

Klick-Chemie mit räumlicher Kontrolle: Biofunktionalisierung von Oberflächen durch photoinduzierte Diels-Alder-Reaktionen bei Umgebungstemperatur**

Thomas Pauloeuhl, Guillaume Delaittre, Volker Winkler, Alexander Welle, Michael Bruns, Hans G. Börner, Alexandra M. Greiner, Martin Bastmeyer und Christopher Barner-Kowollik*

In den letzten Jahren ist das Interesse an Klick-Reaktionen als ein hocheffizienter chemischer Ansatz für die Modifikation von Materialien beträchtlich gestiegen.^[1] Klick-Reaktionen zeichnen sich durch schnelle Reaktionskinetik, hohe Ausbeuten, orthogonale Reaktivität und Toleranz gegenüber einer Vielzahl an Lösungsmitteln aus. Bei manchen Anwendungen, wie etwa der Erzeugung von Oberflächenstrukturen und dreidimensionalen Gerüsten, reichen diese Eigenschaften jedoch nicht aus, da außerdem auch eine räumliche Kontrolle notwendig ist. Darüber hinaus wäre auch eine zeitliche Kontrolle chemischer Reaktionen wünschenswert, um so eine Reaktion zu einem beliebigen Zeitpunkt auslösen zu können. Dies ist besonders dann interessant, wenn eine bestimmte Reaktionsabfolge notwendig ist. Die Verwendung von Licht als zeitlichem und räumlichem „Reaktionsauslöser“ wurde kürzlich für Klick-Methoden beschrieben.^[2]

Zum Beispiel berichteten Bowman und Mitarbeiter von Hydrogelmustern, die durch Vernetzung mittels Azid-Alkin-Cycloaddition hergestellt wurden. Die Reaktion wurde durch eine photoinduzierte Reduktion von Cu^{II} zu Cu^I ausgelöst, wobei Cu^I als Katalysator für die Vernetzung diente.^[3] Die Methode hat jedoch den Nachteil, dass viele Reaktionskomponenten benötigt werden, einschließlich Kupferspezies und einem radikalischen Photoinitiator, der für die Erzeugung von Cu^I benötigt wird. Obwohl dies nicht explizit erwähnt wurde, können diese Reaktionskomponenten im Medium diffundieren und damit den räumlich aufgelösten Charakter beeinträchtigen. Der gleiche Einwand gilt auch für die weit verbreiteten Thiol-En- und Thiol-In-Reaktionen.^[4]

Der Schlüssel zu einer vollständigen räumlichen Kontrolle liegt in der Immobilisierung von einer der zwei Komponenten, um sie dann direkt zu aktivieren. Popik, Locklin und Mitarbeiter verwendeten diese Strategie in Synthesen mit immobilisierten Cyclopropenon-maskierten Cyclooctinen.^[5] Hierbei werden in einer UV-induzierten Decarboxylierung gespannte Alkine freigesetzt, die sehr schnell mit Aziden in Lösung reagieren und auf diese Weise fluorophore Muster erzeugen. In Anlehnung an Studien von Lin und Mitarbeitern,^[6] die wiederum die wegweisenden Arbeiten von Huisgen und Sustmann^[7] aufgriffen, untersuchten wir kürzlich die Photogenerierung von Nitrilimininen aus immobilisierten Diaryltetrazolen. Dabei wurde Cellulose durch 1,3-dipolare Cycloaddition mit verschiedenen Maleimid-funktionalisierten Makromolekülen mit hoher örtlicher Kontrolle funktionalisiert.^[8] Zudem führten wir ein neues Protokoll für Klick-Konjugationen auf der Basis von Diels-Alder-Reaktionen ein, mit dem Hydroxy-*o*-chinodimethane (Photoenole) durch Photoisomerisierung von *o*-Methylphenylketonen oder -aldehyden erzeugt werden. Wir konnten damit zeigen, wie leicht und effizient die lichtinduzierte Konjugation von polymeren Bausteinen gelingt.^[9] Die zuletzt genannte Strategie erfüllt die strengen Klick-Bedingungen, wie sie für Polymer-Polymer-Verknüpfung erforderlich sind.^[1b] In Studien potentieller Photoenol-Kandidaten identifizierten wir die 2-Formyl-3-methylphenoxy(FMP)-Einheit als noch effizienteren Vorläufer als das 2-Methylbenzophenon-Derivat, über das wir schon früher berichteten. Die beschleunigte Diels-Alder-Addition basiert auf der Bildung einer Wasserstoffbrücke in der Photoenol-Zwischenstufe, wodurch sowohl die Lebensdauer als auch der Anteil der gebildeten *Z*-Isomere (Schema 1) erhöht werden, die, anders als die *E*-Isomere,^[10] gegenüber Dienophilen wie z.B. Maleimid-Derivaten sehr reaktiv sind.

