

Elektrochemische Herstellung von adressierbaren Bibliotheken als Plattform für biologische Assays**

Jun-ichi Yoshida* und Aiichiro Nagaki

Adressierbare Bibliotheken · Diblock-Copolymere ·

Elektrochemie · Kreuzkupplungen ·

Mikroelektroden-Arrays

Seit ihrer Entdeckung im 19. Jahrhundert gilt die Kolbe-Elektrolyse als leistungsfähige und umweltfreundliche Methode, um organische Verbindungen im Labor- und Industriemaßstab herzustellen.^[1,2] Neue Strategien und Techniken, die für die organische Elektrochemie entwickelt wurden, nützen nicht nur der konventionellen Synthese, sondern dienen auch der Erzeugung von Molekülvorfalt.^[3]

Ein neuer Aspekt wurde in die organische Elektrochemie durch die jüngste Entwicklung von Mikroelektroden-Arrays eingeführt. Mikroarrays haben für viele biologische Assays ein hohes Potenzial,^[4] denn sie ermöglichen die Herstellung von umfangreichen Bibliotheken möglicher Liganden auf winzigen Flächen. Mit diesen Bibliotheken können dann komplexe Proteinmischungen systematisch auf bestimmte Eigenschaften hin untersucht werden.^[5] Ein großer Vorteil der Mikroelektroden-Arrays ist, dass jede Elektrode einzeln adressierbar ist und sie somit genutzt werden können, um spezifische Objekte aus einer Molekülbibliothek zu überwachen. Mikroelektroden-Arrays bieten zudem die Möglichkeit, markierungsfrei und direkt die Wechselwirkung von kleinen Molekülen mit Proteinen zu beobachten. Um Mikroelektroden-Arrays zu funktionalisieren, werden zunächst die Molekülbibliotheken mithilfe von Ankermolekülen auf der Elektrodoberfläche immobilisiert.^[6] Dazu müssen allerdings Werkzeuge vorhanden sein, um die Moleküle ortsspezifisch einzubauen und platzieren zu können.^[7-9] Eine Möglichkeit, das zu erreichen, sind chemische Reaktionen, die unter Beteiligung der Elektroden selbst ablaufen.

Der Arbeitsgruppe von Moeller gelangen einige wichtige Durchbrüche, um adressierbare Bibliotheken auf Mikroelektroden-Arrays als Plattform für biologische Assays herzustellen (Abbildung 1). So beschrieben sie 2004 den Aufbau einer Molekülbibliothek durch Kombination von Elektrochemie und Pd-Chemie.^[10] Das Array wurde mit einer

