

(Bio)Molekulare Oberflächenmuster durch photoinduzierte Oxim-Ligation**

Thomas Pauloeuhl, Guillaume Delaittre, Michael Bruns, Maria Meißler, Hans G. Börner, Martin Bastmeyer und Christopher Barner-Kowollik*

Photolabile Moleküle werden häufig in der organischen Chemie eingesetzt, um Bindungen ohne den Einsatz von zusätzlichen Reagentien aufzubrechen.^[1] Dieser orthogonale und milde photolytische Bindungsbruch ist besonders attraktiv für festphasenunterstützte organische Synthese,^[2] im Bereich der kombinatorischen Chemie^[3] und für die Untersuchung von molekularen Abläufen in biologischen Systemen.^[4] Unter den vielen photospaltbaren Schutzgruppen, die untersucht wurden, ist die *o*-Nitrobenzyl-Funktion sicherlich eine der wichtigsten, da sie eine große Zahl an Funktionalitäten wie die Carboxy-,^[5] Amin-,^[6] Hydroxy-^[7] und die Thiol-Gruppe^[8] schützen kann. Darüber hinaus stellt die Verwendung von Licht ein unkompliziertes Mittel dar, um räumliche und zeitliche Kontrolle über den gewünschten molekularen Bindungsbruch zu erreichen.^[9] Große Beachtung fand die Verwendung von Licht z.B. bei der Konstruktion von Mus-

tern zahlreicher Zelllinien,^[10] bei der Herstellung von 3D-strukturierten Materialien für Gewebekulturen^[11] und beim Schutz von aktiven Verbindungen.^[12] Des Weiteren hat die genaue Positionierung der *o*-Nitrobenzyl-Funktion in Polymerketten die kontrollierte Veränderung der Polymereigenschaften durch Lichtanregung ermöglicht. Dies konnte bei der Herstellung von zellkompatiblen 3D-Hydrogelen, die durch Licht zersetzbar sind^[13] oder unter Lichteinwirkung Peptide abgeben,^[14] von durch Licht zersetzbaren Mizellen auf Basis amphiphiler Dendrimere,^[15] oder von photospaltbaren Blockcopolymeren für die Produktion von funktionellen nanoporösen Filmen^[16] sowie an weiteren Beispielen gezeigt werden.^[17]

Der Mechanismus der Photospaltung von *o*-Nitrobenzyl-Derivaten ist eingehend untersucht worden.^[18] Die Photospaltung verläuft typischerweise unter Abspaltung der Schutzgruppe in Form eines Nitrobenzaldehyd-Derivats als Nebenprodukt.^[19] Die Idee des vorliegenden Manuskripts basiert jedoch darauf, diesen durch Licht freigesetzten Aldehyd zu nutzen, um ein Oxim zu bilden^[20] – das Nebenprodukt wird also als Hauptprodukt betrachtet. Wie bereits erwähnt, ermöglicht die Verwendung von Licht eine unmittelbare (oder direkte) räumliche und zeitliche Kontrolle über die immer häufiger verwendeten Klick-Reaktionen unter Einsatz von Oximen. Bisher hat nur die Arbeitsgruppe von Maynard über Molekülmuster berichtet, die durch Oxim-Ligation hergestellt wurden. Diese Muster wurden jedoch unter harschen Bedingungen – mit Elektronenstrahlen oder auf lichtinduzierter Säurebildung basierende Photolithographie^[21] – hergestellt. Interessanterweise erfordert die hier vorgestellte Methode weniger energiereiche Strahlung (UVA) als die bisher von uns und anderen Arbeitsgruppen vorgestellten photoinduzierten Strategien, die auf der 1,3-dipolaren Nitrilimin-En-Cycloaddition (UVC)^[22] oder der Diels-Alder-Cycloaddition von *o*-Chinodimethanen^[23] sowie 3-(Hydroxymethyl)naphthalin-2-ol-Derivaten^[24] (UVB) beruhen. Insgesamt stellen diese unterschiedlichen Techniken eine vielseitige Auswahl an Möglichkeiten zur Photomusterung in verschiedenen Anwendungen dar. Alle Methoden haben eine hohe Effizienz bei Umgebungsbedingungen. Der aktuelle Ansatz verläuft in zwei Schritten: a) eine schnelle und milde lichtinduzierte Entschützung und b) eine anschließende Oxim-Ligation (siehe Schema 1).