[*] T. Pauloeuhl, Dr. G. Delaittre, V. Winkler, Prof. Dr. C. Barner-Kowollik
Präparative Makromolekulare Chemie, Institut für Technische Chemie und Polymerchemie und Center for Functional Nanostructures (CFN), Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Engesserstraße 18, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: christopher.barner-kowollik@kit.edu
Homepage: <http://www.macroarc.de>

Dr. G. Delaittre, Dr. A. M. Greiner, Prof. Dr. M. Bastmeyer
Zoologisches Institut, Zell- und Neurobiologie und Center for Functional Nanostructures (CFN), Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 76131 Karlsruhe (Deutschland)

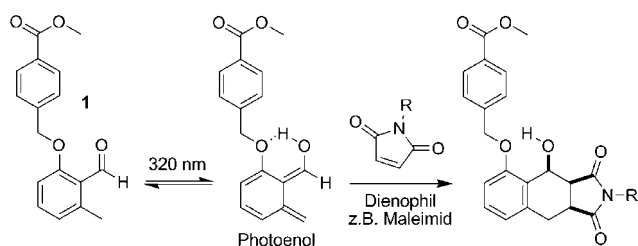
Dr. A. Welle
Institut für Biologische Grenzflächen (IBG I), Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Deutschland)

V. Winkler, Dr. M. Bruns
Institut für Angewandte Materialien (IAM-WPT), Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Deutschland)

Prof. Dr. H. G. Börner
Organische Synthese funktionaler Systeme, Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin, 12489 Berlin (Deutschland)

[**] C.B.K. dankt dem Karlsruher Institut für Technologie (KIT), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg für die Finanzierung dieses Projekts. T.P. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium. G.D. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Humboldt-Forschungsstipendium. Die Autoren danken Dr. T. Gruending, K. Oehlenschlaeger und M. Glassner für erste Studien an *o*-Chinodimethanen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201107095> zu finden.



Schema 1. Photoinduzierte Isomerisierung des 2-Formyl-3-methylphenoxy(FMP)-Derivats **1** und nachfolgende Diels-Alder-[4+2]-Cycloaddition mit einem Dienophil.

Erste Modellreaktionen wurden in Lösung durchgeführt und mithilfe der Massenspektrometrie direkt analysiert. Hierbei wird im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie eine sehr viel höhere Empfindlichkeit und Spezifität bei der Identifizierung von möglichen Nebenprodukten erzielt.^[11] Als Belichtungsquelle wurde eine Kompaktfluoreszenzlampe (36 W) am Absorptionsmaximum der FMP-Spezies (Abbildung S1, $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$) verwendet. Abbildung 1a zeigt das Massenspektrum der Ausgangsverbindung (FMP-terminierter Poly(ethylenglycol)methylether; **2**) vor der Bestrahlung und das photostabile Diels-Alder-Cycloaddukt **3** nach der Bestrahlung. Ein vollständiger Umsatz erfolgt mit Maleimiden bei Umgebungstemperatur typischerweise innerhalb von weniger als 15 Minuten (für eine kinetische Untersuchung der Photoreaktion in Acetonitril und Dichlormethan siehe Abbildungen S9 und S10 in den Hintergrundinformationen). Weiterhin zeigte sich, dass die photoinduzierte Reaktion auch mit polaren Lösungsmitteln wie Wasser (Abbildung S11) und DMF (z.B. in der photoinduzierten Reaktion mit *N*-(5-Fluoresceinyl)maleimid, Abbildung S12) kompatibel ist. Al-