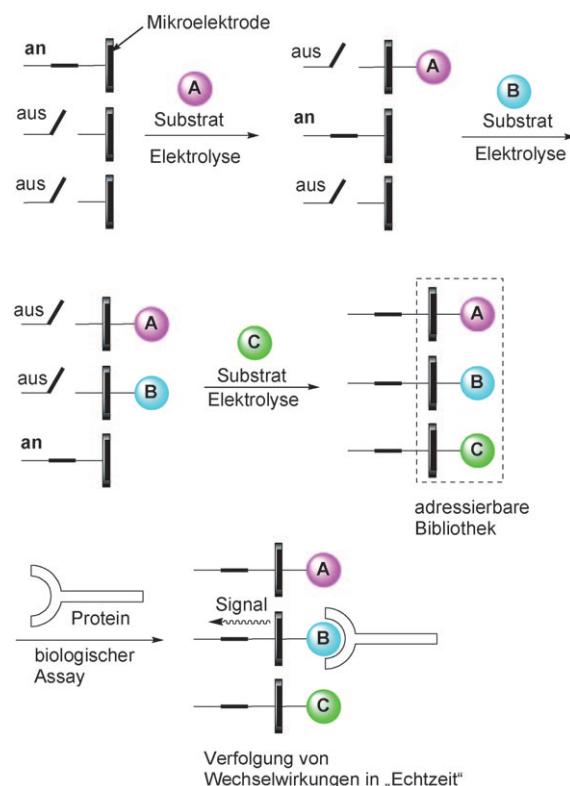


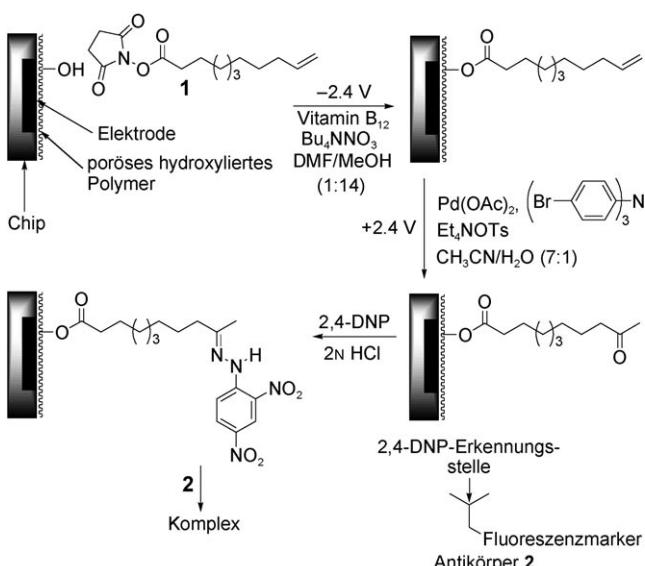
Abbildung 1. Herstellung einer adressierbaren Molekülbibliothek auf Mikroelektroden-Arrays und die elektrochemische Beobachtung der Wechselwirkung mit einem Protein.

Membran aus porösem hydroxyliertem Polymer beschichtet und anschließend mit dem Ester **1** von 10-Undecensäure behandelt (Schema 1). Die Konzentration des Substrats an den Elektroden auf dem Chip gelang durch eine basenkatalysierte und elektrodenvermittelte Reaktion. Die Base wurde durch die Reduktion von gelöstem Vitamin B₁₂ an den Elektroden gewonnen. An ausgewählten Elektroden wurde in 300 Zyklen von 0.5 s Dauer und 0.1 s Pause jeweils eine Potentialdifferenz von -2.4 V relativ zur Pt-Gegenelektrode angelegt. Um nach der Kupplungsreaktion die an der Chipoberfläche verbliebenen freien Hydroxygruppen abzusättigen, wurde der Chip unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit Essig-säureanhydrid versetzt.

[*] Prof. J. Yoshida, Dr. A. Nagaki

Department of Synthetic and Biological Chemistry
Graduate School of Engineering, Kyoto University
Nishikyo-ku, Kyoto, 615-8510 (Japan)
Fax: (+81) 75-383-2727
E-Mail: yoshida@sbchem.kyoto-u.ac.jp
Homepage: http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/yoshida-lab/index_e.html

[**] J.Y. dankt für einen Grant-in-Aid for Scientific Research und dem NEDO Project für finanzielle Unterstützung.



Schema 1. Kombination von Elektrochemie und Pd-Katalyse, um adressierbare Molekülbibliotheken auf Mikroelektroden-Arrays aufzubauen. DMF = *N,N*-Dimethylformamid, 2,4-DNP = 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Ts = *p*-Toluolsulfonyl.

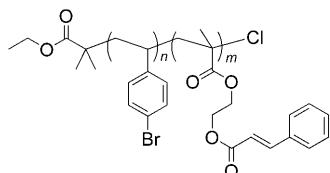
An ausgewählten Elektroden wurde dann unter Umkehrung der Elektrodenpolarität eine Wacker-Oxidation durchgeführt. Durch eine triarylamin-katalysierte elektrochemische Oxidation, bestehend aus 300 oder 600 Zyklen von 0.5-s-Pulsen bei 3.4 V und 0.5-s-Pulsen bei 0 V, wurde Pd^0 an diesen Anoden in Pd^{II} überführt. Pd^{II} oxidiert unter Regenerierung von Pd^0 die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung zu einem Keton. Um Pd^{II} auf dem Chip auf die ausgewählten Positionen räumlich zu begrenzen, wurde der Lösung Ethylvinylether zugesetzt, um sämtliches in die Lösung diffundiertes Pd^{II} zu reduzieren. Das Keton wurde dann in das entsprechende 2,4-DNP-Derivat umgewandelt und der Chip in einer Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert, die einen handelsüblichen, an eine Fluoreszenzsonde gekoppelten Antikörper aus Kaninchen (**2**) enthielt. Nach dem Waschen der Chipoberfläche zum Entfernen von überschüssigem Antikörper wurde der Chip durch ein Epifluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei war die Ketonbildung an den ausgewählten Elektroden auf dem Chip deutlich zu erkennen. Diese erfolgreiche Kombination von Elektrochemie und metallorganischer Chemie wies neue Wege zum Aufbau von Molekülbibliotheken auf Chips.

