M. Merz, R. Hoffmann, *ibid.* **1988**, 27, 2120–2127.
- [17] J.-F. You, B. S. Snyder, G. C. Papaefthymiou, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6589–6591.
- [18] J. F. You, B. S. Snyder, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6589–6591.

Photolithographische Immobilisierung von Biopolymeren auf festen Trägern**

Von Lawrence F. Rozsnyai, David R. Benson, Stephen P. A. Fodor* und Peter G. Schultz*

Biomoleküle auf festen Trägern räumlich definiert (mit hoher Auflösung) immobilisieren zu können würde viele Anwendungen ermöglichen: von der Kraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy (AFM))^[1] bis hin zur Erzeugung von strukturierten Rezeptortableaus für Biosensoren und parallel durchführbaren Ligandenbindungs-Assays^[2]. Die Photolithographie dient in großem Umfang zum Aufbau elektrischer Schaltkreise; neuerdings wurde diese Technik auch zur räumlich definierten Synthese von Peptiden und Oligonucleotiden genutzt^[3]. Hier berichten wir über die Verwendung photolithographischer Techniken, um Biomoleküle räumlich definiert kovalent an eine funktionalisierte Glasoberfläche zu binden. Antikörper wurden schachbrettartig an eine Benzophenon-derivatisierte 500 × 500 µm²-Glasoberfläche gekuppelt und anschließend durch Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

Benzophenon wurde wegen seiner chemischen Stabilität, seines relativ kurzwelligen Absorptionsmaximums ($\lambda_{\max} \approx 350$ nm) und seiner hohen Effizienz als Kupplungsreagens gewählt^[4, 5]. Darüber hinaus reagiert Benzophenon aus dem n,π*-Triplettzustand mit den verschiedenartigsten C-H-Bindungen und sollte daher zur Immobilisierung vieler unterschiedlicher Biomoleküle mit einem breiten Spektrum an funktionellen Gruppen (inklusive Proteine und Nucleinsäuren) geeignet sein^[5]. Die Glasoberflächen wurden zuerst mit *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-geschütztem 3-Aminopropyltriethoxysilan derivatisiert; dann wurden die Schutzgruppen mit 50proz. Trifluoressigsäure/CH₂Cl₂ entfernt. Das Glassubstrat wurde anschließend mit Ethyldiisopropylamin/CH₂Cl₂, Dimethylformamid (DMF), CH₂Cl₂ und EtOH gewaschen^[3]. Der *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-ester^[6] von 3-Benzoylbenzoesäure (100 mM in DMF) wurde danach an die Aminopropylgruppen auf dem Glassubstrat gekuppelt

(Abb. 1). Das derivatisierte Substrat wurde mit DMF, CH₂Cl₂ und EtOH gewaschen, und freie NH₂-Gruppen wurden durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid/Dimethylaminopyridin maskiert. Die Ausbeute des Kupplungsschrittes für Benzoylbenzoesäure wurde auf ca. 80% geschätzt^[7].

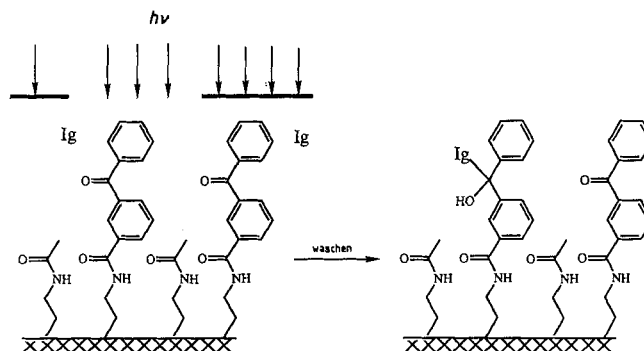


Abb. 1. Prinzip der lichtgesteuerten, räumlich definierten Immobilisierung des Proteins Ig auf einem festen Träger.