erdings sind bei Verwendung dieser Lösungsmittel normalerweise längere Bestrahlungszeiten für vollständigen Umsatz erforderlich. Da katalysatorfreie Konjugationsreaktionen in Wasser für biologische Anwendungen von großer Bedeutung sind, untersuchten wir daraufhin die photoinduzierte Cycloaddition mit Peptiden. Abbildung 1b zeigt das Massenspektrum des Maleimido-GRGSGR-Peptids **4** vor und nach (**5**) der Photokonjugation mit dem niedermolekularen FMP-Derivat **1**. Wir bestrahlten **4** in Gegenwart von **1** (1:1.2 mol/mol) in Acetonitril/Phosphatpuffer (PBS; 3:1 v/v) und konnten wiederum eine quantitative Umwandlung in das erwartete Diels-Alder-Addukt beobachten (Abbildung S13).

Die Modellreaktionen in Lösung lieferten den prinzipiellen Beweis, dass eine photoinduzierte (Bio)Konjugation ohne den Einsatz eines Katalysators mit hoher Effizienz erreicht werden kann. In der Folge erwarteten wir, dass diese Konjugationsmethode aufgrund ihres photoinduzierten Charakters als Methode der Wahl für die orts aufgelöste Funktionalisierung von Oberflächen dienen könnte. Während der Arbeit an diesem Manuskript veröffentlichten Popik et al. eine Studie zur Funktionalisierung von Vinylether-beschichteten Oberflächen durch photoinduzierte Hetero-Diels-Alder-Reaktion,^[12] die Ähnlichkeiten zu unserem vorgeschlagenen System aufweist. Die photoreaktive Spezies befand sich in jener Studie jedoch in Lösung, was sich nachteilig auf die räumliche Auflösung auswirkt. Des Weiteren erfordert die Methode für jede Kupplung die mehrstufige Einführung des photoaktiven 3-(Hydroxymethyl)-2-naphthols. Unsere zentrale Idee ist hingegen die direkte Immobilisierung der photoaktiven FMP-Einheit an der Oberfläche, um damit eine räumlich aufgelöste In-situ-Funktionalisierung von Maleimid-Derivaten (z.B. empfindlichen Biomoleküle) zu erreichen. Dank der Tatsache, dass ein breites Spektrum an