Mit einer ähnlichen Methode wurden Cumarinderivate auf einem Mikroelektroden-Array hergestellt. Als Bindungssassay für den Anticumarin-Antikörper wurde der Strom erfasst, der im Redoxzyklus Ferrocen/Ferrociniumion auftritt.^[11] Dieser Zugang zu Bibliotheken war auch mit anderen Reaktionen erfolgreich, zum Beispiel mit der Heck-Reaktion,^[12] der Suzuki-Reaktion,^[13] der Abspaltung einer *tert*-Butoxycarbonylgruppe,^[14] der Erzeugung von reaktiven *N*-Acyliminiumion-Intermediaten,^[15] einer Hetero-Michael-Addition,^[16] mit Lewis-Säure-katalysierten Reaktionen^[17] und Kupfer(i)-katalysierten Klickreaktionen.^[18]

In den genannten Fällen wurden die Mikroelektroden-Arrays mit einer porösen Reaktivschicht, meistens aus Aga-

rose^[17,18] oder Saccharose,^[11] bezogen, um das Substrat an den gewünschten Positionen der Chipoberfläche zu immobilisieren. Diese konventionelle Beschichtung hat aber einige Nachteile. So blättert Agarose mit der Zeit von der Oberfläche ab, löst sich in einer Reihe von Lösungsmitteln und reagiert mit einigen der für die ortsspezifische Synthese verwendeten Reagentien.^[19] Mit Saccharose gibt es diese Probleme nicht; sie bildet eine stabile Oberfläche für den Aufbau funktionalisierter Arrays. Wenn jedoch kleine Moleküle untersucht werden sollen, die ausgehend von geschützten Amin- und Alkoholfunktionalitäten synthetisiert werden, sind sowohl Agarose als auch Saccharose wegen ihrer polyhydroxierten Oberfläche nur eingeschränkt nutzbar.

Dieses Problem lösten Moeller et al. 2009 mit dem in Schema 2 gezeigten Diblock-Copolymer.^[20] Das Polymer, das

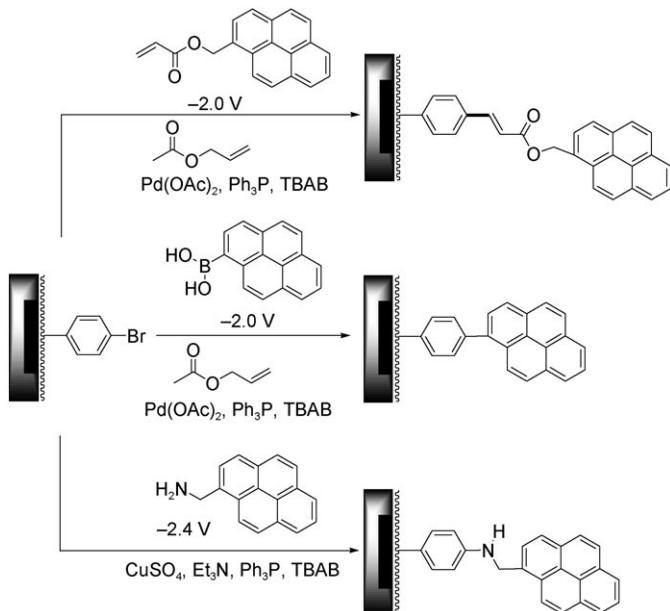


Schema 2. Struktur des Diblock-Copolymers, mit dem eine poröse Reaktivschicht auf Mikroelektroden-Arrays zum Aufbau adressierbarer Molekülbibliotheken erzeugt wurde.

sie zuvor durch eine radikalische Atomtransferpolymerisation hergestellt hatten, brachten sie durch Rotationsbeschichtung und unter Verwendung eines Lösungsmittelsystems auf die Elektrodenoberfläche auf, wobei eines der beiden Lösungsmittel beide Copolymerblöcke solubilisierte, das andere nur den Polystyrolblock. Bestrahlung des beschichteten Mikroelektroden-Arrays mit einer 100-W-Quecksilberlampe vernetzte dann die Copolymeren über ihre Zimtsäureeinheiten zu einem porösen Polymer mit Porengrößen von etwa (19 ± 3) nm.