Um festzustellen, ob nun Biomoleküle räumlich definiert immobilisiert werden konnten, versuchten wir, ein 500 × 500 µm²-Schachbrettmuster von photoimmobilisierten Immunoglobulin(Ig)-Molekülen zu erzeugen. Eine 5 µm Lösung von Kaninchen-IgG Ig-1 (in 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 (PBS-Puffer) und 0.05% Tween 20) wurde auf die Benzophenon-derivatisierte Oberfläche aufgetragen, und dann wurde durch eine 500 × 500 µm²-schachbrettartige Maske bestrahlt (Abb. 1)^[3]. Nach 30 min Belichtung mit einer Hochdruck-Quecksilberbogenlampe (12 mWcm⁻²) bei 300–400 nm wurde die Oberfläche mit PBS-Puffer unter Zusatz von 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 0.05% Tween gewaschen. Photoimmobilisiertes Ig-1 wurde durch Inkubation des Glassubstrates mit fluoreszenzmarkiertem, aus Ziegen gewonnenem Anti-Kaninchen-IgG Ig-2 markiert. Die fluoreszierenden Regionen wurden im Epifluoreszenz-Mikroskop ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm; $\lambda_{\text{em}} > 520$ nm) detektiert^[8].

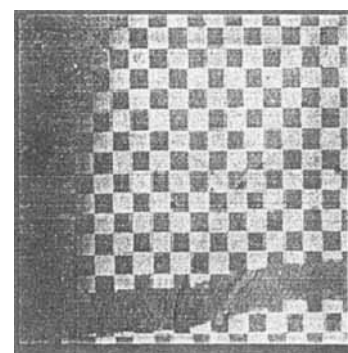


Abb. 2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach räumlich definierter Kupplung und Fluoreszenzmarkierungen. Helle Bereiche entsprechen einer höheren Fluoreszenzintensität.

Das fluoreszierende Schachbrettmuster (Abb. 2) zeigt, daß die Antikörper Ig-1 durch eine räumlich begrenzte photochemische Kupplungsreaktion in bestimmten Regionen kovalent an den Träger gebunden sind. Nicht belichtete Regionen des Schachbrettmusters sind dunkel, belichtete Regionen sind wegen des fluoreszierenden Ig-2 · Ig-1-Komple-

[*] Dr. S. P. A. Fodor
Affymax Research Institute
4001 Miranda Ave., Palo Alto, CA 94304 (USA)
Prof. P. G. Schultz, L. F. Rozsnyai, D. R. Benson
Department of Chemistry, University of California
Berkeley, CA 94720 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch den Direktor des Office of Energy Research, Office of Basic Energy Sciences, die Division of Material Sciences sowie die Division of Energy Biosciences des U.S. Department of Energy (DE-AC03-76SF00098) gefördert. Wir danken Suzanne Gruber und Steven Sundberg für ihre Hilfe.

xes hell. Ein photochemisches Kupplungsexperiment unter gleichen Bedingungen, bei dem allerdings eine acetylierte Glasoberfläche ohne Benzophenon eingesetzt wurde, lieferte kein Schachbrettmuster, und die Fluoreszenzintensitäten entsprachen denen des nicht derivatisierten Substrates. Diese Experimente zeigen, daß die lichtgesteuerte Immobilisierung von Proteinen über eine photochemische Reaktion mit Benzophenon stattfindet.

Ein quantitativer Vergleich der Fluoreszenzintensität des schachbrettartigen Glassubstrates mit standardisierten Fluoreszenz-Perlen (Fluöcytometrie-Standards) ergibt eine ungefähre Dichte von einem gekuppelten Antikörper pro 5000 nm². Zum Vergleich: Der durchschnittliche Abstand der beiden Enden der Fab-Arme des Antikörpers beträgt ca. 200 Å^[9]. Der Kontrast des fluoreszierenden Schachbrettmusters ist hier 5:1 (nach Abzug der Restfluoreszenz des derivatisierten Substrates, welches nicht mit Ig-1 oder Ig-2 behandelt wurde) und entspricht dem Verhältnis von kovalent gebundenem Antikörper (Ig-1) zu nicht kovalent gebundenem Antikörper (Ig-1 und/oder Ig-2). In anderen Fällen wurde jedoch ein geringerer Kontrast erhalten, was vermutlich auf ein unspezifisches Binden des Antikörpers zurückzuführen ist^[10], welches wahrscheinlich mit der Art des Biomoleküls und der Detektionsmethode im jeweiligen Experiment variiert.