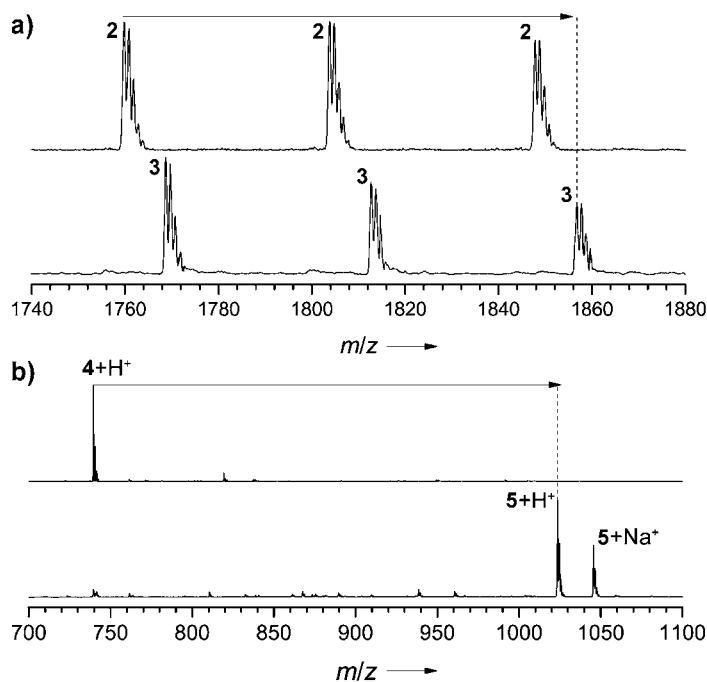
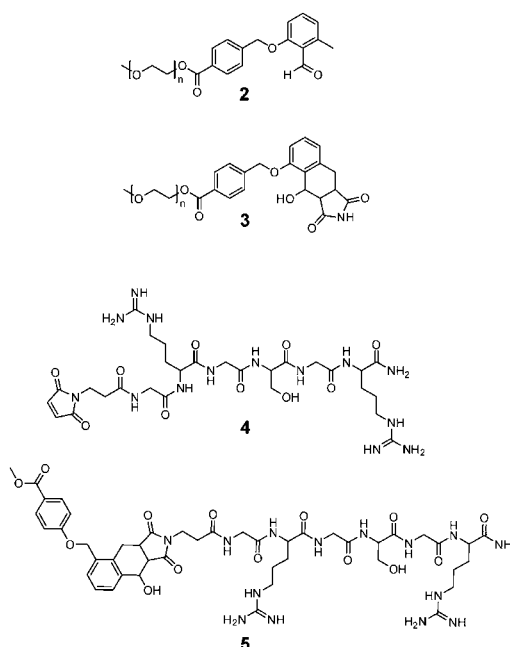
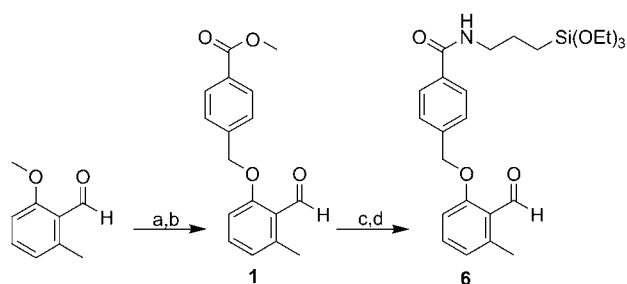


Abbildung 1. ESI-MS-Spektren a) des 2-Formyl-3-methylphenoxy-PEG **2** vor (oben) und nach (unten; **3**) 15 min Photokonjugation mit Maleimid und b) des Maleimido-GRGSGR-Peptids **4** vor (oben) und nach (unten; **5**) 2 h Photokonjugation mit dem FMP-Derivat **1**.



Maleimido-funktionalisierten (Bio)Molekülen leicht zugänglich ist, vermeidet man auch die komplizierte Einführung der oben erwähnten photoaktiven Spezies.

Die Funktionalisierung der Silicioberflächen gestaltete sich als unproblematisch. Das FMP-funktionalisierte Silan **6** wurde hergestellt (Schema 2), in wasserfreiem Toluol gelöst



Schema 2. Synthese des FMP-funktionalisierten Silans **6**. Reagentien und Bedingungen: a) AlCl_3 , DCM; b) 4-(Brommethyl)benzoat, K_2CO_3 , Aceton; c) NaOH , DCM/Methanol (9:1 v/v); d) Ethylchlorformiat, 3-(Triethoxysilyl)propan-1-amin, THF.

und mit einer aktivierten Silicioberfläche zur Reaktion gebracht. Die Oberflächensilanierung wurde durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS, Abbildung S14) nachgewiesen, und anschließend führten wir die lichtinduzierte Diels-Alder-Cycloaddition auf dieser Oberfläche mit unterschiedlichen Maleimid-Derivaten durch. Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) ist eine häufig verwendete und empfindliche Technik, die eine räumlich hochaufgelöste Analyse von molekularen Mustern auf Oberflächen erlaubt.^[13] Anders als klassische Fluoreszenzmessungen liefern ToF-SIMS-Daten detaillierte Informationen über die chemische Zusammensetzung, insbesondere zur Analyse nicht-fluoreszierender (Bio)Moleküle. Zum Beispiel können Brom-haltige Verbindungen mit ToF-SIMS durch ihr Isotopenmuster eindeutig nachgewiesen werden, weshalb wir das Brom-haltige Dienophil **7** (Abbildung 2) als molekulare Markierung verwendeten, um eine lokale Funktionalisierung abzubilden. Das Photomuster wurde durch Bestrahlung der mit einer Lösung von **7** funktionalisierten Silicioberfläche erzielt. Verwendet wurden dabei zwei Schablonen: eine mit einer Makrostruktur (ein aus einer Metallplatte herausgeschnittenes Rechteck) und eine zweite mit einer Mikrostruktur (Abbildung 2).

