

# Konformationsanalyse, Photophysik und Photochemie der Gallenpigmente; Bilirubin- und Biliverdindimethylester und verwandte lineare Tetrapyrrole

Von Silvia E. Braslavsky, Alfred R. Holzwarth und Kurt Schaffner\*

Professor Günther O. Schenck zum 70. Geburtstag gewidmet

Das Verhalten der Dimethylester von Bilirubin und Biliverdin (BRE bzw. BVE) und verwandter linearer Tetrapyrrole im elektronischen Grund- und Anregungszustand ist mit photochemischen und spektroskopischen Methoden – Absorption, Fluoreszenz, Fluoreszenzanregung, mediuminduziertem Circulardichroismus und magnetischer Protonenresonanz – untersucht worden. Beide Tetrapyrroltypen bilden in sehr verdünnten Lösungen Gemische von topologischen Isomeren. Bei den Bilirubinen wird die Heterogenität der Lösungen hauptsächlich auf zwei Konformere mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung der A/B- und C/D-Pyromethenonteile zueinander zurückgeführt. Die spektralen Eigenschaften des einen Konformers entsprechen jenen des isolierten Pyromethenon-Grundchromophors, während diejenigen des anderen eine elektronische Kopplung der beiden vermutlich in „Falzziegel“-Anordnung gehaltenen Teilchromophore widerspiegeln. Drehungen um die Einfachbindungen C-5–C-6 und C-14–C-15 beteiligen sich parallel zu den photochemischen Kanälen (*E*→*Z*-Isomerisierung und Lumirubinbildung) an der strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Singulettzustandes. Die weniger bewegliche „Falzziegel“-Komponente wird zusätzlich durch Prozesse desaktiviert, die durch Wasserstoffbrücken ausgelöst werden. Bei den um zwei H-Atome ärmeren Biliverdininen sind die Verhältnisse bedeutend komplexer. Um detailliertere Einsicht in die Mechanismen der strahlungslosen Desaktivierung der Anregungszustände zu gewinnen, wurden die stationären Methoden durch zeitaufgelöste Methoden wie optoakustische Spektroskopie und ultraschnelle Absorptions-(Pump-Probe) und Fluoreszenz-Detektionstechniken (Single-Photon-Timing) ergänzt. Die Lösung enthält eine (Gruppe von) helical gekrümmte(n) all-*Z*, all-*syn*-Spezies sowie Konformere mit gestreckter Anordnung der Ringe B und C um C-10 (*E*-*anti*, *E*-*syn* und *Z*-*anti*). Zwei angeregte Singulettzustände mit Picosekunden-Lebenszeiten sind einer oder zwei gekrümmten Grundzustandsformen zuzuordnen, und zwei bemerkenswert langlebige Nanosekunden-Zustände entsprechen jeweils einer der gestreckten Grundzustandsformen. Zu den Ursachen der strahlungslosen Desaktivierung der Picosekunden-Zustände zählen Drehungen um CC-Einfachbindungen und beim kürzerlebigen Zustand zusätzlich auch die intramolekulare Protonverschiebung zwischen den B/C-Stickstoffatomen. Auch die *Z*→*E*-Phototautomerisierung ist ein wichtiger Desaktivierungskanal. Sie liefert selektiv ein gestrecktes Isomer (10*E*-*anti*), das bei Raumtemperatur thermisch das gekrümmte Ausgangsmaterial zurückbildet. Bei Erhitzen oder Ultraschallbehandlung kann sich ein thermisch auch bei Raumtemperatur stabiles gestrecktes Isomer (10*E*-*syn*) bilden. Diese Form wandelt sich praktisch vollständig in Aggregate (vermutlich Dimere) um, und zwar bei Konzentrationen, bei denen die gekrümmte Komponente noch anscheinend unverändert monomer vorliegt.

## 1. Einleitung<sup>[\*\*]</sup>

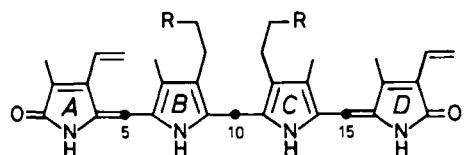
Lineare, d. h. offenkettige Tetrapyrrole (vgl. Schema 1) entstehen biogenetisch aus δ-Aminolävulinsäure über Porphyrine, die oxidativ – in Pflanzen und niederen Algen direkt und in höheren Organismen erst nach Entfernung des

Eisens aus dem Hämin – an einer von zwei ( $\alpha$  und  $\gamma$ ) der vier Methinbrücken gespalten werden<sup>[1]</sup>. Sie sind in der Natur als Abbauprodukte (z. B. neurotoxisches Bilirubin in der Gallenflüssigkeit), als Chromophore (in Biliproteinen, wo sie wichtige photobiologische Funktionen erfüllen) und als Pigmente von Schmetterlingen (z. B. Biliverdin IX $\gamma$  = Pterobilin) zu finden.

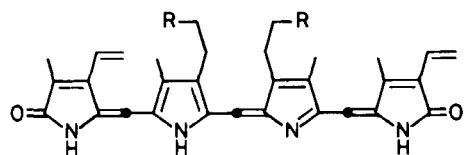
Die linearen Tetrapyrrole verdienen auch aus anderen Gründen großes Interesse. Sie sind bemerkenswert flexible Chromophore, und es ist a priori eine große Zahl von konfigurativ und konformativ verschiedenen sowie tautomeeren Formen derselben Konstitution denkbar. Ferner ist zu erwarten, daß einige Umwandlungen dieser Formen ausschließlich photochemisch, d. h. im lichtangeregten Zustand, stattfinden. Dies trifft besonders auf *E*↔*Z*-Isomerisierungen der exocyclischen Doppelbindungen zu. Andere,

[\*] Prof. Dr. K. Schaffner, Prof. Dr. S. E. Braslavsky, Dr. A. R. Holzwarth  
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie  
Stiftstraße 34–36, D-4330 Mülheim a. d. Ruhr

[\*\*] Abkürzungen: BVE-H<sup>+</sup>, monoprotonierter Biliverdindimethylester; D<sub>UV</sub>/D<sub>VIS</sub>, Verhältnis der Dipolstärken von UV- und Vis-Absorptions- und Fluoreszenzanregungsbanden; DPL, Dipalmitoyllecithin; EYL, Eigelb-Lecithin; LIOAS, laserinduzierte optoakustische Spektroskopie; NBVE-IX $\delta$ , Neobiliverdin-IX $\delta$ -dimethylester; PP, Picosekunden-Pump-Probe; SA, Serumalbumin; SICD, medium(Lösungsmittel, Membran)-induzierter Circulardichroismus; SPT, Single-Photon-Timing; ZnBVE, Zink-Komplex von Biliverdindimethylester; weitere Abkürzungen siehe auch Schemata 1, 2, 4, 6 und 8.



BR ( $R = CO_2H$ ) Bilirubin (IX $\alpha$ )  
BRE ( $R = CO_2CH_3$ ) Bilirubindimethylester (IX $\alpha$ )



BVE ( $R = CO_2CH_3$ ) Biliverdindimethylester (IX $\alpha$ )

Schema 1. Konstitutionsformeln von BR, BRE und BVE [\*].

z. B. Drehungen um CC-Einfachbindungen, sind typische Grundzustandsprozesse, und wiederum andere, z. B. intramolekulare Übertragungen von Protonen oder Wasserstoffatomen, sind a priori im angeregten Zustand und im Grundzustand denkbar. Es ist ferner zu beachten, daß im durchkonjugierten Biliverdindimethylester eine Protonübertragung zwischen den Kohlenstoffatomen der zentralen Ringe B und C lediglich das Grundzustands-Gleichgewicht zwischen zwei sehr ähnlichen Tautomeren vorübergehend verschiebt. Die direkte Erfassung einer solchen Änderung bei nur zwei von mehreren Komponenten kann sich recht schwierig gestalten. Vielleicht ist die Charakterisierungsmöglichkeit sogar auf einen indirekten Nachweis als Kanal für die strahlungslose Desaktivierung beschränkt.

In Anbetracht der besonderen Strukturmerkmale und der biologischen Bedeutung der linearen Tetrapyrrole ist deren Photophysik und Photochemie in den letzten Jahren eingehend untersucht worden<sup>[2]</sup>. So erwies sich beispielsweise die  $Z \rightarrow E$ -Photoisomerisierung von BR als Schlüsselreaktion in der routinemäßig angewandten Phototherapie der Neugeborenen-Gelbsucht (neonatale Hyperbilirubinämie)<sup>[3]</sup>, und BVE diente als Chromophormodell für das photochrome Pflanzenchromoprotein Phytochrom und für Lichtsammel-(Antennen-)Pigmente von Cyanobakterien, Rotalgen und Kryptophyten.

Im Folgenden berichten wir über die Konformation von BRE, BVE und verwandten Verbindungen in Lösung sowie über photophysikalische und photochemische Prozesse dieser Verbindungen, die wir in den letzten Jahren untersucht haben. Bei Raumtemperatur in flüssiger Lösung erscheinen die durchkonjugierten linearen Tetrapyrrole, z. B. BVE, photochemisch auf den ersten Blick wenig reaktiv; die Quantenausbeuten von Lumineszenz<sup>[4-6]</sup> und „Intersystem Crossing“<sup>[5, 7, 8]</sup> sind sehr klein. Strahlungslose Energieabbauprozesse, sogenannte „Energy Wasting“-Ka-

näle, scheinen daher in dieser Molekülklasse von besonderer Bedeutung zu sein. Es sei daran erinnert, daß elektronisch angeregte Moleküle auf verschiedene Weise strahlungslos desaktiviert werden können: Durch „Intersystem Crossing“, d. h. Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Spin-Multiplizität (z. B. von einem angeregten Singulett- zum Triplettzustand), durch „Internal Conversion“, d. h. Übergänge zwischen Zuständen gleichen Spins (z. B. vom ersten angeregten Singulett- zum Grundzustand), und schließlich durch photochemische Reaktionen. „Energy Wasting“ bedeutet, daß dabei wieder die Ausgangsverbindung im Grundzustand entsteht. Voraussetzung im Fall von photochemischen Reaktionen ist daher, daß das Photoprodukt thermisch labil ist und spontan das Ausgangsmaterial zurückbildet. Die Probleme bei der Untersuchung solcher Vorgänge und der Umstand, daß diese Verbindungen in Lösung meist Gemische von Komponenten mit unterschiedlichen photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften bilden, gestalteten die Arbeiten besonders anforderungsreich und spannend. Solche Untersuchungen haben zum Ziel, die Faktoren kennenzulernen, welche die spezifischen Relaxationsprozesse kontrollieren, d. h. die Kanalisierung der Anregungsenergie in Emissionsprozesse sowie strahlungslose und photochemische Desaktivierungsprozesse.

## 2. Die Rubine

### 2.1. Spektroskopie von Bilirubindimethylester in Lösung. Das gleichzeitige Auftreten mehrerer Formen

Durch eine Kombination von Absorptions-, Lumineszenz-, SICD- und  $^1H$ -NMR-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß BRE je nach Konzentration, Lösungsmittel und Temperatur in mehreren aggregierten sowie monomeren Formen (Konformeren und/oder Tautomeren) vorliegt<sup>[9]</sup>. Die solvatochromen und thermochromen Eigenschaften von BR und seinem Dianion in Absorption und Fluoreszenz<sup>[9-12]</sup> deuten darauf hin, daß sie sich qualitativ ähnlich wie BRE verhalten. Wie die Figuren 1-3 erkennen lassen, nimmt BRE in verdünnter Lösung (ca.  $10^{-5}$  M) mindestens zwei Formen ein<sup>[9]</sup>. Es ist nicht auszuschließen, daß eine oder beide dieser Formen eher Gruppen gleichzusetzen sind, die jede aus spektral und daher wohl auch konformativ ähnlichen Komponenten zusammengesetzt sind. Wir werden im folgenden dennoch lediglich von zwei „Formen“ oder „Spezies“ sprechen.

Die Absorptionsspektren von BRE bei Raumtemperatur zeigen je nach Lösungsmittel Banden mit recht unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen. In Ethanol z. B. treten ein Maximum bei 448 nm und eine Schulter bei 408 nm auf, in 2-Methyltetrahydrofuran ein Maximum bei 397 nm und eine Schulter bei 445 nm (Fig. 1B). Die Fluoreszenzspektren hingegen sind in diesen Lösungsmitteln bei gleicher Temperatur einander sehr ähnlich (Fig. 1A und B). Die Emission der einen Spezies – mit  $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 450$  nm bei Raumtemperatur und  $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 481$  nm bei 77 K – herrscht in Ethanol im gesamten Temperaturbereich vor. Die andere – mit  $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 395$  bzw. 420 nm – ist im gleichen Lösungsmittel erst bei 77 K, und dann nur schwach, wahrnehmbar (Fig. 2). Beachtliche Anteile beider Spezies an der Gesamtflu-

[\*] Das Kohlenstoffgerüst der Gallenpigmente wird hier nach den vorläufigen IUPAC-Regeln [Pure Appl. Chem. 51 (1979) 2251] nummeriert; die Fischer'sche IX $\alpha$ -Klassifizierung von BR, BRE und BVE ist weggelassen worden. Für die Konstitutionsisomere hingegen werden die Trivialnamen beibehalten. Ferner werden all-Z, all-syn-Konfigurationen nicht spezifiziert, während Diastereomere mit mindestens einer E-Doppelbindung und/oder anti-Anordnung der Stickstoffatome als solche gekennzeichnet sind.