Das 2-[(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy]tetrahydro-2H-pyranil(NOTP)-Gerüst, welches in Verbindung **1** enthalten ist, wurde als neue hoch reaktive photospaltbare Einheit ausgewählt. Diese Auswahl begründet sich sowohl durch die Berücksichtigung der übergeordneten Kinetik – die Quantenausbeute der Photospaltung des *o*-Nitroveratrylethers ist

[*] T. Pauloeuhl, Dr. G. Delaittre, Prof. Dr. C. Barner-Kowollik
Präparative Makromolekulare Chemie
Institut für Technische Chemie und Polymerchemie und
Centrum für Funktionelle Nanostrukturen (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, Prof. Dr. M. Bastmeyer
Zoologisches Institut, Zell- und Neurobiologie und
Centrum für Funktionelle Nanostrukturen (CFN)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Haid-und-Neu-Straße 9, 76131 Karlsruhe (Deutschland)

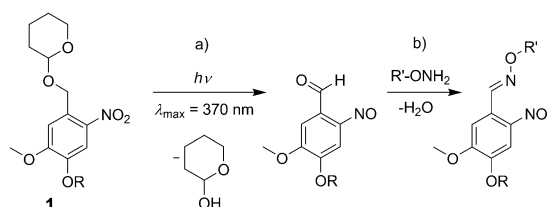
Dr. M. Bruns
Institut für Angewandte Materialien –Werkstoffprozess Technik
(IAM-ESS) und Karlsruhe Nano Micro Facility (KNMF)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen
(Deutschland)

M. Meißler, Prof. Dr. H. G. Börner
Organische Synthese funktionaler Systeme
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)

[**] C.B.K. bedankt sich für die anhaltende Finanzierung des Projektes durch das Karlsruher Institut für Technologie (KIT), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), das DFG Centrum für Funktionelle Nanostrukturen (CFN) sowie durch das Ministerium für Wissenschaft und Kunst des Landes Baden-Württemberg. T.P.s Doktorarbeit wird durch den Fonds der Chemischen Industrie finanziert. G.D. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für finanzielle Unterstützung durch ein Humboldt-Forschungsstipendium für Postdoktoranden. Die Autoren danken Peter Gerstel (KIT) für seine Hilfe bei der Silanisierung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202684> zu finden.



Scheme 1. Photoinduzierte Spaltung eines 2-[(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy]tetrahydro-2H-pyranyl(NOTP)-Derivats und anschließende Oxim-Ligation mit einem Hydroxylamin-Derivat. $R = C_3H_6COOH$.

eine Größenordnung höher als die der meisten anderen *o*-Nitroveratryl-Derivate^[4] – als auch durch die Leichtigkeit, mit der die (Tetrahydropyran-2-yl)oxy-Gruppe über Dihydropyran eingebunden werden kann (siehe die Hintergrundinformationen für die vollständige Synthesevorschrift).

Die ersten Modellreaktionen wurden in Lösung an einem Poly(ethylenglycol)methylether (PEG), der mit Verbindung **1** funktionalisiert war, durchgeführt, da potenzielle Nebenprodukte mithilfe von Massenspektrometrie sehr viel empfindlicher und spezifischer zu detektieren sind als mit 1H -NMR-Spektroskopie.^[25] Eine preiswerte und kompakte Fluoreszenzlampe ($\lambda_{\max} = 370$ nm, 14 mW cm⁻², 18 W) wurde dabei als UVA-Quelle für die Photoentschüttung verwendet. Das Ergebnis der Entschüttung ist in Abbildung 1 dargestellt, welche das Massenspektrum des NOTP-geschützten PEG **3** zeigt. Ein kompletter Bindungsbruch wurde üblicherweise unter milder Bestrahlung innerhalb von nur 3 Minuten bei Umgebungstemperatur erreicht (siehe auch das UV-Spektrum in Abbildung S29). Eine anschließende Reaktion über Nacht von **3** mit Hydroxylamin-Hydrochlorid resultierte in dem gewünschtem Aldoxim **4** (Abbildung 2). Es konnte jedoch auch die Anwesenheit einer kleinen Menge an Verunreinigungen beobachtet werden, welche auf verschiedene