Nach der photoinduzierten Reaktion ist es nicht notwendig, verbleibende FMP-Gruppen an der Oberfläche zu deaktivieren oder zu schützen, da die Bildung von reaktiven Dien-Spezies während der Bestrahlung vollständig umkehrbar ist. Die FMP-Oberfläche ist somit photochemisch inert (bei Abwesenheit eines Dienophils während der Bestrahlung konnten keine chemischen Veränderungen der FMP-Schicht mittels ToF-SIMS festgestellt werden) und reagiert nur in der Gegenwart eines geeigneten Dienophils. Dadurch wird die Herstellung, Handhabung und Aufbewahrung der funktionalisierten Oberflächen vereinfacht. Anschließend ToF-SIMS-Analyse des Bromgehalts auf der Oberfläche bildete die bestrahlten und nicht bestrahlten Bereiche mit guter räumlicher Auflösung ab (Abbildung 2b). Diese Art von Muster könnte genutzt werden, um Polymere durch oberflä-

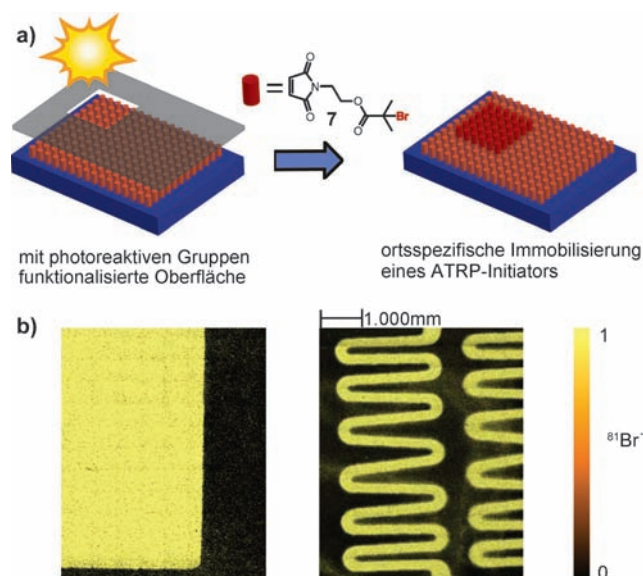


Abbildung 2. a) Prinzip der photoinduzierten Diels-Alder-Oberflächenfunktionalisierung des Brom-haltigen Maleimid-Derivats **7**. ATRP = Atomtransferradikalpolymerisation. b) ToF-SIMS-Darstellung zweier Silicioberflächen, die mit Maleinimid **7** unter Verwendung zweier Masken gemustert wurden.

cheninduzierte metallkatalysierte radikalische Polymerisation in einem „Grafting-from“-Ansatz herzustellen.^[14] Für solche polymeren Oberflächenmuster bestehen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf verschiedensten Längenskalen, etwa in der Gewebezüchtung, der Zellbiologie und der Medizin.^[15]

Außer in „Grafting-from“-Ansätzen könnte unsere photoinduzierte Strategie auch in „Grafting-to“-Ansätzen verwendet werden, z.B. zur direkten Funktionalisierung der FMP-Oberfläche mit Maleimido-terminiertem PEG-Methylether (PEG-Mal; **8**) (Abbildung 3). Bei Verwendung dieser Methode fanden wir die charakteristischen Massenfragmente von PEG nur im bestrahlten Quadrat (Abbildung 3b, links). Damit wurde die ortsspezifische Immobilisierung nachgewiesen. In früheren Arbeiten wurde PEG verwendet, um nichtspezifische Bindung lokal zu unterdrücken^[16] und um eine räumliche Kontrolle über adhäsive und nichtadhäsive Bereiche auf der Oberfläche zu erhalten.