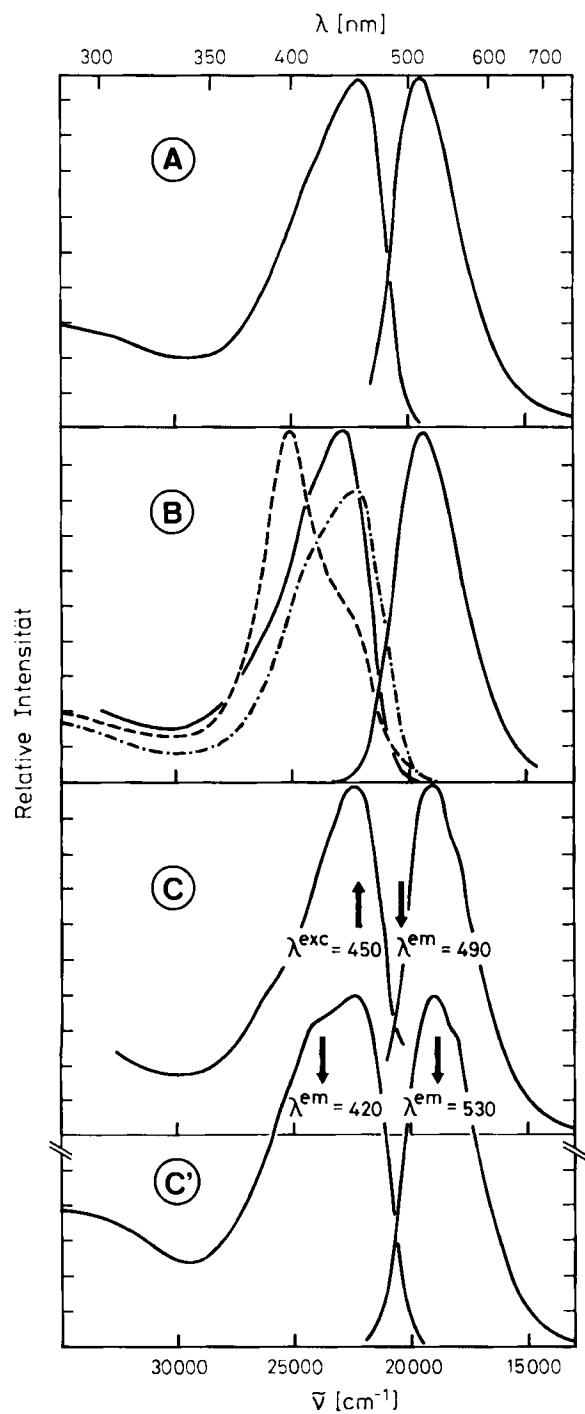


Fig. 1. Korrigierte Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektren von BRE bei Raumtemperatur in Ethanol (A), 2-Methyltetrahydrofuran (B) und Milchsäureethylester (C und C'). Während die Spektren A und B im wesentlichen unabhängig von  $\lambda^{\text{exc}}$  und  $\lambda^{\text{em}}$  sind, zeigen C und C', die mit unterschiedlichen  $\lambda^{\text{exc}}$  und  $\lambda^{\text{em}}$  aufgenommen wurden, Differenzen, die auf das Vorliegen eines Gemisches hinweisen. In B sind für Vergleichszwecke auch die Raumtemperatur-Absorptionsspektren in Ethanol (---) und in 2-Methyltetrahydrofuran (—) wiedergegeben [9].

reszenz treten hingegen in Milchsäureethylester bei Raumtemperatur (Fig. 1C und C') und in 2-Methyltetrahydrofuran bei 77 K (Fig. 2) auf<sup>[9]</sup>.

Bei der Beurteilung quantitativer Aspekte der Fluoreszenz muß berücksichtigt werden, daß der Anteil des Grundzustands einer fluoreszierenden Komponente an einem Gemisch, d. h. ihr Molenbruch  $X_i$ , oft nur schwer zu ermitteln ist. So ist zwar die relative Fluoreszenzintensität leicht messbar; da sie proportional zum Produkt aus  $X_i$  und indi-

vidueller Fluoreszenz-Quantenausbeute,  $\Phi_{\text{f}(i)}$ , ist, setzt eine Bestimmung von  $X_i$  aber auch die Kenntnis von  $\Phi_{\text{f}(i)}$  voraus.  $\Phi_{\text{f}(i)}$  ist aber in Untersuchungen, wie sie hier zur Diskussion stehen, meist nicht oder nur schwer zugänglich.

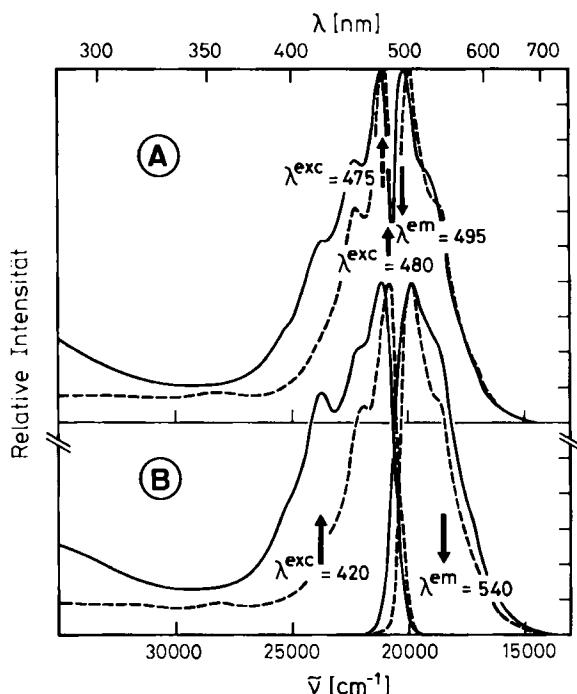


Fig. 2. Korrigierte Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektren von BRE bei 77 K in Ethanol (---) und in 2-Methyltetrahydrofuran (—). A:  $\lambda^{\text{exc}} = 475$  (Ethanol) und  $480$  nm (2-Methyltetrahydrofuran),  $\lambda^{\text{em}} = 495$  nm (beide Lösungsmittel); B:  $\lambda^{\text{exc}} = 420$  nm,  $\lambda^{\text{em}} = 540$  nm (beide Lösungsmittel) [9].

Fluoreszenzlebenszeit-Bestimmungen und SICD-Messungen in optisch aktiven Lösungsmitteln bestätigen das Vorliegen von zwei BRE-Formen<sup>[9]</sup>. So betragen z. B. in Ethanol bei 77 K die Lebenszeiten der dualen Emission 1.9 ns für die Haupt- und 11.9 ns für die Nebenkomponente. Das Verhältnis der Lebenszeiten kehrt sich bei Raumtemperatur um. Aus den Daten in Tabelle 1 läßt sich für die Nebenkomponente, die „395 nm“-Spezies, eine Fluoreszenz-Quantenausbeute abschätzen, die etwa zehnmal kleiner ist als diejenige, die für die Hauptkomponente, die „450 nm“-Spezies, gemessen worden war. Somit muß auch die Lebenszeit der Nebenkomponente entsprechend kürzer sein. Diejenige BR-Form, die offenbar der „450 nm“-Form bei BRE entspricht, hat in organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur eine Lebensdauer von etwa 20 ps<sup>[13, 14]</sup>. Eine Emission mit einer Lebensdauer im Nanosekunden-Bereich, die für BR in verschiedenen Medien beobachtet und den (E,Z)-Photoisomeren zugeordnet wurde<sup>[13, 15]</sup>, dürfte eher als Folge von „Überbestrahlungen“ sekundären Photoprodukten wie Lumirubin und Isolumirubin entstammen (siehe Abschnitt 2.3 und Schemata 3 und 4). Für die (E,Z)-Isomere wurden sehr viel kleinere Fluoreszenz-Quantenausbeuten als für BR gemessen<sup>[14]</sup>. Die Isomere sollten demnach auch eine kürzere Lebensdauer haben.

Bei Raumtemperatur in (S)-(–)-Milchsäureethylester und (R,R)-(–)-2,3-Butandiol, in denen die Absorptionen von BRE zwischen den in Figur 1B wiedergegebenen Extremen liegen, zeigt das SICD-Spektrum im sichtbaren Bereich eine Doppelbande mit entgegengesetzten Vorzeichen

Tabelle 1. Fluoreszenz-Quantenausbeuten einiger Rubine, Verdine und Modellchromophore in Lösung [a].

Verb.	siehe Schema	Konzentration [10 <sup>5</sup> mol·L <sup>-1</sup> ]	$\lambda^{\text{exc}}$ [nm]	Temp. [K]	$\Phi_f$	Lit.
IPRE	2	10	410	298	0.04	[18]
IPRE	2	10	410	77	0.81	[18]
PRE	2	10	410	298	0.0015	[18]
PRE	2	10	410	77	0.37	[18]
BR	1	50	430	293	0.0005 [b]	[20]
BR	1	50	430	293	0.33 [c]	[20]
BRE	1	0.2	390	298	0.0076	[4]
BRE	1	0.4	390	77	0.31	[4]
1	2	0.8	390	298	0.00096	[4]
1	2	0.16	390	77	0.44	[4]
BVE	1	3	390	298	0.00011 [d]	[4]
BVE	1	3	390	77	0.00050 [d]	[4]
BVE	1	3	593	298	0.00057 [e]	[67b]
BVE	1	[f]	593	298	0.004 [d]	[67b]
BVE	1	[g]	593	298	0.0023 [d]	[67b]
BVE-H <sup>+</sup>	3 [h]	390	298	0.00027	[4]	
BVE-H <sup>+</sup>	3 [h]	390	77	0.026	[4]	
ZnBVE	3.3	593	298	0.036	[67b]	
4	7	1.2	430	298	0.00026	[4]
4	7	1.2	430	77	0.0051	[4]
5	7	0.14	371	298	0.00043	[4]
5	7	0.028	371	77	0.088	[4]
6 [i]	7	0.29	390	298	0.31	[4]
6	7	0.29	390	77	0.37	[4]

[a] Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Messungen in Ethanol ausgeführt. 1: Neoxanthobilirubinsäuremethylester; 4: 4,4'-Diethyl-3,3',5,5'-tetramethyl-4-pyrromethen. [b] In Ethylacetat. [c] In Poly(methylmethacrylat). [d]  $\Phi_f$ -Wert, der annähernd dem (noch kleineren) Wert der helical gekrümmten BVE-Form entspricht. [e]  $\Phi_f$ -Wert, der infolge weniger selektiver Anregung als in [d] einem BVE-Gemisch mit einem größeren Anteil an gestreckten Komponenten entspricht. [f] In EYL-Liposomen unmittelbar nach der Inkubation mit BVE. [g] In DPL-Liposomen nach der Inkubation mit BVE. [h] [HCl] ca. 10<sup>-3</sup> M. [i] Analoge Daten von Difluorborilypyrromethen-Komplexen siehe [21].

(Fig. 3A und B). Während die Wellenlängenlagen der SICD-Maxima praktisch unabhängig vom Lösungsmittel sind, werden relative Intensitäten und Vorzeichen vom Lösungsmittel beeinflußt. Aufgrund dieses Befundes ist es naheliegend, diese Banden verschiedenen Formen des Substrats zuzuordnen. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, daß eine der BRE-Formen einen inhärenten bisignaten Cotton-Effekt<sup>[1]</sup> hat und daß diese Doppelbande von einer einfachen CD-Bande der zweiten BRE-Form überlagert wird. Die beiden Cotton-Effekte mit wiederum entgegengesetzten Vorzeichen, die auch den BR-Serumalbamin-Komplex kennzeichnen, könnten von einer konformativen Inhomogenität von BR herrühren, da die Komplexierung möglicherweise nur an einer Hälfte des Moleküls stattfindet<sup>[11]</sup>. Dieser Gesichtspunkt ist allerdings noch strittig<sup>[16]</sup>. Es könnte damit eine nur beschränkte Immobilisierung verknüpft sein, die noch immer einige Konformationen zuließe. Entsprechend einem früheren Vorschlag kann es sich aber auch um eine Excitonen-Kopplung mit bisignatem Cotton-Effekt handeln<sup>[17]</sup>. Diese Alternative ließe sich besser mit den Absorptionsspektren vereinbaren, nach denen die Population von gelöstem und SA-gebundem BR homogener als die Population von BRE in den diversen Lösungsmitteln ist<sup>[9]</sup>.

[\*] Darunter versteht man ein Couplet, d.h. zwei aufeinanderfolgende Cotton-Effekte mit entgegengesetzten Vorzeichen, wie sie im CD von gekoppelten Oszillatoren mit genügend großem elektrischem Übergangsmoment auftreten; vgl. dazu [82].

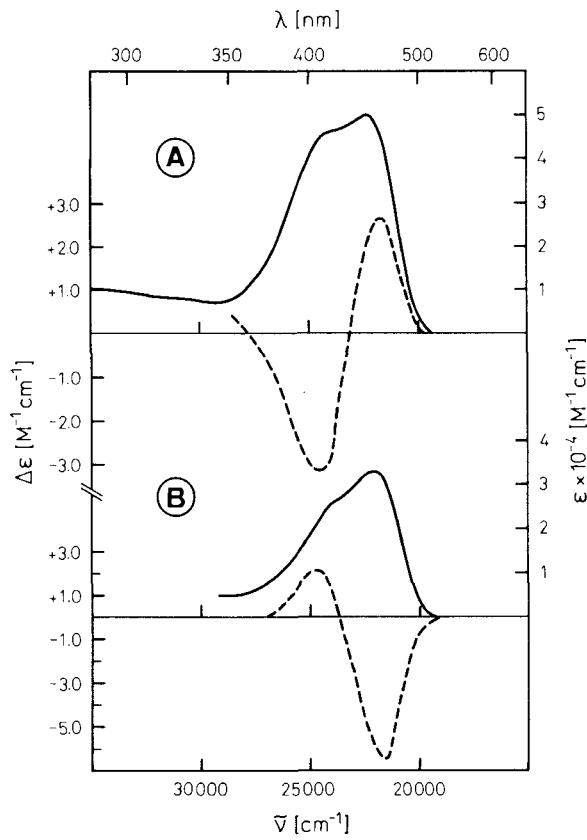
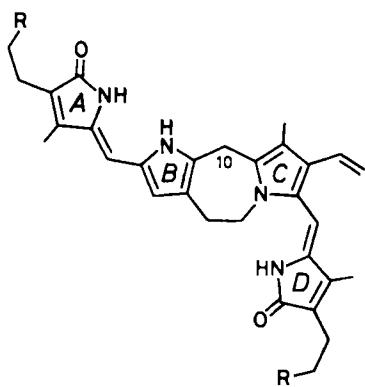


Fig. 3. Absorptions- (—) und SICD-Spektren (---) von BRE bei Raumtemperatur in ④ (S)-(-)-Milchsäureethylester und ⑤ (R,R)-(-)-2,3-Butandiol [9].