Wir haben gezeigt, daß Proteine durch Photoaffinitätsmarkierungen und Photolithographie auf Oberflächen räumlich definiert immobilisiert werden können. Diese Methode sollte generell auf eine große Zahl von Biopolymeren mit verschiedenartigen funktionellen Gruppen anwendbar sein. Ein wichtiger nächster Schritt ist die Entwicklung von verbesserten ortsspezifischen photoaktiven und photoaktivierbaren („caged“) Kupplungsreagentien^[11]. Darüber hinaus sollte es möglich sein, räumlich definierte Anordnungen von Biomolekülen zu erzeugen, die bei der Entwicklung neuartiger Biosensoren oder Ligandenbindungs-Assays eingesetzt werden können.

Eingegangen am 19. Dezember 1991 [Z 5083]

- [1] P. K. Hansma, V. B. Elings, O. Marti, C. E. Bracker, *Science* **1988**, *242*, 209.
- [2] C. R. Lowe, *Biosensors* **1985**, *1*, 3.
- [3] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 768. Siehe auch G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 839; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 882.
- [4] a) J. T. Kauer, S. Erickson-Vitanen, H. R. Wolfe, W. F. De Grado, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10695; b) W. T. Miller, E. T. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5429; c) T. Tao, C. J. Scheiner, M. Lamkin, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7633.
- [5] a) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 170; b) C. Helenc, *Photochem. Photobiol.* **1972**, *16*, 519.
- [6] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Gallahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839.
- [7] Ein Ausschnitt der mit Nitroveratryloxycarbonyl(NVOC)-geschützten Aminogruppen der Glasoberfläche wurde durch Belichtung deblockiert [3] und anschließend mit dem NHS-Ester der 3-Benzoylbenzoesäure derivatisiert. Eine zweite Region des Glassubstrates wurde in analoger Weise deblockiert und anschließend mit dem NHS-Ester von Biotin derivatisiert. Nicht umgesetzte NH₂-Gruppen der ersten Region (wegen unvollständiger Kupplung des Benzophenons) reagieren ebenfalls mit dem Biotin-NHS-Ester. Die gesamte Oberfläche wurde anschließend mit Fluorescein-Streptavidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR (USA)) behandelt. Die Kupplungseffizienz für Benzophenon wurde durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der beiden Regionen bestimmt.
- [8] Zeiss-Axioskop 20, 488 nm-Anregung durch einen Argon-Ionen-Laser, Spectra-Physics Modell 2025. Die Fluoreszenzemission oberhalb 520 nm wurde über einen gekühlten Photomultiplier (Hamamatsu-943-02) detektiert.
- [9] I. Pilz, E. Schwarz, W. Palm, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *75*, 195.
- [10] Ob ein acetylierter oder nicht-acetylierter Träger verwendet wurde, hatte keinen entscheidenden Einfluß auf die unspezifische Bindung von Antikörpern.
- [11] Ein photoaktivierbares („caged“) Biotin-Analogon wurde kürzlich beschrieben: S. Sundberg, R. Barrett, C. Holmes, *Biophys. J.* **1992**, *61*, A 171.