Bedeutenderweise bleibt in unserem System die ursprüngliche Photoreaktivität der unbestrahlten FMP-funktionalisierten Bereiche erhalten und kann für weitere Diels-Alder-Funktionalisierung mit einem zweiten Dienophil verwendet werden. Dementsprechend wurde die PEG-funktionalisierte Oberfläche in Gegenwart von **7** nochmals vollständig bestrahlt, und wir konnten über die Analyse der Brom- und PEG-Gehalte tatsächlich die erfolgreiche sequentielle Photomusterung nachweisen (Abbildung 3b).

Um auch die Durchführbarkeit einer kovalenten und ortsspezifischen Anbindung von Peptiden mithilfe unseres photoinduzierten Ansatz zu demonstrieren (welcher auch Schutzgruppenchemie vollständig vermeidet), bestrahlten wir eine frisch hergestellte FMP-funktionalisierte Oberfläche mit Maleimido-GRGSGR **4** in Acetonitril/PBS (3:1 v/v). Die Analyse mittels ToF-SIMS bewies auch hier eine erfolgreiche

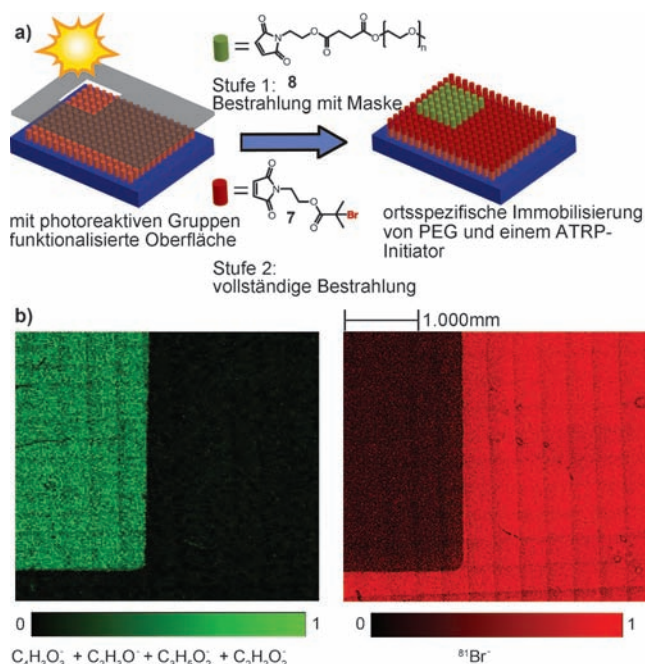


Abbildung 3. a) Prinzip der doppelten photoinduzierten Musterung mit ω -Maleimido-PEG **8** und dem ATRP-Initiator **7**. b) ToF-SIMS-Daten belegen die erfolgreiche Photomusterung mit dem Polymer **8** (links). Die ursprüngliche Photoreaktivität bleibt auf den unbestrahlten Bereichen erhalten und kann für eine weitere Diels-Alder-Funktionalisierung durch vollständige Bestrahlung in Gegenwart von **7** (rechts) verwendet werden.

Oberflächenmusterung des Peptids in den bestrahlten Oberflächenbereichen. In diesem Fall basierte die Analyse auf der Gegenwart von $C_4H_8N^+$, einem für dieses Peptid charakteristischen Sekundärion (Abbildung 4).^[17] Die erfolgreiche Biomusterung wurde auch durch das charakteristische Massenfragment der Arginin-Gruppe von **4** nachgewiesen ($C_4H_{11}N_3^+ + C_5H_8N_3^+ + C_5H_{11}N_4^+$; siehe Abbildung S15).