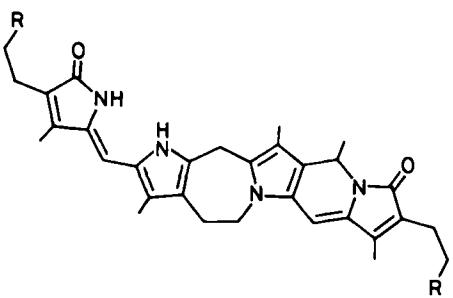
## 2.2. Die Eigenschaften der Grundzustandsformen. Phorcarubin- und Isophorcarubindimethylester

Für eine Beurteilung der Eigenschaften der Grundzustandsformen von BRE ist es vorteilhaft, zuerst die analogen Resultate mit PRE und IPRE (Schema 2) zu erläutern<sup>[18]</sup>. Beide Isomere haben weniger flexible Tetrapyrrol-Grundgerüste als BRE. Die zusätzliche Brücke zwischen den Ringen B und C hält die Pyrromethenon-Teilstrukturen in einer gestreckten (aber nicht notwendigerweise planaren) Form mit *anti*-Anordnung der mittleren Stickstoffatome fest. Während die beiden Chromophore in PRE in ihrer konformativen und konfigurativen Beweglichkeit um die Bindungen (C-5–C-6 und C-14–C-15) noch nicht weiter gehindert sind, ist eine solche Einschränkung in einem der Pyrromethenone von IPRE gegeben: Durch intramolekulare Cyclisierung sind die Ringe C und D in *Z-anti*-Form fixiert. Die Koaleszenz der NMR-Signale der C-10-Protonen von PRE und IPRE bei Raumtemperatur zeigt, daß der zentrale Siebenring etwas konformative Beweglichkeit beibehalten hat. Im Gegensatz dazu muß der tricyclische C/D-Chromophor von IPRE starrer sein, und nur der A/B-Teil kann eine ähnliche Flexibilität wie in BRE und im Modell-Pyrromethenon 1 aufweisen.

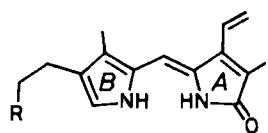
Die Starrheit des IPRE-Gerüstes spiegelt sich in einer bereits bei Raumtemperatur leicht strukturierten UV-Absorption wider, während das gleichzeitige Auftreten mehrerer Konformere bei den beweglicheren Bilirubinen Anlaß zu breiten und unstrukturierten Banden gibt. Noch eindrücklicher geht die Starrheit aus einem Vergleich der Fluoreszenz-Quantenausbeuten der Rubine und von 1 in



PRE Phorcarubindimethylester



IPRE Isophorcarubindimethylester



1

$R = CO_2CH_3$

Schema 2. Konstitution von PRE und IPRE mit eingeschränkter konformativer Flexibilität sowie der Modellverbindung 1 für die Ring-A/B-Teilstruktur von BRE.

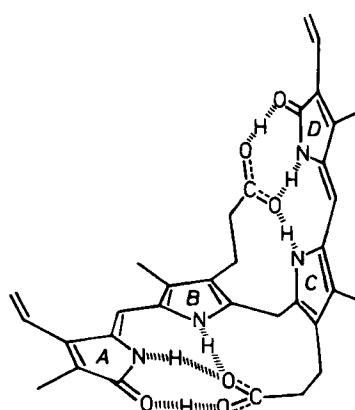
flüssiger Lösung hervor (Tabelle 1). IPRE weist von allen Rubinen die weitaus höchste Fluoreszenzausbeute auf. Dies kann dem C/D-Chromophor und dessen Mangel an konformativer Flexibilität zugeschrieben werden. Nach Untersuchungen an anderen Chromophorsystemen<sup>[19]</sup> geben konformative Freiheitsgrade Anlaß zu sehr effizienten Mechanismen für die strahlungslose Desaktivierung (siehe auch Abschnitt 3<sup>[4]</sup>).

Die Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungs-Eigenschaften von PRE und IPRE gleichen qualitativ denjenigen von BRE. In jedem Fall stammen sie wiederum von mindestens zwei emittierenden Spezies. Die Zusammensetzung dieser Gemische hängt stark von Konzentration, Lösungsmittel und Temperatur ab<sup>[9, 18]</sup>. Welche beiden Formen bei niedrigen Konzentrationen vorherrschen, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Immerhin dürfte in allen Fällen eine Konformationsisomerie am wahrscheinlichsten sein. Eine Lactam-Lactim-Tautomerie,

für BRE bereits ausgeschlossen<sup>[22, 23]</sup>, erscheint weniger wahrscheinlich, und Aggregate, wie sie bei hinreichend hohen Konzentrationen in apolaren Lösungsmitteln auftreten<sup>[23]</sup>, kommen bei den hohen Verdünnungen, in denen BRE, PRE und IPRE untersucht wurden, ebenfalls nicht in Betracht<sup>[9, 18]</sup>. Aus der Übereinstimmung in Fluoreszenz und Fluoreszenzanregung wurde geschlossen<sup>[18]</sup>, daß die spektrale Heterogenität einen allen drei Verbindungen gemeinsamen Ursprung hat. Er wird unterschiedlichen Anordnungen der Teilchromophore A/B und C/D zugeschrieben (das in PRE und IPRE Teil des noch immer beweglichen siebengliedrigen Ringes ist; siehe oben). Unterschiedliche Anordnungen der Ringe zueinander innerhalb der A/B- und C/D-Chromophore kommen als alternative Erklärung nicht in Betracht, weil bei Raumtemperatur der Beitrag des nicht-cyclisierten Pyrromethenons zur gesamten Emission vernachlässigbar klein ist. Es ergibt sich somit die wichtige allgemeine Folgerung, daß *der Hauptbeitrag zur Heterogenität der Fluoreszenz auf den unterschiedlichen Anordnungen der Pyrromethenon-Einheiten (Ringe A/B und C/D) zu einander beruht*.

In Einklang mit dieser Folgerung ähneln die spektralen Eigenschaften der „395 nm“-Spezies von BRE jenen des isolierten Pyrromethenon-Chromophores 1<sup>[24]</sup>. Dementsprechend wurde dieser Form eine räumliche Anordnung zugeschrieben, in der die elektronischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Molekülhälften minimal sind<sup>[25]</sup>. Die Eigenschaften der „450 nm“-Komponente können hingegen nicht direkt aus den Spektren der Teilchromophore extrapoliert werden. Den Spektren dieser zweiten Komponente muß vielmehr eine elektronische Kopplung der beiden Teilchromophore von BRE zugrunde liegen, die durch eine besondere räumliche Anordnung zustande kommen dürfte. Analoge Zuordnungen lassen sich auch für die beiden Spezies von BR vornehmen.

Berechnungen<sup>[17]</sup> von SA-gebundenem BR, ausgehend von CD-Daten und Absorptionswerten, die im wesentlichen der „450 nm“-Absorption entsprechen, sagten eine Konformation voraus, die später in kristallinem BR als „Falzziegel“-Anordnung gefunden wurde (Schema 3)<sup>[26]</sup>. Wie in Abschnitt 2.4 dargelegt, dürfte diese auch ungefähr die räumliche Anordnung der elektronisch gekoppelten



Schema 3. „Falzziegel“-Konformation von BR im Kristall mit intramolekularen Wasserstoffbindungen [26]. Eine ähnliche Konformation weisen vermutlich auch die „450 nm“-Formen von BR und BRE in organischen Lösungsmitteln auf.

„450 nm“-Spezies von BR und BRE in organischen Lösungsmitteln wiedergeben.

### 2.3. Die Photochemie

Unter anaeroben Bedingungen finden vorwiegend zwei Photoreaktionen statt<sup>[20, 27-33]</sup>. Für BR und BRE sind eine rasche  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung der exocyclischen CC-Doppelbindungen, analog wie bei ähnlichen Tetrapyrrolen und Modellverbindungen<sup>[34]</sup>, nachgewiesen worden, und für BR zudem der weniger effiziente Ringschluß zu den Lumiprodukten. Andere Photoreaktionen, z. B. Additionen, Bildung von Stellungsisomeren und oxidativer Abbau von BR, stören die  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung und die Lumiproduktbildung nicht, da sie nahe Raumtemperatur mit verhältnismäßig geringer Quantenausbeute verlaufen. Überdies setzt der photooxidative Abbau von BR die Anwesenheit von Luftsauerstoff voraus<sup>[35]</sup>.

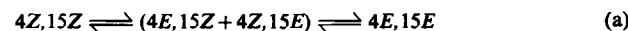
Die Konfigurationsumkehr an den exocyclischen Doppelbindungen von BR findet aus dem tiefstliegenden Singulett-Anregungszustand statt. Die Befunde können wie folgt zusammengefaßt werden:

1) Bei Temperaturänderungen verhalten sich die Quantenausbeuten der Fluoreszenz und der  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung von SA-gebundenem BR reziprok. Die Fluoreszenzausbeute steigt von etwa 0.0002 bei Raumtemperatur auf 0.44 bei 77 K an, während die Isomerisierungsausbeute von 0.20 auf  $\leq 0.01$  fällt<sup>[14]</sup>.

2) Bei Raumtemperatur variiert die Ausbeute an triplettangeregtem BR stark mit dem Lösungsmittel, ist aber durchweg niedriger als die Ausbeute der Isomerisierung<sup>[5, 7, 8]</sup>. Unter den gleichen Bedingungen sind die Fluoreszenzausbeuten etwa zehnfach niedriger<sup>[5, 14]</sup>. Daraus läßt sich ersehen, daß die elektronische Energie von singulettangeregtem BR bei dieser Temperatur kaum über „Intersystem Crossing“ zum Triplettzustand, sondern vorwiegend über andere strahlungslose Kanäle abgebaut wird.

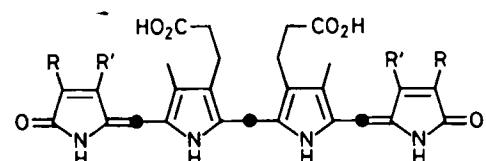
3) Bei BR in organischen und wässrigen Lösungsmitteln, in Vesikeln und an SA gebunden ist bei 295 K der  $S_1$ -Zustand mit einer Lebensdauer im Bereich von 12-70 ps durch Fluoreszenz- ( $\lambda^{em} = 525$  nm)<sup>[13]</sup> und Absorptionsdetektion<sup>[14]</sup> beobachtet worden. Lebenszeiten der gleichen Größenordnung wurden auch für BR-III $\alpha$  und das Pyromethenon 2 (Schema 4) erhalten<sup>[13]</sup>. Die Zuordnung des Absorptionszerfalls zum  $S_1$ -Anregungszustand wird für den BR-SA-Komplex durch die parallele Temperaturabhängigkeit dieses Zerfalls und der Fluoreszenz-Quantenausbeute gestützt<sup>[14]</sup>.

Die drei konfigurationsisomeren Photoprodukte von BR<sup>[31, 32]</sup> und BRE<sup>[28, 29, 36]</sup> sind unbeständig und wandeln sich sowohl photochemisch als auch thermisch wieder in den Ausgangsstoff mit (4Z,15Z)-Konfiguration um. Diese Umwandlungen können vorerst wie folgt zusammengefaßt werden<sup>[31]</sup>.

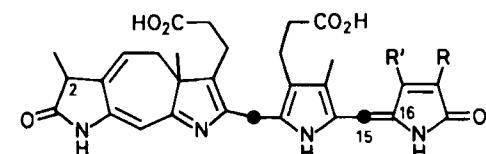


Die anaeroben photochemischen Reaktionen von gelöstem und SA-gebundenem BR wurden eingehend untersucht. Die Resultate unterscheiden sich qualitativ nicht. Während sich beim symmetrischen BR-III $\alpha$  schnell ein

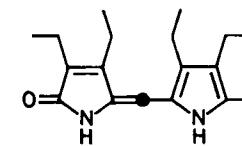
photostationäres Gleichgewicht mit den (E,Z)- und (E,E)-Isomeren einstellt<sup>[31]</sup>, wird die  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung von BR und BR-XIII $\alpha$  von einem langsameren Photoring-schluß zu den an C-2 epimeren Lumirubinen LR und ILR begleitet<sup>[33]</sup> (Schema 4). Bei weiterer Belichtung der Lumirubine bildet sich ein  $E \rightleftharpoons Z$ -Gleichgewicht an der 15,16-Doppelbindung ohne Rückbildung der Bilirubin-Ausgangsverbindungen. Da die Lumirubinbildung durch molekularen Sauerstoff nicht beeinträchtigt wird, ist anzunehmen, daß es sich hier ebenfalls um eine Reaktion des angeregten Singulettzustandes handelt. (Aufgrund unveröffentlichter Resultate wurde ferner postuliert<sup>[33]</sup>, daß der Ringschluß ein Einphotonen-Prozeß ist, der die (E,Z)-Bilirubine nicht als Vorstufen erfordert.)



BR-III $\alpha$  ( $R = CH = CH_2, R' = CH_3$ ) Bilirubin III $\alpha$   
BR-XIII $\alpha$  ( $R = CH_3, R' = CH = CH_2$ ) Bilirubin XIII $\alpha$



(E)- und (Z)-LR Lumirubine  
(E)- und (Z)-ILR Isolumirubine (C2-Epimere)

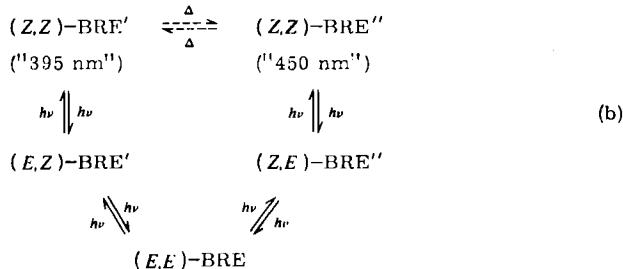


2

Schema 4. Konstitution von BR-III $\alpha$ , BR-XIII $\alpha$ , den photochemisch aus BR und BR-XIII $\alpha$  gebildeten Lumiprodukten LR bzw. ILR sowie des Pyromethenons 2.