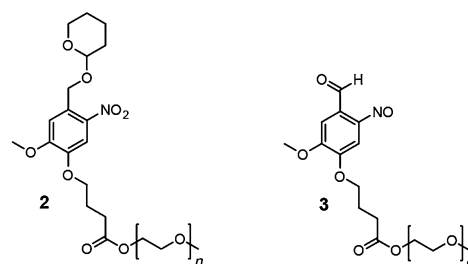
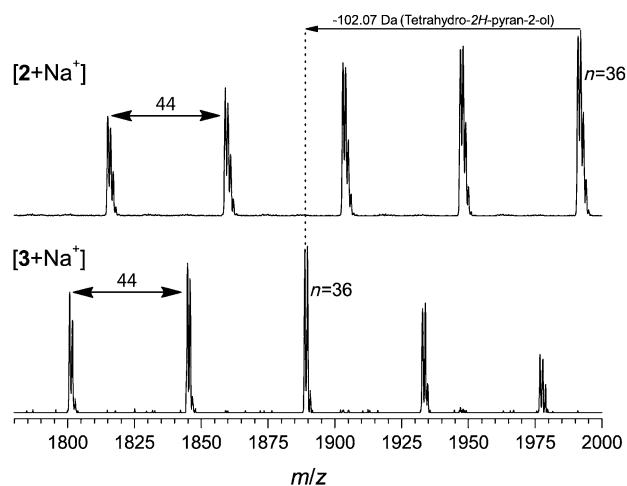


Abbildung 1. Die ESI-MS-Spektrum von NOTP-geschütztem Poly(ethylenglycol)methylether vor (oben) und nach Bestrahlung ($\lambda_{\max} = 370$ nm, 14 mW cm⁻², 18 W, 3 min; Mitte) sowie Strukturformeln für Ausgangsverbindung **2** und Photoprodukt **3**.

Nebenreaktionen der Nitrosogruppe zurückzuführen sind,^[26] z. B. Dimerisierung zu **5**, Zwei- und Vier-Elektronen-Reduktion zu **6** bzw. **8** oder eine anschließende Kondensation zu **7**. Aufgrund der unerwünschten Nebenreaktionen der Nitroso-

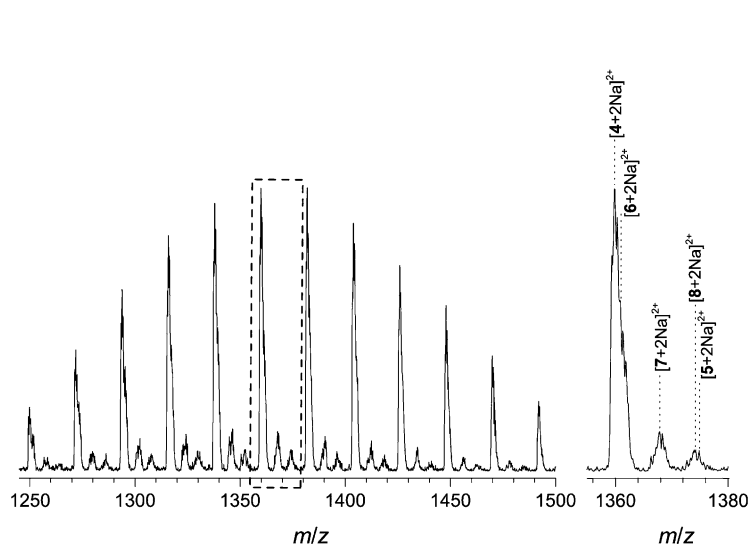
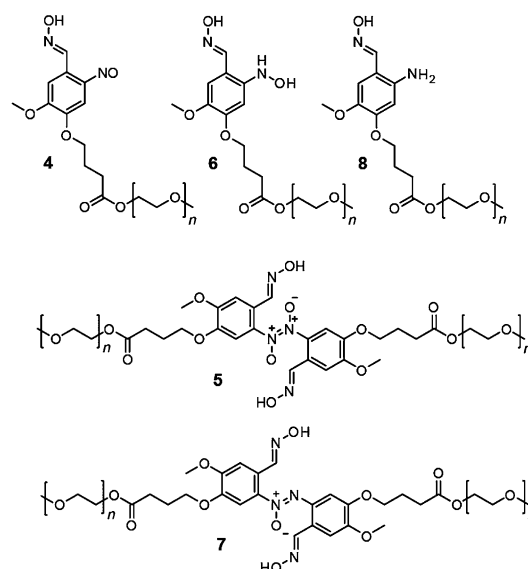