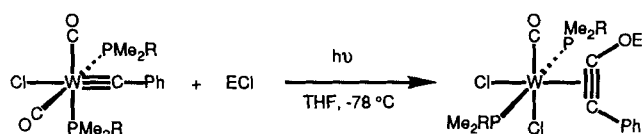
Photoinduzierte Alkylidin-Carbonyl-Kupplungsreaktionen unter Beteiligung eines Elektrophils**

Von Andreas Mayr*, Cecilia M. Bastos, Richard T. Chang, John X. Haberman, Katrina S. Robinson und Deirdre A. Belle-Oudry

Professor Wolfgang Beck zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Kupplung von Alkylidin- und Carbonylliganden kann auf unterschiedliche Weise induziert werden^[1]. In den meisten Fällen, einschließlich des ersten durch Kreissl et al. untersuchten Beispiels^[2], wird die Alkylidin-Carbonyl-Kupplung durch Angriff eines starken Nucleophils am Metallzentrum eingeleitet. Es gibt auch Hinweise, daß die Kupplung von Alkylidin- und Carbonylliganden durch Elektrophile induziert werden kann. So haben Schrock et al.^[3] berichtet, daß die Reaktion von [W(CH)₃Cl(PMe₃)₄] mit CO in Gegenwart von Aluminiumreagentien wie (AlCl₃)₂ zur Bildung von [W(η²-HCCOAlCl₃)Cl(CO)(PMe₃)₃] führt. Lippard et al.^[4] erhielten Disiloxyalkinliganden durch Reaktion des Siloxymethylidinkomplexes [Ta{COSi(iPr)₃}(CO)(dmpe)₂] [dmpe = Bis(dimethylphosphinoethan)] mit Silylierungsreagentien. Ähnliche Alkinliganden des Typs RCOE (E = Elektrophil) sind auch leicht durch Addition von Elektrophilen an η²-Ketenylliganden zugänglich, die durch Nucleophil-induzierte Alkylidin-Carbonyl-Kupplung erhalten wurden^[5]. Geoffroy et al.^[6] zeigten, daß Ketenylkomplexe auch durch Bestrahlen von Alkylidin-Carbonyl-Komplexen mit Licht in Gegenwart von Nucleophilen entstehen können. Es wurde vorgeschlagen, daß die Rolle des Nucleophils darin besteht, photochemisch erzeugte Ketenylmetallkomplexe abzufangen. Die Möglichkeit, daß Alkylidin-Carbonyl-Kupplungen von Elektrophilen induziert werden, und die nachgewiesene Reaktivität von η²-Ketenylliganden gegenüber Elektrophilen legen es nahe, daß Elektrophile auch an photoinduzierten Kupplungsprozessen beteiligt sein könnten. Diese Arbeit beschreibt das erfolgreiche Abfangen von photochemisch erzeugten Ketenylliganden durch elektrophile Reagentien.

Durch Bestrahlen der Alkylidinkomplexe *cis*-**1a,b** mit sichtbarem Licht in Gegenwart von Elektrophilen ECl erhält man die Alkin Komplexe *trans*-**2a-c**^[7,8]. Somit erfolgt bei den Umsetzungen eine photochemische *cis-trans*-Isomerisierung der Komplexe **1**^[9]. Dieselben Ergebnisse werden erzielt, setzt man die *trans*-Isomere der Komplexe **1** als Ausgangsverbindungen ein. Ohne Bestrahlung, aber unter



1a: R = Me
1b: R = Ph

2a: R = Me, E = H
2b: R = Me, E = C(O)CMe₃
2c: R = Me, E = C(O)C₆H₄-4-OMe
2d: R = Ph, E = C(O)CMe₃
2e: R = Me, E = Si(CMe₃)₂Ph

[*] Prof. A. Mayr, Dr. C. M. Bastos, R. T. Chang, J. X. Haberman, K. S. Robinson, D. A. Belle-Oudry
Department of Chemistry
State University of New York at Stony Brook
Stony Brook, NY 11794-3400 (USA)

[**] Wir danken John D. Franolic, Raju Subramanian und Prof. Stephen A. Koch für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen. Diese Arbeit wurde vom Petroleum Research Fund, verwaltet durch die American Chemical Society, und von der National Science Foundation gefördert.