Im Hinblick auf die heterogene Zusammensetzung von BRE-Lösungen (Abschnitte 2.1 und 2.2) überrascht es nicht, daß die anaerobe Photochemie von der Anregungswellenlänge abhängt<sup>[36]</sup>. Die Photoisomerisierung der „395 nm“-Form verläuft mit einer kleineren Quantenausbeute als diejenige des „450 nm“-Konformers. Überdies sind die Produktverteilungen, die bei sehr kleinen Umsätzen aus den beiden Verbindungen resultieren, sowie die Reaktivität der Produkte in sekundären photochemischen Umsetzungen unterschiedlich. Die Ergebnisse lassen sich zusammenfassen, indem die Reaktionsgleichung (a) zum Gleichungssystem (b) erweitert wird. (b) gibt die einfachsten noch möglichen Zusammenhänge für die  $E \rightleftharpoons Z$ -Isomerisierungen der „395 nm“- und „450 nm“-Formen von BRE in Lösung wieder. Zusätzliche Umwandlungen, z. B. (Z,Z)-BRE  $\rightleftharpoons$  (Z,E)-BRE etc., die in (b) diagonal einzufü-

zeichnen wären, sind ebenfalls denkbar, solange sich die Selektionierung der Reaktionswege nicht ändert.



## 2.4. Strahlungslose Desaktivierung („Internal Conversion“)

Bei Raumtemperatur findet die direkte Desaktivierung des ersten angeregten Singulettzustandes von BR und BRE überwiegend durch photochemische und thermische Rotationen um die C-5- und C-15-Brücken statt. Dies folgt einerseits aus der Quantenausbeute der gesamten Photoreaktion, die mit der  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung einer der Doppelbindungen verbunden ist (d. h. unter Berücksichtigung der Bildung von  $(Z,Z)$ - und  $(E,Z)$ -Isomeren aus dem verdrillten Singulettanregungszustand,  $'S_1$ ; vgl.  $k_1$  und  $k_2$  in Fig. 4) und in Lösung nicht viel mehr als etwa 0.4 betragen dürfte<sup>[27,37,38]</sup>. Andererseits wird ein großer Teil des verbleibenden strahlungslosen Energieabbaus (fast 0.6 bei vernachlässigbarer Emission) mit sinkender Temperatur oder beim Einbau in eine starre Matrix in Fluoreszenz umgewandelt (siehe Tabelle 1). Damit kann auf einen beträchtlichen Anteil von Drehungen um CC-Einfachbindungen in flüssigen Medien bei Raumtemperatur geschlossen werden; in starren Matrizen sind solche Rotationen praktisch unterbunden. Die Rotationen bleiben auf die C-5- und C-15-Brücken, d. h. auf Konformationsänderungen innerhalb der Pyromethenon-Subchromophore, beschränkt. Die Beweise dafür sind zum Teil bereits in den Abschnitten 2.1 und 2.2 aufgeführt worden. Es zählen dazu das Emissionsverhalten bei Temperatur- oder Viskositätsänderungen und die Ähnlichkeit mit den Eigenschaften von PRE und IPRE. Ferner steigen die Fluoreszenz<sup>[39]</sup> und Singulett-Lebensdauer sowie Singulett-Ausbeute<sup>[15]</sup> in BR, wenn die intramolekularen Wasserstoffbindungen, die ähnlich wie in der Kristallstruktur<sup>[26]</sup> (Schema 3) vermutlich auch in organischen Lösungsmitteln vorliegen<sup>[12,40-42]</sup>, gelöst werden. Resultate mit SA-gebundenem BR bestätigen diese Folgerungen. Bei Raumtemperatur erhöht sich die Quantenausbeute der Fluoreszenz, im Vergleich zur Ausbeute in Chloroformlösung, um einen Faktor von etwa 25, wenn BR an SA komplexiert wird<sup>[14,28]</sup>. Die Photoisomerisierung hingegen bleibt dabei praktisch unverändert. Die Fluoreszenzausbeute des BR-SA-Systems bei Raumtemperatur beträgt zwar nur ungefähr ein Fünftel derjenigen in Ethanol bei 77 K, doch sind die Trends bei SA-Komplexierung und Abkühlung die gleichen. Überdies wird die Photoisomerisierung offenbar nicht auf gleiche Weise durch Umgebungs faktoren beeinflußt. Eine analoge Situation dürfte auch beim Pyromethenon 1 vorliegen, da sich dessen Fluoreszenzausbeute bei der Komplexierung an SA um einen ähnlichen Betrag erhöht<sup>[16]</sup>.

Diese Überlegungen betreffen in erster Linie die „450 nm“-Spezies, die unter den Untersuchungsbedingungen bei BR und BRE überwiegt. Die relativen Fluoreszenz-Quantenausbeuten beider BRE-Spezies (niedrig für die „395 nm“- und hoch für die „450 nm“-Form bei Raumtemperatur) und ihre entgegengesetzten Trends mit fallender Temperatur weisen darauf hin, daß die elektronisch gekoppelte „450 nm-Form“ starrer ist. Die verminderte konformative Beweglichkeit dieser Spezies ist bei BR möglicherweise darauf zurückzuführen, daß sie analog zur „Falzziegel“-Konformation in Schema 4 durch intramolekulare Wasserstoffbindungen fixiert ist. Zur Öffnung der insgesamt sechs Wasserstoffbrücken von BR ist in Chloroform aufgrund von NMR-Untersuchungen eine Aktivierungsenergie von ca. 75 kJ/mol aufzubringen<sup>[42]</sup>. Die intramolekulare Wasserstoffverbrückung schränkt auch die Rotationsfreiheitsgrade des Moleküls erheblich ein. Außerdem wird die zur  $Z \rightarrow E$ -Photoisomerisierung führende Verdrillung der Doppelbindung erschwert<sup>[20,28]</sup>. Die Energiebarriere beträgt 30 kJ/mol<sup>[43]</sup>. Im SA-gebundenen BR, in dem Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Molekühlhälften fehlen, sinkt sie auf 23 kJ/mol<sup>[20]</sup>. Die Vermutung liegt nun nahe, daß auch bei der Desaktivierung des Anregungszustandes der „450 nm“-Form von BRE ähnliche Einschränkungen auftreten, wenn auch nicht so einschneidend, weil der Diester weniger Wasserstoffbindungen enthält.

Als weiterer Desaktivierungskanal bieten sich der „450 nm“-Spezies schließlich Prozesse in den Wasserstoffbrücken an, die reversiblen Protonübertragungen ähnlich sind und die, da weit weniger temperatur- und viskositätsabhängig als Drehungen um Einfachbindungen, bei tiefer Temperatur an Bedeutung gewinnen dürften. Bei der flexibleren „395 nm“-Form, die keine intramolekularen Wasserstoffbrücken aufweist, dürfte hingegen die durch Drehungen um C-C-Bindungen induzierte Desaktivierung stärker als die durch Wasserstoffbrücken vermittelte Desaktivierung sein.

Diese Befunde legen nahe, ein früher vorgeschlagenes<sup>[14]</sup> Diagramm der Energieniveaus und Desaktivierungskanäle von BR (und BRE) zu erweitern. Es werden nun als wichtige Konkurrenz der Fluoreszenz zusätzliche Mechanismen der Desaktivierung der  $S_1$ -Zustände von BR und BRE und deren  $(E,Z)$ -Photoisomeren eingefügt (Fig. 4). Es handelt sich dabei um  $k_{d(1)}$  und  $k_{d(2)}$ , die Summen der Geschwindigkeitskonstanten der Desaktivierung durch Drehungen, bevorzugt um die Einfachbindungen C-5-C-6 und C-14-C-15, und durch Protonübertragungsprozesse an Wasserstoffbrücken. Die Quantenausbeute der  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung und der Anteil des  $(E,Z)$ -Isomers am Photogleichgewicht bei Raumtemperatur betragen im BR-SA-System beide ca. 0.2 bei Anregung an einem isosbestischen Punkt (465 nm)<sup>[14,30]</sup>. Mit diesem Ergebnis können im Hinblick auf die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{d(1,2)}$ ,  $k_{1,11}$  und  $k_{1,2}$  zwei Grenzfälle in Betracht gezogen werden. Einerseits ist eine beinahe quantitative Bildung des um eine Doppelbindung verdrillten angeregten Singulets,  $'S_1$ , aus den  $(E,Z)$ - und  $(Z,Z)$ - $S_1$ -Zuständen vorgeschlagen worden ( $k_1/k_{11}$  bei  $\lambda^{irr} = 465$  nm)<sup>[20]</sup>. Diese Annahme, aus der ein Verhältnis von  $k_1/k_2 \approx 4$  folgt, läßt keinen Raum für direkte strahlungslose Desaktivierung zum Grundzustand. Es ist zu erwarten, daß die Geschwindigkeitskonstanten al-

ler Drehprozesse um C–C- und C=C-Bindungen,  $k_1$ ,  $k_{II}$ ,  $k_{d(1)}$  und  $k_{d(2)}$ , stark viskositäts- und/oder temperaturabhängig sind, weil es sich um intramolekulare Bewegungen mit großer Auslenkung handelt (vgl. dazu auch Abschnitt 3). Die a-priori-Annahme in [20], daß  $k_d$  durch Temperatur und Viskosität nicht beeinflußt würde, findet keine experimentelle Stütze. Die reziproke Beziehung zwischen Fluoreszenz- und Photoisomerisierungs-Ausbeuten ergibt keinen hinreichenden Beweis für eine Konstanz von  $k_d$ . Unsere Argumente werden zudem auch durch den Befund gestützt, daß in der gefrorenen Matrix die  $Z \rightarrow E$ -Photoisomerisierung vernachlässigbar klein ist und die Fluoreszenz-Quantenausbeute dennoch nicht den Wert 1.0 erreicht. Wir ziehen daher eine dem anderen Grenzfall angenäherte Situation vor, in der das Verhältnis  $k_1/k_2$  nahe an 1 ist. Dies setzt voraus, daß die Ausbeute an  ${}^1S_1$  wesentlich kleiner als quantitativ und je nach  $S_1$ -Vorstufe verschieden ist (d.h.  $k_1/k_{II}$  ca. 4:1 bei  $\lambda^{irr} = 465$  nm). Die Desaktivierung der restlichen  $S_1$ -Anregungszustände würde dann, wie bereits diskutiert, über direkte Kanäle ( $k_{d(1)}$  bzw.  $k_{d(2)}$ ) zum Grundzustand führen. In dieses Modell fügen sich auch die bereits erwähnten unterschiedlichen Auswirkungen der Komplexierung mit SA auf Fluoreszenz und Photoisomerisierung von BR widerspruchsfrei ein.

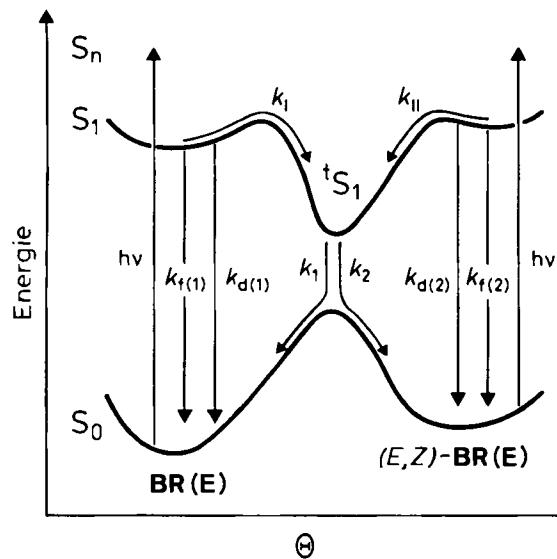


Fig. 4. Diagramm der Energieniveaus und Desaktivierungswege der Konformere von BR und BRE und deren (E,Z)-Photoisomeren.  $\Theta$  ist der Verdrillungswinkel um eine der exocyclischen Doppelbindungen,  $k_{d(1)}$  und  $k_{d(2)}$  sind die Summen der Geschwindigkeitskonstanten der Desaktivierung durch Drehungen um Einfachbindungen und durch Protonübertragungsprozesse in den Wasserstoffbrücken,  $k_{f(1)}$  und  $k_{f(2)}$  die Geschwindigkeitskonstanten für die Fluoreszenz,  $k_1$  und  $k_{II}$  für die  $Z \rightarrow E$ - bzw.  $E \rightarrow Z$ -Isomerisierung einer der exocyclischen Doppelbindungen, und  $k_1$  und  $k_2$  für die Relaxation des um eine Doppelbindung verdrillten Anregungszustandes,  ${}^1S_1$ , in das Ausgangsmaterial bzw. das Photoprodukt. Die für  $k_{d(1)}$  und  $k_{d(2)}$  erforderlichen Aktivierungsenergien sowie die Reaktionswege der mechanistisch noch nicht endgültig geklärten Cyclisierung zu den LRs und ILRs sind nicht wiedergegeben (vgl. [14]).

### 3. Die Verdine

#### 3.1. Spektroskopie von Biliverdindimethylester in Lösung. Koexistenz von helical gekrümmten und gestreckten C-10-Isomeren

Zur spektroskopischen Untersuchung von BVE wurde in der Anfangsphase eine Kombination von stationären

Spektroskopiemethoden eingesetzt, wie sie auch bei BRE angewendet wurde. Sie konnte kürzlich durch zeitaufgelöste Methoden (LIOAS, PP und SPT) ergänzt werden. Diese vermitteln einen wesentlich vertieften Einblick in die Beziehungen zwischen Struktur und strahlunglosen Prozessen von individuellen Spezies.

Bei kleinen Konzentrationen zeigen die Lösungen von BVE ebenfalls deutliche thermo- und solvatochrome Eigenschaften, die auf das Nebeneinander von vorwiegend zwei Formen in Lösung hinweisen (zur Verdeutlichung siehe z.B. Fig. 5)<sup>[4, 44, 45]</sup>, nachdem Aggregatbildung bei kleinen Konzentrationen (z. B.  $\leq 10^{-5}$  M in Ethanol; vgl. die Diskussion über Aggregatbildung im Abschnitt 3.5) und Lactam-Lactim-Tautomerie als Alternativen auszuschließen sind<sup>[46]</sup>. Das Intensitätsverhältnis der beiden längstwelligen Emissionsbanden ist je nach Lösungsmittel sehr unterschiedlich. So liegt z.B. in Methanol und Milchsäureethylester das absolute Maximum bei ca. 660 nm, in Ethanol, Chloroform und 2-Methyltetrahydrofuran hingegen bei etwa 710 nm.