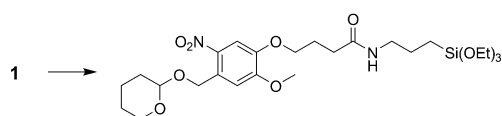
Abbildung 2. ESI-MS-Spektrum nach der Reaktion des Nitrosobenzaldehyd-substituierten Poly(ethylenglycol)methylethers **3** mit Hydroxylamin-Hydrochlorid zu **4**. Die Verbindungen **5**, **6** und **8** bzw. **7** können Dimerisierung, Reduktion und Kondensation der Nitrosogruppen zugeordnet werden. Siehe die Hintergrundinformationen für Details.



gruppe kann die aktuelle Strategie nicht für die Polymer-Polymer-Konjugation vorgeschlagen werden, für welche die strengen Klick-Kriterien erfüllt sein müssen.^[27]

Jedoch ist es bemerkenswert, dass alle Produkte, die aus der Reaktion von NOTP-geschützten PEG **3** mit Hydroxylamin hervorgehen, die gewünschte Oxim-Bindung enthalten. Wenn diese Reaktionsabfolge an einer Oberfläche abläuft, ist kein Einfluss auf die Pflöpfungsdichte und die räumliche Kontrolle zu erwarten. Sowohl diese Ergebnisse als auch die auf Licht basierte Natur der Konjugationstechnik veranlasste uns, die Reaktion auf das räumlich kontrollierte Pflöpfen von Molekülen zur Erzeugung von Oberflächenmustern zu übertragen.

Der Syntheseweg zur Funktionalisierung von Siliciumoberflächen ist unkompliziert. Ein NOTP-funktionalisiertes Silan wurde synthetisiert (siehe Schema 2), in wasserfreiem



Schema 2. Synthese des NOTP-funktionalisierten Silans. Reagentien: Chlorameisensäureethylester, Triethylamin, 3-(Triethoxysilyl)propan-1-amin in THF.

Toluol gelöst und auf aktivierte Siliciumoberflächen aufgebracht. Nach der erfolgreichen Silanisierung (überprüft mit Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS); siehe Abbildung S35) wurde das Photomuster durch eine dreiminütige Bestrahlung der Siliciumoberfläche mit einer Schablone erzeugt, z.B. bei einer UV-Dosierung von 2.5 J cm^{-2} , die niedriger oder vergleichbar ist mit den effizientesten Photomusterungstechniken.^[28] Anschließend wurde die Schablone entfernt, und die Siliciumoberfläche wurde sofort mit einer Lösung von *O*-[(Perfluorophenyl)methyl]hydroxylamin-Hydrochlorid bedeckt. In der aktuellen Studie wird diese Verbindung als molekularer Marker verwendet, um die räumliche Auflösung der Oberflächenpflöpfung zu zeigen (Abbildung 3a). Das Photomuster wurde mithilfe von Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) analysiert. ToF-SIMS ist eine aussagekräftige und sehr empfindliche Technik für die räumlich aufgelöste Analyse von Mustern auf Oberflächen.^[29] Anders als die herkömmliche Fluoreszenzabbildung liefert ToF-SIMS Daten, die detaillierte Informationen über die chemische Zusammensetzung beinhalten und für die Analyse von nichtfluoreszierenden (Bio)Molekülen wichtig sind.

Eine Analyse des Nitro- und Fluorgehalts auf der Oberfläche mithilfe von ToF-SIMS nach der Bestrahlung und nach der Funktionalisierung gab die Struktur der Schablone mit einer guten räumlichen Auflösung zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Bereichen wieder. In der Tat zeigten nur die unbestrahlten Bereiche die Anwesenheit von Nitrit (NO_2^-) und Tetrahydro-2*H*-pyran-yl-Ionen ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}^+$; siehe auch Abbildung S37) – Fragmente, die ursprünglich in den geschützten Molekülen enthalten sind – während nur die bestrahlten Bereiche Fluorfunktionalisierungen aufweisen.