Auf dieser neuen Oberfläche und mit der *p*-Bromphenoxygruppe als Anker wurden dann die Reaktionen zur Herstellung von adressierbaren Molekülbibliotheken durchgeführt. Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist die Suzuki-Kupplung mit einem Pd^0 -Katalysator zur Einführung der Pyrenstruktur (Schema 3), bei der die ausgewählten Elektroden als Kathoden geschaltet wurden, um Pd^{II} zu Pd^0 zu reduzieren. Über fünfzehn aufeinanderfolgende Experimente mit jeweils 300 Zyklen blieb das Polymer stabil und zeigte keine Anzeichen von Abblätterung. Auch Kupfer(i)-katalysierte und Heck-Reaktionen wurden zur Einführung der Pyrenstruktur verwendet (Schema 3). Nach der Reaktion wurde das Array aus der Lösung genommen und gewaschen, um sämtliches nichtgebundenes Substrat zu entfernen; das derart behandelte Array wurde dann unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abbildung 2).

Es wurde auch untersucht, ob sich die Oberflächenbeschaffenheit mit der gewünschten elektrochemischen Signallisierung verträgt, und zwar indem zuerst der mit einer Eisenspezies in der Lösung über dem Array verknüpfte Stromfluss gemessen und anschließend ein Protein zugegeben und der Stromabfall an den Mikroelektroden bestimmt wur-



Schema 3. Kombination von elektrochemischen und chemischen Reaktionen auf einer aus dem Diblock-Copolymer von Schema 2 erzeugten porösen Oberfläche. TBAB = Tetra-*n*-butylammoniumbromid.

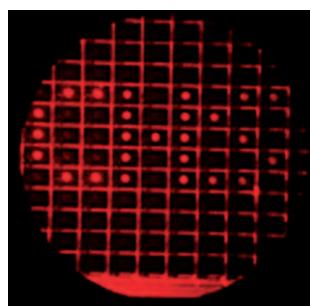


Abbildung 2. Ortsspezifisches Muster auf einem Mikroelektroden-Array.

de. Nach der unspezifischen Bindung von BSA an die nicht-funktionalisierte polymerbeschichtete Elektrodenoberfläche wurde eine starke Impedanz beobachtet, was beweist, dass das Diblock-Copolymer mit der eigentlichen Signalisierung kompatibel ist. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn anstelle von BSA ein Antikörper eingesetzt wurde.

Mit diesem neuartigen elektrochemischen Ansatz ist es jetzt also möglich, adressierbare Bibliotheken auf Mikroelektroden aufzubauen. Solche Bibliotheken können möglicherweise dazu verwendet werden, Bindungsereignisse zwischen potenziellen Liganden und biologischen Rezeptoren in Echtzeit zu beobachten.

Eingegangen am 5. Januar 2010
Online veröffentlicht am 20. April 2010

Hammerich, *Organic Electrochemistry*, 4. Auflage, Marcel Dekker, New York, **2001**; d) J. Grimshaw, *Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, **2000**; e) A. J. Fry, *Electroorganic Chemistry*, 2. Auflage, Wiley, New York, **2001**; f) S. Torii, *Electroorganic Reduction Synthesis*, Band 1 und 2, Kodansha, Tokyo, **2006**.