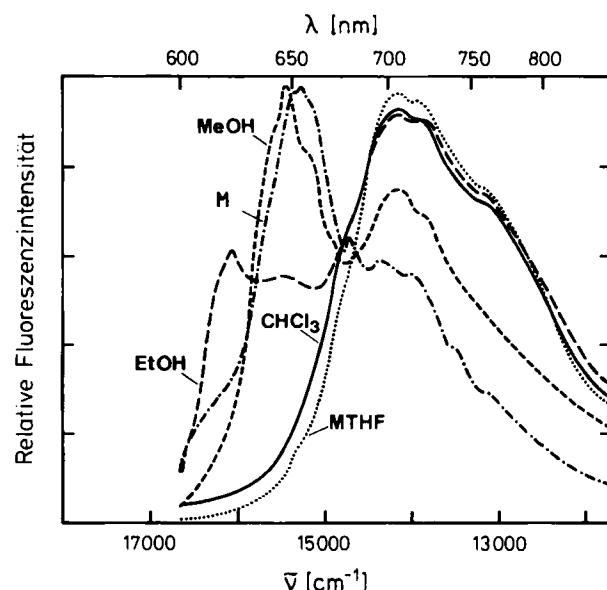
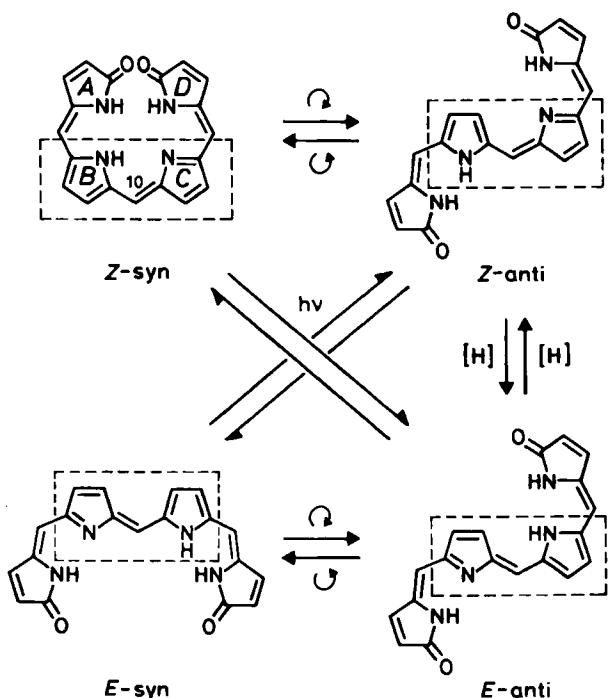


Fig. 5. Korrigierte Fluoreszenzspektren von BVE in unterschiedlichen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur;  $\lambda^{exc} = 580$  nm; Konz.  $1 \times 10^{-5}$  M [47]. MTHF = 2-Methyltetrahydrofuran, M = Milchsäureethylester. Die Spektren wurden nach kurzer Ultraschallbehandlung aufgenommen, wodurch sich die Reproduzierbarkeit verbessert. Dadurch wird auch die Zusammensetzung gegenüber jener nichtbeschallten Lösungen bereits leicht, aber nur quantitativ, verändert (vgl. dazu Abschnitt 3.3).

Das Maximum bei 660 nm ist einer gestreckten Form zuzuschreiben<sup>[4, 44, 47]</sup>. Die gestreckte Anordnung beschränkt sich auf den Bereich um die C-10-Brücke (Schema 5)<sup>[47, 48]</sup> (siehe Abschnitt 3.4 für die Beweisführung). Unser Ausdruck „Form“ mag, ebenso wie bei den Rubinen, statt für Individuen auch für ganze Klassen stehen, deren Mitglieder sich in ihrer räumlichen Anordnung ähneln. Immerhin lassen die schmalen und vibratorisch strukturierten Banden der „660 nm“-Form (vgl. Fig. 5 und 10C) auf eine einzelne, gut definierte Konformation schließen. Sie ist durch relativ kleine Werte des SICD-Cotton-Effektes, der Stokes-Verschiebung und des  $D_{UV}/D_{vis}$ -Verhältnisses im Fluoreszenz-Anregungsspektrum gekennzeichnet.

Die zweite, bei längeren Wellenlängen emittierende „710 nm“-Form weist eine breitere erste Anregungsbande und größere Werte für die Rotationsstärke, die Stokes-

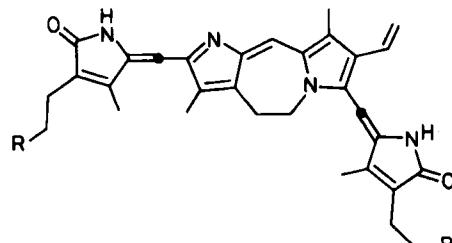


Schema 5. Die helical gekrümmte all-Z, all-syn-Form sowie die drei gestreckten E-anti-, E-syn- und Z-anti-Formen von Bilatrien mit gegenseitigen Umwandlungen durch Umformungen im Bereich der Ringe B und C. Im elektronischen Grundzustand wird dies durch Protonübertragungen (Tautomerie) zwischen den B/C-Stickstoffatomen ( $[\text{H}]$ ) und Drehung um die Einfachbindung C-9=C-10 ( $\curvearrowright$ ), im Anregungszustand durch  $E \rightarrow Z$ -Isomerisierung der Doppelbindung C-10=C-11 ( $h\nu$ ) bewirkt. Unter Einbeziehung der unsymmetrischen Substitution von BVE erhöht sich die Zahl möglicher Isomere dieses Typs auf insgesamt acht [\*] (vgl. Schema 9).

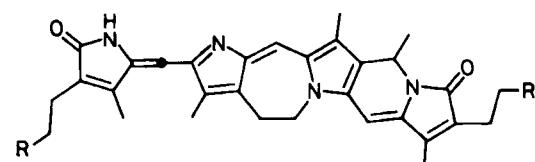
Verschiebung und das  $D_{\text{UV}}/D_{\text{vis}}$ -Verhältnis auf. Sie wurde als die helical gekrümmte all-syn-Form ähnlich jener im Kristallgitter<sup>[49]</sup> identifiziert. Die letztere Spezies herrscht ganz allgemein in organischen Lösungsmitteln vor<sup>[44, 45, 50]</sup>. Für die gegenseitige Umwandlung der beiden diastereomeren all-syn-Bilatrien-Helices wurde in einer  $^1\text{H}$ -NMR-kinetischen Studie am zentrochiralen Methanoladdukt 3 (Schema 6) eine Barriere von 42 kJ/mol bestimmt<sup>[51]</sup>.

Die Grundlage für die Konformationszuordnung wurde in einer umfassenden  $^1\text{H}$ -NMR-Studie der all-syn-Form in Chloroformlösung geschaffen<sup>[45]</sup>. Die Zuordnungen decken sich mit der Voraussage von semiempirischen Berechnungen, daß das Verhältnis  $D_{\text{UV}}/D_{\text{vis}}$  der beiden Hauptab-

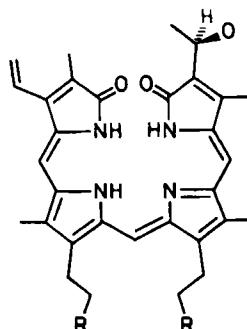
sorptionsbanden der Verdine von der Ausdehnung der Moleküle abhängt und daß der Übergang von einer helical gekrümmten Form zu einer gestreckten mit einer Abnahme des  $D_{\text{UV}}/D_{\text{vis}}$ -Verhältnisses einhergeht<sup>[17, 52-57]</sup>. Diese Trendanalyse wird überdies durch den Befund gestützt, daß die konformativ starren, gestreckten Verdine NBVE-IX $\delta$  (Schema 9), PBE und IPBE (Schema 6)<sup>[58-60]</sup> eine sehr viel kleinere UV-Absorptionsbande als BVE aufweisen.



PBE Phorcabilindimethylester



IPBE Isophorcabilindimethylester



3

$\text{R} = \text{CO}_2\text{CH}_3$

Schema 6. Konstitutionsformeln von PBE und IPBE mit eingeschränkter konformativer Beweglichkeit sowie des Methanoladdukts 3, für das die Umwandlungsbarriere der Bilatrien-Helix bestimmt wurde.

SICD-Messungen in optisch aktiven Lösungsmitteln untermauern die Schlußfolgerungen aus den Resultaten der Emissionsspektroskopie. Strukturell verwandte Verbindungen wie etwa Tetraphenylporphyrin, Protoporphyrin und Dipyrromethene ergeben keine derartigen SICD-Spektren. Die beobachteten Effekte spiegeln daher eine inhärente chirale Eigenschaft von BVE wider. Die Positionen der beiden Hauptabsorptionsbanden von BVE, und besonders jene des Vis-Maximums, sind bei Raumtemperatur lösungsmittelabhängig, während die SICD-Banden stets bei denselben Wellenlängen auftreten. Entweder decken sie sich mit der Absorptionskurve, die die individuel-

[\*] Im Interesse einer begrifflichen Vereinfachung ziehen wir es hier vor, bei der Diskussion der möglichen räumlichen Anordnungen von BVE allgemein anwendbare Ausdrücke wie „Form“ oder „Spezies“ anstelle von „Konformation“ als topologischen Oberbegriff und „Konformation“ und „Konfiguration“ als energetisch gegeneinander abgegrenzte Bezeichnungen für Rotationsisomere zu verwenden. Bereits die Formen des konstitutionell symmetrischen Bilatriens lassen sich in zwei Kategorien aufteilen, auch wenn Bewegungen innerhalb der A/B- und C/D-Molekülhälften ausgeschlossen bleiben. (Die Berechtigung für diese Einschränkung ergibt sich aus Abschnitt 3.4.) In Schema 5 sind die so noch in Betracht kommenden Formen, die bei Raumtemperatur thermisch nur langsam austauschen, zusammengestellt: die gekrümmte Z-syn-Form und die drei gestreckten Formen E-anti, E-syn und Z-anti. Es handelt sich dabei um zwei Paare von Konfigurationsisomeren (E-anti/Z-syn und E-syn/Z-anti), deren Komponenten formal ineinander überführbar sind. Solche gegenseitigen Umwandlungen sind in zwei Schritten durch eine Drehung um die Einfachbindung C-9=C-10 und eine Protonverschiebung zwischen den B/C-Stickstoffatomen – jeweils über die anti-Komponente des anderen Paares – denkbar (Schema 5). Sie lassen sich aber auch in einem Schritt durch  $E \rightarrow Z$ -Isomerisierung der Doppelbindung C-10=C-11 erzielen. Mit der Einführung der unsymmetrischen IX $\alpha$ -Substitution der Ringe A und D wird jede der bisher möglichen Formen noch um ein Konstitutionsisomer (Tautomer) ergänzt (vgl. Schema 9).

len Absorptionen der verschiedenen Formen gesamthaft umschreibt, oder aber sie sind nach Rot verschoben (Fig. 6A). Solche Rotverschiebungen sind eine Folge davon, daß die gekrümmte, längerwellig absorbierende Form in den meisten Lösungsmitteln überwiegt. Diese Befunde bestätigen, daß die Lösung mindestens zwei Formen enthält. Die Zusammensetzung des Gemisches variiert mit dem Lösungsmittel, und die beiden Komponenten tragen unterschiedlich zu Rotationsstärken, Absorption und Fluoreszenz bei. Das Vorliegen eines Gemisches in der Lösung wird noch eindrücklicher durch das SICD-Spektrum von BVE-H<sup>+</sup> demonstriert, das die gleiche allgemeine spektroskopische Charakteristik wie BVE aufweist (Tabelle 1). Nur eine einzige, der „660 nm“-Spezies von BVE entsprechende Komponente von BVE-H<sup>+</sup> ist bei Raumtemperatur in Milchsäureethylester fluorimetrisch nachweisbar. Dennoch ist der sichtbare SICD langwellig zur entsprechenden Absorption verschoben (Fig. 6B), und die Rota-

Die rotverschobene SICD-Komponente hingegen gehört zur gekrümmten Form mit inhärent größerer Rotationsstärke, deren Anteil am Gemisch für einen Nachweis durch Absorption und Fluoreszenz zu gering ist.

### 3.2. Picosekunden-Relaxationskinetik des Anregungszustands von Biliverdindimethylester

Das Studium von Einzelaspekten der strahlungslosen Desaktivierung durch Bestimmung von Fluoreszenz-Quantenausbeuten und durch LIOAS (siehe unten) wurde durch die beträchtliche Überlappung der Absorptions- und Fluoreszenzspektren der individuellen BVE-Spezies sehr erschwert. Diese Schwierigkeiten konnten erst kürzlich durch kombinierte Anwendung von Absorptions- und Fluoreszenzdetektion mit PP- und SPT-Techniken und einem synchron gepumpten modengekoppelten Picosekunden-Farbstofflasersystem<sup>[61]</sup> umgangen werden<sup>[47]</sup>. Die Resultate ergänzen jene, die durch stationäre (Absorption, Fluoreszenz, SICD) und nur begrenzt zeitaufgelöste Methoden (LIOAS) ermittelt wurden und die zum Postulat Anlaß gaben, daß in Lösung zwei (Familien von) Grundzustandsformen von BVE nebeneinander auftreten. Diese Messungen haben eine höhere Aussagekraft als frühere Picosekunden-Einzelpulsmessungen, wie sie an Etiobiliverdin ausgeführt worden waren<sup>[62]</sup>.