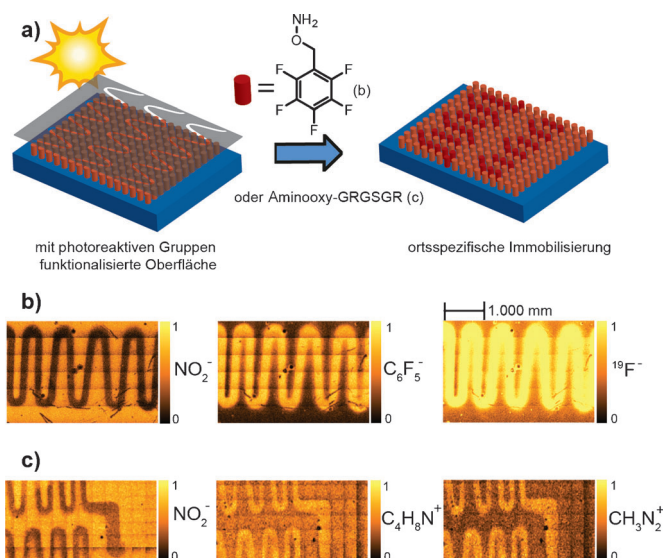


Abbildung 3. a) Partielle Photoentschätzung einer NOTP-funktionalisierten Siliciumoberfläche unter Verwendung einer Schablone und anschließende Musterung mit *O*-[(Perfluorophenyl)methyl]hydroxylamin-Hydrochlorid (schematisch). b) ToF-SIMS-Bilder nach der Photoentschätzung (links) und Oxim-Ligation mit dem fluorierten Marker (Mitte und rechts). c) ToF-SIMS-Bild nach der Photoentschätzung und Oxim-Ligation mit Aminooxy-GRGSGR (Strukturformel siehe die Hintergrundinformationen).

Dies wurde durch die Anwesenheit von F^- - und C_6F_5^- -Ionen gezeigt, nachdem die Oberfläche mit einer Lösung von *O*-[(Perfluorophenyl)methyl]hydroxylamin bedeckt wurde (Abbildung 3b).

Um auch die Anwendbarkeit der kovalenten und räumlich aufgelösten Anbindung von Biomolekülen durch diesen lichtinduzierten Ansatz zu zeigen, wurde eine frisch hergestellte NOTP-funktionalisierte Siliciumoberfläche bestrahlt und mit einer Lösung des GRGSGR-Peptids (2-Aminooxy)acetamido-Gly-Arg-Gly-Ser-Gly-Arg zur Reaktion gebracht. ToF-SIMS zeigte wiederum, dass das Peptid in Form eines Musters, das der Schablone entspricht, auf der Oberfläche immobilisiert war (siehe Abbildung 3c). In diesem Fall basierte die Analyse auf der Anwesenheit von CH_3N_2^+ - und $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ -Ionen, die charakteristische Sekundärionen von Arginin enthaltenen Peptiden darstellen.^[30]

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die hoch effiziente, lichtinduzierte Entschätzung eines neuen *o*-Nitrobenzylacetals bei 370 nm durchgeführt werden kann. Diese Strategie ermöglicht nicht nur die quantitative und sehr schnelle lichtinduzierte Freisetzung von Aldehydfunktionen, sondern auch zum ersten Mal die räumliche Kontrolle über eine Klick-artige Oxim-Ligation unter milden Bedingungen. Wir übertrugen dieses Ergebnis in ein zweistufiges Verfahren zur Herstellung von gemusterten Siliciumoberflächen und wiesen die ortsspezifische Anbindung von Aminooxy-funktionalisierten (Bio)Molekülen anhand der Beispiele eines niedermolekularen Markers und eines Peptid mit ToF-SIMS nach. Wir glauben, dass die vorgestellte Technik auf die Herstellung von funktionellen gemusterten Oberflächen ausgeweitet werden kann, um das Verhalten von Zellen zu

studieren und zu kontrollieren. Die potenziell zelltoxische Nitosogruppe sollte dazu jedoch erst – z. B. mit Glutathion – neutralisiert werden.^[31]