- [2] Ausgewählte Übersichten: a) H. J. Schäfer, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 978–1000; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 911–934; b) T. Shono, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 811–850; c) J. Utley, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 157–167; d) K. D. Moeller, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9527–9554; e) H. Lund, *J. Electrochem. Soc.* **2002**, *149*, S21; f) J. Yoshida, K. Kataoka, R. Horcajada, A. Nagaki, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2265–2299; g) K. D. Moeller, *Synlett* **2009**, 1208–1218.
- [3] a) E. Reddington, A. Spalenza, B. Gurau, R. Viswanathan, S. Sarangapani, E. S. Smotkin, T. E. Mallouk, *Science* **1998**, *280*, 1735–1737; b) T. Erichsen, S. Reiter, V. Ryabova, E. M. Bonsen, W. Schuhmann, W. Märkle, C. Tittel, G. Jung, B. Speiser, *Rev. Sci. Instrum.* **2005**, *76*, 062204; c) A. K. Yudin, T. Siu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 269–272; d) S. Suga, M. Okajima, K. Fujiwara, J. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7941–7942; e) J. Yoshida, S. Suga, S. Suzuki, N. Kinomura, A. Yamamoto, K. Fujiwara, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9546–9549; f) S. Suga, M. Okajima, K. Fujiwara, J. Yoshida, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 728–741; g) S. Nad, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2347–2349; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2297–2299; h) S. Nad, S. Roller, R. Haag, R. Breinbauer, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 403–406.
- [4] Eine jüngere Übersicht zur Mikroarray-Analyse: J. L. Duffner, P. A. Clemons, A. N. Koehler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 74–82.
- [5] a) R. P. Ekins, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 2015–2030; b) J. Kononen, L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter, O. P. Kallioniemi, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 844–847; c) R. Ekins, F. Chu, *J. Int. Fed. Clin. Chem.* **1997**, *9*, 100–103; d) A. Lueking, M. Horn, H. Eickhoff, K. Bussow, H. Lehrach, G. Walter, *Anal. Chem.* **1999**, *270*, 103–111.
- [6] a) W. S. Yeo, M. N. Yousaf, M. Mrksich, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14994–14995; b) W. S. Dillmore, M. N. Yousaf, M. Mrksich, *Langmuir* **2004**, *20*, 7223–7231; c) W. S. Yeo, M. Mrksich, *Langmuir* **2006**, *22*, 10816–10820; d) E. W. L. Chan, M. N. Yousaf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15542–15546; e) J. Y. Park, Y. S. Lee, B. H. Kim, S. M. Park, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4986–4993; f) V. Anandan, R. Gangadharan, G. Zhang, *Sensors* **2009**, *9*, 1295–1305; g) V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3365–3371.
- [7] K. Dill, D. D. Montgomery, W. Wang, J. C. Tsai, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *444*, 69–78.
- [8] Übersichten zu adressierbaren Bibliotheken: a) R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingers, D. J. Lockhart, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 20–24; b) M. C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473–488.
- [9] Weitere Beispiele für adressierbare Bibliotheken: a) S. M. Webb, A. L. Miller, B. H. Johnson, Y. Fofanov, T. Li, T. G. Wood, E. B. Thompson, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *85*, 183–193; b) S. R. Shih, Y. W. Wang, G. W. Chen, L. Y. Chang, T. Y. Lin, M. C. Tseng, C. Chiang, K. C. Tsao, C. G. Huang, M. R. Shio, J. H. Tai, S. H. Wang, T. L. Kuo, W. T. Liu, *J. Virol. Methods* **2003**, *111*, 55–60.
- [10] E. Tesfu, K. Maurer, S. R. Ragsdale, K. D. Moeller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6212–6213.
- [11] E. Tesfu, K. Roth, K. Maurer, K. D. Moeller, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 709–712.
- [12] J. Tian, K. Maurer, E. Tesfu, K. D. Moeller, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1392–1393.
- [13] D. Kesselring, K. Maurer, A. McShea, K. D. Moeller, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2501–2504.

- [14] K. Maurer, A. McShea, M. Strathmann, K. Dill, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 637–640.
- [15] L. Hu, K. Maurer, A. McShea, K. D. Moeller, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1273–1276.
- [16] M. Stuart, K. Maurer, K. D. Moeller, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1514–1517.
- [17] B. Bi, K. Maurer, K. D. Moeller, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5986–5988; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5872–5874.
- [18] J. L. Bartels, P. Lu, A. Walker, K. Maurer, K. D. Moeller, *Chem. Commun.* **2009**, 5573–5575.
- [19] Beispiel für die Agarose-Instabilität: D. Kesselring, K. Maurer, K. D. Moeller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11290–11291.
- [20] L. Hu, J. L. Bartels, J. W. Bartels, K. Maurer, K. D. Moeller, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16638–16639.

Neugierig?



Sachbücher von WILEY-VCH

ESTHER V. SCHÄRER-ZÜBLIN (Hrsg.)
Forschung und Ernährung
— Ein Dialog

ISBN: 978-3527-32691-4
April 2009 360 S. mit 180 Farabb.
Broschur € 29,90

Konkurrenzlos im Inhalt und Sachverstand, wunderschön durchgehend vierfarbig bebildert ist dies DER Titel für alle, die sich mehr mit Nahrung beschäftigen wollen.

Unser Wissen über den molekularen Zusammenhang von Nahrung und Mensch hat sich in den letzten Jahren enorm erweitert. Multidisziplinär im Ansatz, von Experten in leicht verständlicher Sprache geschrieben, ist dieses Buch ein Muss für alle, die mehr über Nahrung wissen wollen.



53240098_hu

WILEY-VCH

Wiley-VCH • Tel. +49 (0) 62 01-606-400 • Fax +49 (0) 62 01-606-184 • E-Mail: service@wiley-vch.de

www.wiley-vch.de/sachbuch