Im allgemeinen konnte mit der SPT-Methode eine größere Zahl von Zerfallskomponenten nachgewiesen werden (Tabelle 2, Fig. 7 und 8) als mit der Transienten-Absorptionspektroskopie (PP; Tabelle 3). Der Grund dafür liegt in der Breite des dynamischen Detektionsbereichs, der bei der SPT-Methode wesentlich größer (> 3 Größenordnungen) ist als bei der PP-Methode (ca. 1-2 Größenordnungen). Davon abgesehen stimmen die Resultate beider Methoden bestens überein. Demnach ist BVE in Lösung ein noch komplexeres System als früher angenommen. *Es können bis zu vier fluoreszierende Spezies, zwei kurzlebige (Picosekunden-Bereich) und zwei längerlebige (Nanosekunden-Bereich), nachgewiesen werden (Tabellen 2 und 3). Diesen vier Anregungszuständen sind drei oder vier Grundzustandsformen zuzuordnen.*

Die Nanosekunden-Zerfallskomponenten  $\tau_3$  und  $\tau_4$  gehören zur gestreckten „660 nm“-Form. Solche Lebenszeiten sind für BVE in flüssiger Lösung bemerkenswert lang. Zusammen mit der relativ schmalbandigen und teilweise aufgelösten Vibrationsstruktur von Fluoreszenz und Fluoreszenzanregung und der geringen Stokes-Verschiebung deuten diese Lebenszeiten auf eine relativ starre und einheitliche Konformation mit hoher Fluoreszenz-Quantenausbeute hin. Die lange Lebensdauer und die hohe Fluoreszenzausbeute lassen sich am besten mit einer Anordnung der Ringe B und C vereinbaren, die eine rasche Desaktivierung durch intramolekularen Protontransfer zwischen den zentralen Stickstoffatomen verhindert. Alle gestreckten Anordnungen (siehe Schema 5) gewährleisten dies. Es ist aber anzunehmen, daß die konformative Starrheit intramolekulare Wasserstoffbrücken ähnlich der „Falzziegel“-artigen Stabilisierung (Schema 3) von BRE erfordert, wie sie zusätzlich lediglich in den *anti*-Anordnungen der B/C-Stickstoffatome von BVE möglich sind. Die photochemischen Resultate mit BVE-IX $\gamma$  und -IX $\delta$

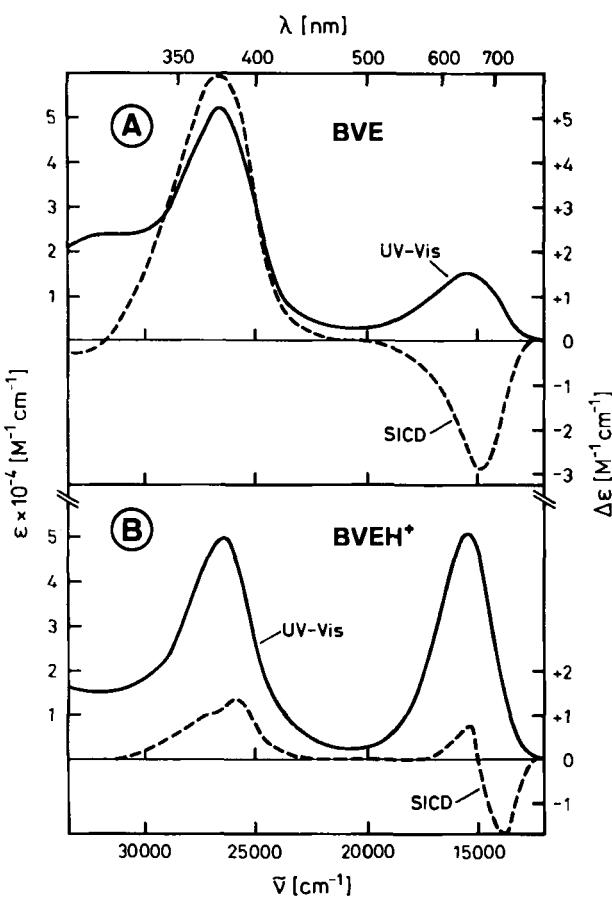


Fig. 6. UV/Vis-Absorptions- und SICD-Spektren bei 298 K (A) von BVE und (B) von BVE-H<sup>+</sup> in (S)-Milchsäureethylester; Konz.  $3.3 \times 10^{-5}$  M [44].

tionsstärken der beiden Banden sind deutlich kleiner als jene von BVE. Außerdem weist die sichtbare SICD-Bande zwei Cotton-Effekte mit entgegengesetzten Vorzeichen auf. Dieses Phänomen kann, ähnlich wie bei BR (Abschnitt 2.1), hier nicht erschöpfend interpretiert werden. Wir neigen aber wiederum zur Annahme, daß der SICD entweder aus zwei Komponenten mit entgegengesetzten Vorzeichen besteht oder aus einer Komponente mit einfacher Bande, die einem bisignaten Cotton-Effekt überlagert ist. Die kürzerwellige Komponente wird der vorherrschenden gestreckten Form mit kleiner Rotationsstärke zugeschrieben.

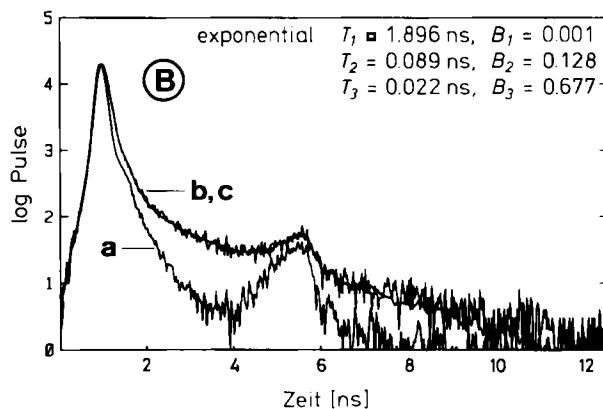
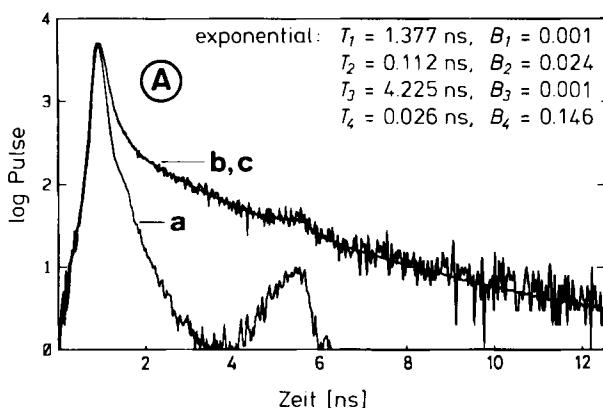


Fig. 7. Halblogarithmisch dargestellte Zerfallskurven der Fluoreszenz von BVE in 2-Methyltetrahydrofuran bei Raumtemperatur; (A)  $\lambda^{exc} = 580$  nm,  $\lambda^{em} = 650$  nm; (B)  $\lambda^{exc} = 580$  nm,  $\lambda^{em} = 710$  nm (siehe Tabelle 2) [47]. Anmerkung: Es sind die halblogarithmisch dargestellten Zerfallsfunktionen des Anregungspulses (a) und der Fluoreszenz (b) sowie die an die Meßwerte angepaßte Exponentiellsummenfunktion (c) wiedergegeben. Ferner sind die berechneten Lebenszeiten  $T_1 \dots T_n$  und Amplituden  $B_1 \dots B_n$  der Zerfallskomponenten eingetragen.

Tabelle 2. Lebenszeiten und relative Ausbeuten der Fluoreszenzzerfalls-Komponenten von BVE, gemessen bei 298 K mit der SPT-Technik [47].

Lösungs-mittel [a]	$\lambda^{exc}$ [nm]	$\lambda^{em}$ [nm]	Lebenszeiten [ps] [b]				Normierte rel. Ausb. [%]			
			$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\varphi_1$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\varphi_4$
MTHF [c]	580	650	26	112	1377	4225	34	23	11	32
MTHF [d]	580	710	22	89	1896	—	54	42	4	—
MTHF	640	660	—	93	1685	4545	—	12	9	79
MTHF	640	710	—	78	968	4183	—	62	10	28
CHCl <sub>3</sub>	580	650	21	183	1151	—	69	18	13	—
CHCl <sub>3</sub>	580	710	12	71	1406	—	66	31	3	—
CHCl <sub>3</sub>	640	660	—	69	940	3883	—	25	10	65
CHCl <sub>3</sub>	640	710	—	62	1009	3365	—	73	7	20
MeOH	580	650	—	140	—	4678	—	2	—	98
MeOH	580	710	—	52	—	4589	—	6	—	94
MeOH [e]	640	660	—	—	—	4612	—	—	—	100
MeOH [f]	640	710	38	—	630	4592	8	—	3	89
EtOH	580	650	19	249	1639	4601	15	11	16	58
EtOH	580	710	10	112	910	3997	57	9	8	26
EtOH	640	660	—	97	879	4610	—	4	27	69
EtOH	640	710	—	56	710	4043	—	40	25	35
Milch-säure-ester	580	650	39	239	894	4150	8	16	12	64
Milch-säure-ester	580	710	20	124	659	3902	29	22	13	37
ethyl-ester	640	660	—	126	2140	4470	—	4	21	75
ester	640	710	—	108	681	4250	—	5	13	82

[a] Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  M bei allen Messungen; MTHF, 2-Methyltetrahydrofuran. [b] Die  $\tau$ -Werte entsprechen den  $T$ -Werten, die in Fig. 7 und 8 aufgeführt sind. Die Rangfolgen  $\tau_1 \dots \tau_n$  (steigende Lebenszeiten) gehen nicht mit den Rangfolgen  $T_1 \dots T_n$  parallel. Meßfehler in den Lebenszeitbestimmungen betragen  $\pm 10\%$ , aber mindestens 5 ps, mit Ausnahme des  $\pm 1\%$ -Fehlers in der Einfachexponentiellen-Analyse. Die Lebenszeit-Meßfehler können für Komponenten mit relativen Ausbeuten von weniger als 5% bis auf  $\pm 20\%$  steigen. Siehe ferner [c] Fig. 7A, [d] Fig. 7B, [e] Fig. 8A und [f] Fig. 8B.

liefern starke unabhängige Argumente zugunsten dieses Modells<sup>[48]</sup> (siehe Abschnitt 3.4).

Die spektralen Eigenschaften von gestrecktem BVE erinnern sehr an jene von nativen Bilioproteinen wie Phytochrom und Phycobiloproteinen, insbesonders Phycocyaninen. Für diese Chromophore werden in Anlehnung an Resultate mit BVE<sup>[44]</sup> und aufgrund der Absorptionsdaten von PBE und IPBE<sup>[63]</sup> ebenfalls gestreckte Konformationen angenommen<sup>[2a]</sup>. Soweit Analogieschlüsse zwischen Bilioproteinen und BVE zulässig sind, ist die Feststellung, daß BVE sogar bei Raumtemperatur in Lösung eine *inhärent starre* gestreckte Konformation einnehmen kann, von erheblichem photobiologischem Interesse. Offenbar genügen hierzu intramolekulare Stabilisierungskräfte. Stabilisierende Wechselwirkungen mit dem Protein dürften dem-

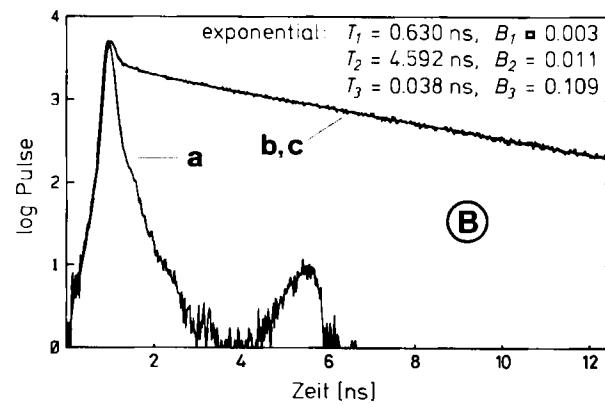
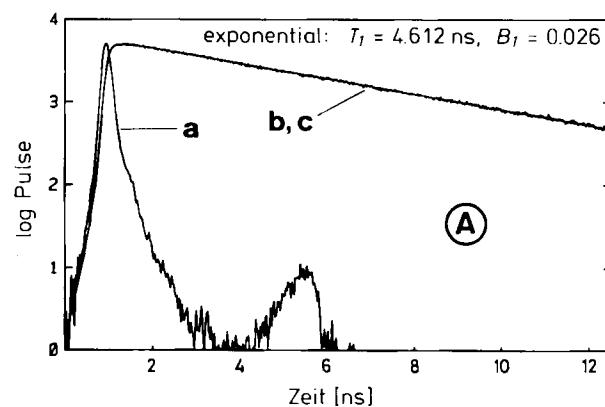


Fig. 8. Halblogarithmisch dargestellte Zerfallskurven der Fluoreszenz von BVE in Methanol bei Raumtemperatur; (A)  $\lambda^{exc} = 640$  nm,  $\lambda^{em} = 660$  nm; (B)  $\lambda^{exc} = 640$  nm,  $\lambda^{em} = 710$  nm (siehe Tabelle 2) [47]. Siehe auch die Anmerkung zu Fig. 7.

Tabelle 3. Lebenszeiten von BVE im Anregungszustand, gemessen bei 298 K mit der PP-Technik [47].

Lösungs-mittel [a]	Anregungs- und Detektions-Wellenlänge $\lambda^d$ [nm]	Lebenszeiten [ps] [b]			Rel. Amplituden $\tau_1/\tau_2$
		$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	
EtOH	605	19	73	—	1.7
EtO <sup>2</sup> H	605	17	57	—	1.5
EtOH [c]	643	12	68	—	3
EtO <sup>2</sup> H	643	15	55	—	5
MeOH	640	—	51 [d]	1200 [e]	1.3 [f]
MTHF	640	20	64	—	0.5

[a] Konzentration  $3-7 \times 10^{-4}$  M bei allen Messungen; MTHF, 2-Methyltetrahydrofuran. [b] Meßfehler der Lebenszeitbestimmungen  $\pm 10\%$ . [c] Vgl. den Meßpunkt x in Fig. 9. [d] Wahrscheinlich ein Mittelwert der Nanosekunden-Lebenszeiten von zwei Komponenten. [e] Unterer Grenzwert. [f]  $\tau_1/\tau_2$ .

nach, im Gegensatz zur bisher allgemein akzeptierten Anschauung, keine a priori notwendige Voraussetzung für die konformative Starrheit von BVE-ähnlichen Tetrapyrrolen in Bilioproteinen sein.