Eingegangen am 8. Juni 2012

Online veröffentlicht am 13. August 2012

Stichwörter: Klick-Chemie · Musterung · Oxim-Ligation · Peptide · Photochemische Entschützung

- [1] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142.
- [2] M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2003**, 5, 1179–1181.
- [3] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2370–2380.
- [4] L. Kammari, T. Šolomek, B. P. Ngoy, D. Heger, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11431–11433.
- [5] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, *Chem. Commun.* **2009**, 3255–3257.
- [6] a) D. D. Young, A. Deiters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2658–2661; b) S. A. Sundberg, R. W. Barrett, M. Pirrung, A. L. Lu, B. Kiangsoontra, C. P. Holmes, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12050–12057.
- [7] A. G. Russell, M. J. Sadler, H. J. Laidlaw, A. Gutierrez-Loriente, C. W. Wharton, D. Carteau, D. M. Bassani, J. S. Snaith, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11, 556–563.
- [8] a) T. Pauloehrl, G. Delaittre, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Polym. Chem.* **2012**, 3, 1740–1749; b) G. Delaittre, T. Pauloehrl, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Macromolecules* **2012**, 45, 1792–1802.
- [9] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4900–4921.
- [10] S. Yamaguchi, S. Yamahira, K. Kikuchi, K. Sumaru, T. Kanamori, T. Nagamune, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 132–135; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 128–131.
- [11] Y. Luo, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2004**, 3, 249–253.
- [12] a) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 441–458; b) D. D. Young, A. Deiters, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 999–1005.
- [13] C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 925–931.
- [14] C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1852–1855; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1816–1819.
- [15] V. Yesilyurt, R. Ramireddy, S. Thayumanavan, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 3094–3098; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 3038–3042.
- [16] J.-M. Schumers, A. Vlad, I. Huynen, J.-F. Gohy, C.-A. Fustin, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, 199–205.
- [17] H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin, P. Theato, *Macromolecules* **2012**, 45, 1723–1736.
- [18] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4581–4595.
- [19] M. C. Pirrung, Y. R. Lee, K. Park, J. B. Springer, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5042–5047.
- [20] G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 506–513.
- [21] a) K. L. Christman, R. M. Broyer, Z. P. Tolstyka, H. D. Maynard, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 2021–2027; b) K. L. Christman, R. M. Broyer, E. Schopf, C. M. Kolodziej, Y. Chen, H. D. Maynard, *Langmuir* **2011**, 27, 1415–1418; c) R. M. Broyer, E. Schopf, C. M. Kolodziej, Y. Chen, H. D. Maynard, *Soft Matter* **2011**, 7, 9972–9977.
- [22] M. Dietrich, G. Delaittre, J. P. Blinco, A. J. Inglis, M. Bruns, C. Barner-Kowollik, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 22, 304–312.
- [23] T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1096–1099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1071–1074.
- [24] a) S. Arumugam, S. V. Orski, J. Locklin, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 179–182; b) S. Arumugam, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15730–15736.
- [25] L. Nebhani, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, 31, 1298–1305.
- [26] B. S. Bodnar, M. J. Miller, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 5746–5764; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5630–5647.
- [27] 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.
- [28] a) P. Prompinit, A. S. Achalkumar, X. Han, R. J. Bushby, C. Wälti, S. D. Evans, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 21642–21647; b) S. A. Alang Ahmad, L. S. Wong, E. ul-Haq, J. K. Hobbs, G. J. Leggett, J. Micklefield, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 2749–2759.
- [29] A. Benninghoven, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1075–1096; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1023–1043.
- [30] a) D. S. Mantus, B. D. Ratner, B. A. Carlson, J. F. Moulder, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1431–1438; b) M. S. Wagner, D. G. Castner, *Langmuir* **2001**, 17, 4649–4660; c) H. E. Canavan, D. J. Graham, X. Cheng, B. D. Ratner, D. G. Castner, *Langmuir* **2007**, 23, 50–56.
- [31] S. Kazanis, R. A. McClelland, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3052–3059.