Die hier beschriebene Photoenol-vermittelte Konjugationsstrategie besitzt Eigenschaften, die sie zu einer exzellenten Klick-Reaktion machen. Die Reaktion ist schon bei Umgebungstemperatur sehr schnell und effizient und kann in einer Reihe von (polaren) Lösungsmitteln angewendet werden. Es wird kein Katalysator benötigt, und es werden keine Nebenprodukte gebildet, sodass keine Aufreinigung erforderlich ist. Am wichtigsten ist jedoch, dass die zeitliche und räumliche Kontrolle aufgrund des lichtinduzierten Charakters bereits im System verankert ist. In dieser Arbeit haben wir die hohe Effizienz und Geschwindigkeit der photoinduzierten Diels-Alder-(Bio)Konjugation sowohl in Lösung also auch an Oberflächen dargestellt. Dabei wurden drei Dienophile – ein ATRP-Initiator, ein Polymer und ein Peptid – verwendet. Zahlreiche Anwendungen wie photolithographisches Funktionalisieren von leitfähigen Polymeren für die Entwicklung von LEDs oder die Bildung von komplexen Architekturen wie Polymer-Protein-Konjugaten sind denkbar. Zurzeit beschäftigen wir uns mit der Synthese von funktionellen Substraten mithilfe dieser Technik, um eine genauere Untersuchung des Verhaltens von Zellen zu ermöglichen.

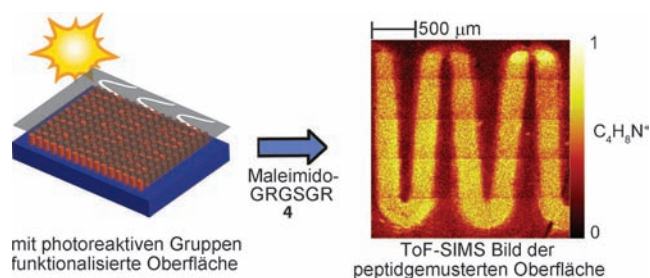


Abbildung 4. Prinzip der lokal begrenzten Biofunktionalisierung einer Oberfläche. Rechts: ToF-SIMS-Bild der Biokonjugation mit Maleimido-GRSGR **4**.

Eingegangen am 6. Oktober 2011
Online veröffentlicht am 9. Dezember 2011

Stichwörter: Chinodimethan · Oberflächenmusterung · Peptide · Photokonjugation · ToF-SIMS

- [1] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; b) C. Barner-Kowollik, F. E. Du Prez, P. Espeel, C. J. Hawker, T. Junkers, H. Schlaad, W. Van Camp, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 61–64; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 60–62.
- [2] M. Conradi, T. Junkers, *Macromolecules* **2011**, *44*, 7969–7976.
- [3] B. J. Adzima, Y. Tao, C. J. Kloxin, C. A. DeForest, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 256–259.
- [4] a) C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1584–1617; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573; b) R. Hooogenboom, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3489–3491; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3415–3417.
- [5] S. V. Orski, A. A. Poloukhine, S. Arumugam, L. Mao, V. V. Popik, J. Locklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024–11026.
- [6] a) W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2874–2877; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835; b) Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5434–5437; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330–5333.
- [7] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60–70.
- [8] M. Dietrich, G. Delaitre, J. P. Blinco, A. J. Inglis, M. Bruns, C. Barner-Kowollik, *Adv. Funct. Mater.*, DOI: 10.1002/adfm.201102068.
- [9] a) T. Gruendling, K. K. Oehlenschlaeger, E. Frick, M. Glassner, C. Schmid, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 807–812; b) M. Glassner, K. K. Oehlenschlaeger, T. Gruendling, C. Barner-Kowollik, *Macromolecules* **2011**, *44*, 4681–4689.
- [10] a) P. G. Sammes, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 405–422; b) J. L. Charlton, M. M. Alauddin, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2873–2889; c) J. L. Segura, N. Martín, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3199–3246; d) S. M. Mellows, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc. D* **1971**, 21–22.
- [11] L. Nebhani, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1298–1305.
- [12] S. Arumugam, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15730–15736.
- [13] C.-Y. Lee, G. M. Harbers, D. W. Grainger, L. J. Gamble, D. G. Castner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9429–9438.
- [14] B. Charleux, F. D'Agosto, G. Delaitre, *Adv. Polym. Sci.* **2011**, *233*, 125–183.
- [15] Z. Nie, E. Kumacheva, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 277–290.
- [16] X. C. Nan Cheng, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *348*, 71–79.
- [17] H. J. Mathieu, *Surf. Interface Anal.* **2001**, *32*, 3–9.