Die Picosekunden-Zerfallskomponenten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  sind auf die gekrümmte „710 nm“-Spezies zurückzuführen. Der unterschiedliche Einfluß der Temperatur auf die beiden Zerfallsgeschwindigkeiten (Fig. 9) zeigt, daß zwei Mecha-

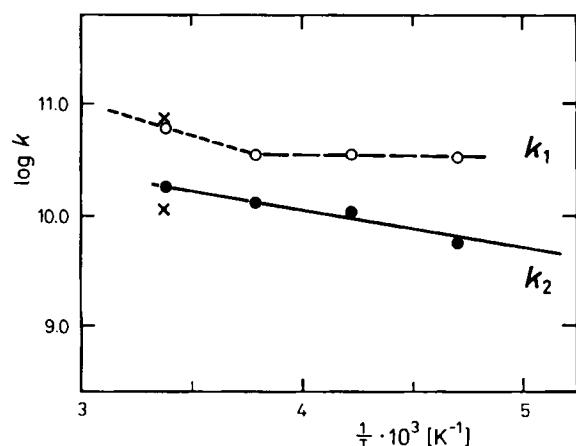
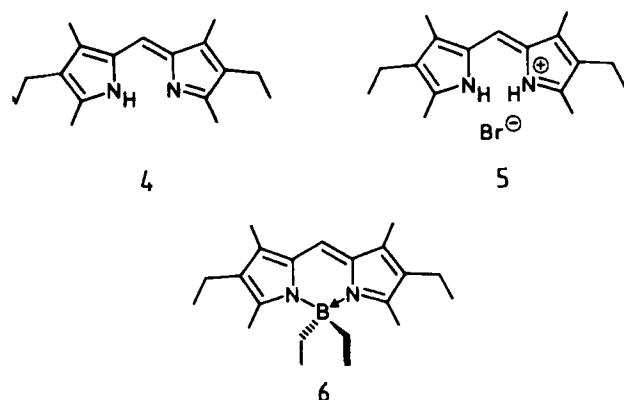


Fig. 9. Temperaturabhängigkeit der Picosekunden-Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  der BVE-Transienten  $\tau_1$  bzw.  $\tau_2$  in  $\text{EtO}^2\text{H}$ , aufgenommen mit der PP-Technik;  $\lambda^d = 643$  nm. ○ = kurzerbige Komponente  $\tau_1$ ; ● = langlebige Komponente  $\tau_2$ ; ✕ = Raumtemperaturdaten in  $\text{EtOH}$  (siehe Tabelle 3). Die kurzgestrichelte Gerade bezeichnet den temperatur(viskositäts)abhängigen Bereich des Zerfalls von  $\tau_1$  und die längergestrichelte Gerade die temperaturunabhängige Protonübertragung in der  $\tau_1$ -Komponente [47].

nismen die ultraschnelle strahlungslose Desaktivierung hervorrufen. In beiden Komponenten finden Relaxationen statt, die vermutlich durch Drehungen um die Einfachbindungen der Methinbrücken induziert werden. Zusätzlich trägt auch eine intramolekulare Protonübertragung, höchstwahrscheinlich zwischen den zentralen B/C-Stickstoffatomen (wie schon für *Z-syn*-Dipyrrrole vorausgesagt<sup>[64]</sup>), zum Energieabbau der schneller zerfallenden der beiden Komponenten bei. So sind die Relaxationsdaten der kürzerbigen Picosekunden-Spezies,  $\tau_1$ , unterhalb von etwa 260 K in  $\text{EtO}^2\text{H}$  unabhängig von der Temperatur. Die ( $\log k_1$  vs.  $1/T$ )-Funktion ist somit eine Summe von sowohl temperaturabhängigen als auch temperaturunabhängigen Prozessen. Bei letzteren handelt es sich um die Protonübertragung (langgestrichelte Gerade in Fig. 9), die zur strahlungslosen Desaktivierung mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $3.5 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$  führt. Diese Desaktivierung läuft parallel zur temperatur-(oder eher viskositäts-)abhängigen Relaxation ab, die durch Drehungen verursacht wird (kürzgestrichelte Gerade). Die Aktivierungsenergie für diese Drehungen bewegt sich im Bereich der Lösungsmittelviskositäts-Aktivierungsenergie mit einer geschätzten unteren Grenze von etwa 12 kJ/mol.

Die Temperaturabhängigkeit der langlebigen Komponente  $\tau_2$  ist eindeutig linear (vgl.  $k_2$  in Fig. 9). Die schnelle intramolekulare Protonübertragung spielt bei der Desaktivierung dieses Zustandes keine Rolle. Die kleine Aktivierungsenergie von etwa 6 kJ/mol ist allein auf intramolekulare Barrieren für andere Desaktivierungskanäle, z. B. Drehungen um Einfachbindungen, zurückzuführen.



Schema 7. Bezugssubstanzen für die Beurteilung der Desaktivierungsmechanismen von BVE, die durch Drehungen um C-C-Bindungen und intramolekulare Protonübertragung ausgelöst werden.

Aus dem Vergleich der Fluoreszenz-Quantenausbeuten von BVE bei 77 K und Raumtemperatur mit denjenigen von  $\text{ZnBVE}$ ,  $\text{BVE-H}^+$  und den Verbindungen 4–6 (Schema 7 und Tabelle 1) ergibt sich, daß der intramolekularen Protonübertragung zwischen den Stickstoffatomen (der Ringe B und C in den Verdinen) und den Drehungen um CC-Einfachbindungen eine bedeutende Rolle bei der Auslösung der strahlungslosen Desaktivierung von BVE zukommen muß. Dementsprechend war a priori auch ein beachtlicher  $\text{N}-\text{H}/^2\text{H}$ -Isotopeneffekt auf die Fluoreszenzausbeute zu erwarten. Dennoch ließ sich in  $\text{EtOH}/\text{EtO}^2\text{H}$  selbst bei 77 K kein solcher Effekt nachweisen<sup>[44]</sup>. Durch das Modell der Picosekunden-Desaktivierungsmechanismen ist das Mißlingen dieser Versuche jetzt auch verständlich. So werden die Geschwindigkeit des strahlungslosen Zerfalls der  $\tau_1$ -Komponente und damit auch ihre Fluoreszenzausbeute bei Raumtemperatur überwiegend durch die konformative Relaxation und weniger durch die Protonübertragung bestimmt. Bei sehr tiefen Temperaturen ist die gesamte Fluoreszenzausbeute zwar größer, aber offenbar hauptsächlich wegen des Zuwachses an Fluoreszenzausbeute der langlebigen Komponenten ( $\tau_2 - \tau_4$ ), die durch die Protonübertragung nicht beeinflußt werden. Diese Argumentation setzt voraus, daß der mit der Abkühlung verbundene überdurchschnittliche Fluoreszenzanstieg den gleichzeitigen Teilverlust an gestreckten Formen überkompensiert. Der Beitrag der intramolekularen Protonübertragung zur Fluoreszenzausbeute ist daher bei beiden Temperaturrextrema relativ klein und liegt offenbar noch innerhalb des Meßfehlers der Methode der kontinuierlichen Anregung.

Unsere Resultate haben gezeigt, daß in Lösung je nach den Bedingungen mindestens drei Formen von BVE im elektronischen Grundzustand vorhanden sein können. Bei zwei davon ( $\tau_3, \tau_4$ ) handelt es sich zweifellos um gestreckte Formen mit langen  $S_1$ -Lebenszeiten. Es ist jedoch nicht unmittelbar zu erkennen, ob die beiden Picosekunden-Zerfälle ( $\tau_1, \tau_2$ ) ebenfalls zwei oder aber nur einer Grundzustand-Spezies zugehörig sind. Die zweite Möglichkeit ist vom Gesichtspunkt der Konformation aus plausibler. Ohnehin ist anzunehmen, daß – in Einklang mit Ramachandran<sup>[56, 65]</sup>, Force-Field<sup>[66]</sup> und MO-Rechnungen<sup>[53, 55–57]</sup> – die Potentialminima sehr flach und die abgrenzenden Aktivierungsbarrieren klein im Vergleich zur thermischen Energie sind.

Die Fluoreszenz-Lebenszeiten ermöglichen nun auch erstmals eine Abschätzung der relativen Fluoreszenz-Quantenausbeuten für die gekrümmte Form und die gestreckten Formen von BVE in Lösung. Der Absorptionskoeffizient der Vis-Bande ist für die gestreckten Formen nur etwa viermal größer als für die gekrümmte Form. Demnach ergibt sich aus dem Unterschied in den Lebenszeiten eine um etwa zwei Größenordnungen höhere Fluoreszenzausbeute für die gestreckten Formen.

### 3.3. Die thermischen gegenseitigen Umwandlungen der helical gekrümmten und gestreckten Formen von Biliverdindimethylester. Einfluß des Mediums

Die Unterschiede in den stationären Spektren der beiden BVE-Formen werden besonders eindrücklich durch Beobachtungen – Fluoreszenz, Fluoreszenzanregung und SICD in optisch aktiven Membranen – beim Einbau von BVE in den lipophilen Teil der Doppelschichtmembranen von Liposomen illustriert<sup>[67]</sup>.

Wenn BVE bei Raumtemperatur ohne Erwärmung oder Ultraschall-Einwirkung eingebaut wird, dann dominiert anfänglich die Fluoreszenz der helical gekrümmten Form in den Membranen aller Liposomen. In gelartigen Liposomen, z. B. in DPL-Membranen (Fig. 10A), deren Phasenübergang erst oberhalb Raumtemperatur stattfindet (315 K), bleibt die überwiegende Emission der gekrümmten Form unverändert erhalten. In den beweglicheren flüssigkristallinen Membranen (z. B. in EYL mit einer Phasenübergangstemperatur von 268 K) hingegen tritt bereits beim Stehen spontan die Fluoreszenz der gestreckten Form auf. Diese nicht mehr umkehrbare Umwandlung der gekrümmten in die gestreckte Form lässt sich auch in DPL-Liposomen durch Erwärmung auf eine Temperatur oberhalb des Phasenüberganges und durch Ultraschall-Behandlung der BVE enthaltenden Liposomen erzielen (Fig. 10B). Die gestreckte Form ist daher auch die durch Fluoreszenz praktisch allein nachweisbare Spezies in BVE-Liposomen, die durch Ultraschall-Behandlung eines Gemisches von Lipiden und BVE hergestellt worden sind (Fig. 10C). Diese Befunde zeigen, daß BVE in den Membranen bevorzugt gestreckte Form(en) einnimmt, falls die für eine spontane Streckung erforderliche minimale Fluidität der lokalen Umgebung gewährleistet ist.

Die aus den Emissionsdaten hergeleitete Konformationszuordnung wird wiederum durch SICD-Messungen, hier in der optisch aktiven EYL-Membran, gesichert. Die zeitliche Entwicklung der CD-Bande bei 650 nm – Zunahme der Intensität in der Anfangsphase nach der Inkubation, gefolgt vom allmählichen Verschwinden – und ihre Abhängigkeit von der Herstellungsmethode der BVE-EYL-Liposomen sind jenen der Fluoreszenz parallel.

Der Streckvorgang der gekrümmten BVE-Form in den flüssig-kristallinen Liposomen wird offenbar durch die geordnete Struktur der Membran-Umgebung gefördert, solange diese nicht zu starr ist. Jedenfalls ist die Streckung bei Raumtemperatur in Lösung allgemein sehr viel langsamer<sup>[48, 68]</sup>. Dimethylsulfoxid verhilft, selbst in katalytischen Mengen, zur kleinsten Aktivierungsenergie, die bisher festgestellt werden konnte. In anderen Lösungsmitteln ist eine Äquilibrierung nur durch eine zusätzliche Aktivierung in der Größenordnung von 20 kJ/mol, d. h. im Bereich der

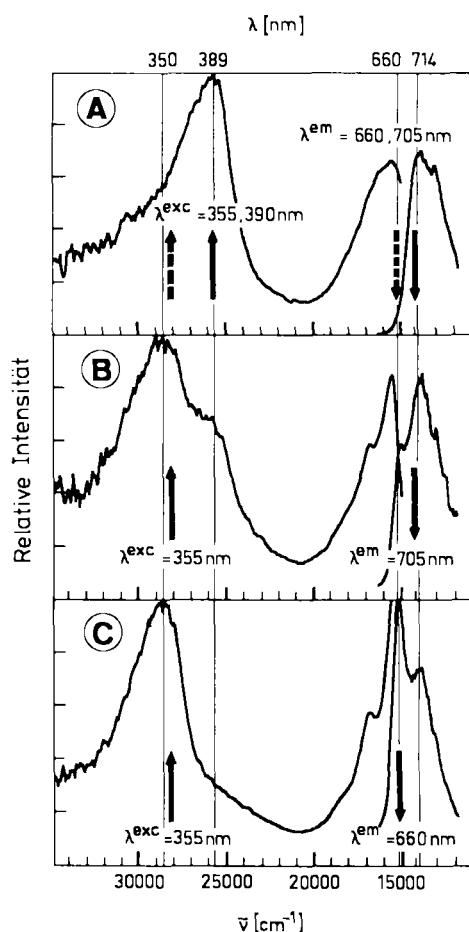


Fig. 10. Korrigierte Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungs-Spektren von BVE-DPL-Liposomen bei 298 K, (A) gemessen an einer durch Inkubation von intakten DPL-Liposomen mit BVE hergestellten Probe, (B) nach anschließender kurzer Ultraschall-Behandlung und (C) gemessen an Liposomen, die durch gleichzeitige Ultraschall-Behandlung von BVE und DPL hergestellt wurden. Die Spektren (A), die wellenlängenunabhängig in Emission und Anregung waren, stammen von der gekrümmten „710 nm“-Spezies, (B) illustriert das Anfangsstadium der Umwandlung in die gestreckte „660 nm“-Form durch Ultraschall-Anregung, und (C) zeigt das „660 nm“-Spektrum praktisch ohne Beimischung der „710 nm“-Spezies. Man beachte, daß  $\lambda^{\text{em}}$  der „710 nm“-Spezies in DPL nach ca. 730 nm verschoben ist [67].

Lösungsmittelviskositäts-Aktivierung, durch Ultraschall-Behandlung oder Erwärmung zu erzielen. Das Ausmaß der Anreicherung an gestreckten Formen wird durch die höchsterreichte Temperatur, die Geschwindigkeit der Abkühlung und das Lösungsmittel bestimmt. Nach den bisherigen Befunden ist der Anteil an gestreckten Formen am größten in Dimethylsulfoxid, etwas kleiner in protonischen Lösungsmitteln (Alkoholen) und am kleinsten in aromatischen Kohlenwasserstoffen<sup>[68]</sup>. Es ist bemerkenswert, daß die Barriere zwischen den Konformeren von BVE, den „395 nm“- und „450 nm“-Formen, beträchtlich kleiner sein muß.

Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz- und LIOAS-Intensität in BVE-Liposomen-Präparaten ab Inkubationsbeginn gibt einen gewissen Einblick, wie der Einbau in die Membranen stattfindet und wie sich der strahlungslose Energieabbau von angeregtem BVE in diesen Medien vollzieht<sup>[67]</sup>. Die Fluoreszenz-Quantenausbeuten von gekrümmtem und gestrecktem BVE in den EYL- und DPL-Liposomen sind durchweg ähnlich und etwa fünf- bis achtmal größer als  $\Phi_f$  von gestrecktem BVE in Ethanol bei Raumtemperatur (Tabelle 1). Offenbar spiegelt sich in die-

sem Zuwachs wider, daß die Membranen die vibratorischen und Rotations-Freiheitsgrade und damit das Ausmaß der strahlungslosen Relaxation von BVE einschränken. Man sollte daher auch eine gleichzeitige Abnahme der LIOAS-Signalintensität erwarten, da diese ein Maß alter strahlungslosen, nichtphotochemischen Energieabbau-Kanäle ist<sup>[69]</sup>. Dies trifft denn auch für BVE-DPL zu. Die Ausbeute der „prompten“ Wärmeabgabe,  $\alpha$  (definiert als der in die akustische Welle umgewandelte Teil der absorbierten Energie)<sup>[70, 71]</sup>, beträgt für BVE-DPL nur etwa 2/3 oder weniger vom niedrigsten Wert für BVE in Ethanol (vgl. Fig. 13)<sup>[67, 71]</sup>.

Die LIOAS-Untersuchung des Einbaus von BVE in die Membranen von Liposomen zeigt auch noch einen Aspekt von direktem photochemischem Interesse<sup>[67]</sup>. Die LIOAS-Intensität sinkt nach dem Beginn der Inkubation von DPL-Liposomen allmählich ab und weist nach 20 h endgültig noch etwa 30% des anfänglichen Wertes auf (Fig. 11B). Anstelle einer entsprechend starken Erhöhung beträgt nun aber der Fluoreszenz-Zuwachs lediglich 5–20% (Fig. 11A). Überdies unterscheiden sich die Zeitskalen um eine Größenordnung: Ein konstanter  $\Phi_f$ -Wert ist schon nach 2 h erreicht. Der durch den Fluoreszenz-Zuwachs kompensierte Anteil des LIOAS-Defizits wird offensichtlich durch einen gleichgerichteten, aber größeren Effekt überdeckt. Es ist naheliegend, den Ursprung dieses großen LIOAS-Defizits in einer photochemischen Reaktion von BVE zu vermuten. Da in BVE-DPL aber keine permanente photochemische Änderung erzielt werden kann, muß eine solche Reaktion thermisch reversibel sein. Die Zeitskala muß dabei länger ( $> 1 \mu\text{s}$ ) als der von der LIOAS erfaßte Bereich sein. Diese Begrenzung der möglichen Lebenszeit für das Photoprodukt nach unten ergibt sich aus der Zeit, die zur Entstehung einer akustischen Welle benötigt wird.

nachgewiesenen – photochemischen  $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung und thermischen Rückbildung der  $Z$ -Ausgangsform mit den Beobachtungen vereinbar. Sie würde erfordern, daß die thermische Rückisomerisierung in der „weichen“ EYL-Membran schneller ( $< 1 \mu\text{s}$ ) erfolgt als in der starren DPL-Membran.

Somit können die Vorgänge nach der Inkubation von Liposomen mit BVE z. B. wie folgt interpretiert werden: Bei Zugabe von BVE in konzentrierter Tetrahydrofuran-Lösung zu einer wässrigen Dispersion von Liposomen wird BVE vermutlich in aggregierter Form (vgl. dazu Abschnitt 3.5) auf der Membranoberfläche deponiert. Beim Eindringen spalten sich die Aggregate in die Monomere, die schließlich je nach Lipidviskosität zuletzt vorzugsweise als gekrümmte oder als gestreckte Spezies nachweisbar sind. Die mit diesem Vorgang verknüpfte Erhöhung der Fluoreszenzintensität muß auf einer etwas weniger wirkungsvollen strahlungslosen Desaktivierung der Monomere beruhen, falls es sich nicht lediglich um einen Konzentrationseffekt als Folge der Aggregatdeponie auf der Membranoberfläche handelt. Das gleichzeitig steigende LIOAS-Defizit deutet aber auch darauf hin, daß die – thermisch reversible – Photoisomerisierung in den Monomeren noch wesentlich effizienter als in den Aggregaten ist.

### 3.4. Die Photochemie von Biliverdindimethylester. Die konformationsselektive Photocyclisierung von Biliverdin-IX $\gamma$ - und -IX $\delta$ -dimethylester

Die gekrümmte all- $Z, all-syn$ -Form von BVE kann am Modell durch Drehungen um die Einfach- und Doppelbindungen an C-5, C-10 und/oder C-15 nach Belieben in zahlreiche verschieden gestreckte Anordnungen umgewandelt werden. In den vorangehenden Abschnitten wurde

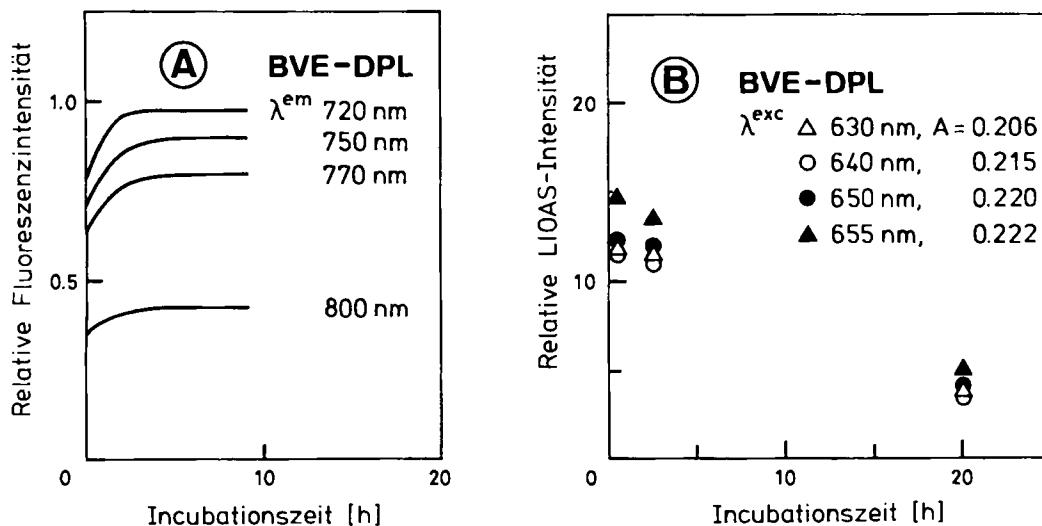
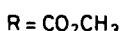
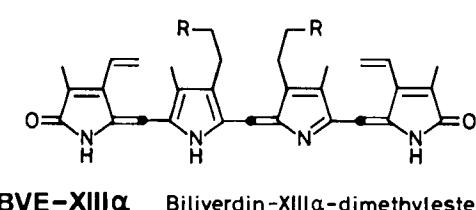
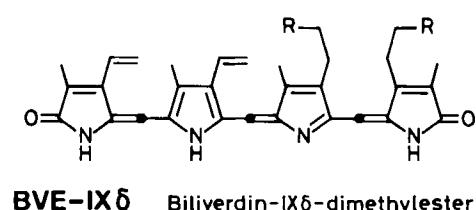
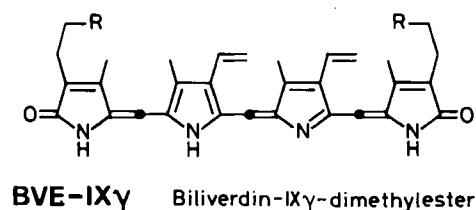


Fig. 11. Inkubation intakter DPL-Liposomen mit BVE: (A) Anwachsen der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Emissions-Wellenlängen, (B) Abnahme der LIOAS-Signalintensität (gemessen 9  $\mu\text{s}$  nach dem Laserpuls) bei verschiedenen Anregungs-Wellenlängen, beide als Funktion der Zeit nach der Inkubation [67b].

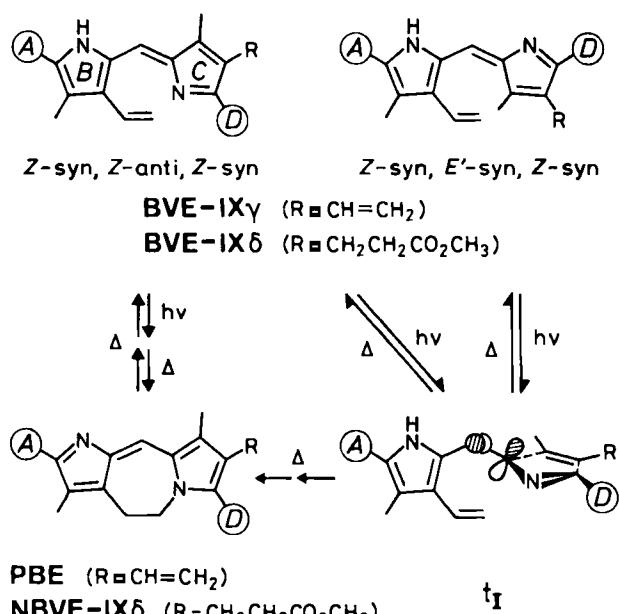
Die Fluoreszenz-Zunahme nach der Inkubation von EYL-Liposomen mit BVE hat die gleiche Größenordnung wie bei Verwendung von DPL-Liposomen (Tabelle 1), aber die LIOAS-Intensität bleibt im Fall von DPL praktisch unverändert. Wiederum ist die Annahme einer – nicht direkt

hinsichtlich dieser Formenvielfalt noch nicht differenziert. Eine Ausnahme bildeten lediglich Schema 5 nebst Fußnote, in denen angenommen wurde, daß der Übergang von der gekrümmten Form zu gestreckten Formen ausschließlich durch Umformung der B/C-Teilstruktur stattfindet,

d.h. daß die Drehungen auf die Bindungen der zentralen C-10-Brücke beschränkt sind. Anhaltspunkte dafür ergeben sich aus den photochemischen Resultaten mit BVE und seinen IX $\gamma$ - und IX $\delta$ -Isomeren (Schema 8).



Schema 8. Konstitutionsformeln von BVE-IX $\gamma$ , BVE-IX $\delta$  und BVE-XIII $\alpha$ .



Schema 9. Eine Auswahl möglicher Primärschritte des photochemischen Ringschlusses gestreckter Formen von BVE-IX $\gamma$  und BVE-IX $\delta$  unter Bildung von PBE bzw. NBVE-IX $\delta$ .  $\textcircled{A}$  und  $\textcircled{D}$  bedeuten hier die entsprechenden IX $\gamma$ - und IX $\delta$ -substituierten Ringe (zur *E*-syn-Bezeichnung siehe Schema 10).

Die unterschiedlichen Substitutionsmuster von BVE, BVE-IX $\gamma$ , BVE-IX $\delta$  und BVE-XIII $\alpha$  üben allgemein keinen drastischen Einfluß auf die spektralen Eigenschaften dieser Verbindungen aus. Somit kann man annehmen, daß

auch die elektronischen Grund- und Anregungszustände der vier Verbindungen sehr ähnliche Eigenschaften haben. Ferner weisen die Überlagerungen von jeweils zwei Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungs-Spektren darauf hin, daß Lösungen aller dieser Biliverdine heterogen und ähnlich zusammengesetzt sind. Dabei handelt es sich in jedem Fall bei der längerwellig emittierenden Spezies um die gekrümmte all-Z,all-syn-Form und bei der kürzerwellig emittierenden um eine gestreckte Form. Die spektrale Übereinstimmung läßt zudem erwarten, daß die gestreckten Formen jeweils ähnliche Anordnungen um alle drei Methinbrücken aufweisen.

BVE-IX $\gamma$  und BVE-IX $\delta$  cyclisieren sowohl thermisch als auch photochemisch zu PBE bzw. NBVE-IX $\delta$  (Schema 9)<sup>[58,60]</sup>. Ein analoger Ringschluß im Bereich der C-5- und C-15-Brücken findet hingegen nicht statt, weder in BVE-IX $\gamma$  und BVE-IX $\delta$  als Alternative zum Ringschluß im Zentrum, noch in BVE und BVE-XIII $\alpha$ , die ausschließlich eine bzw. zwei Vinylgruppen in Nachbarschaft zu C-5 und C-15 enthalten. Nach mechanistischen und strukturellen Betrachtungen kann man für die Cyclisierung mehrere Reaktionswege in Betracht ziehen, die alle eine ausgeprägte Selektivität zugunsten einer gestreckten Konformation des Ausgangsmaterials zeigen sollten. So könnte der verdrillte Anregungszustand 'I' – das Zwischenprodukt der photochemischen gegenseitigen Umwandlung der *E*-syn- und *Z*-anti-Isomere (siehe dazu Schema 10) – in Konkurrenz zur Relaxation zu einem dieser beiden Grundzustands-Isomere (Schema 9) direkt cyclisieren. Man kann sich aber auch vorstellen, daß ein anderer Prozeß als die Verdrillung des Anregungszustandes, z.B. ein direkter elektrocyclischer Ringschluß, zum Ziel führt. In jedem Fall wird das Endprodukt erst im Anschluß an die Cyclisierung durch Wasserstoffverschiebung gebildet. Eine gestreckte Konformation ist jedenfalls Voraussetzung für jede erdenkliche Primärreaktion in BVE-IX $\gamma$  und BVE-IX $\delta$ . Tatsächlich deutet die starke Abhängigkeit der Ringschluß-Quantenausbeuten von der Bestrahlungswellenlänge deutlich auf eine Selektivität zugunsten der Reaktion in einer bestimmten Konformation<sup>[48]</sup>. So liegen die wirkungsvollsten Bestrahlungswellenlängen (575–600 nm) im Absorptionsbereich der gestreckten Formen. Mit höheren Wellenlängen, die zunehmend nur noch von der gekrümmten Form absorbiert werden, klingt hingegen die Effizienz rasch ab (Fig. 12).

Zum Verständnis der obigen Argumente, die sich auf die Absorptionseigenschaften der verschiedenen Formen stützen, sei daran erinnert, daß die Stokes-Verschiebungen für die gekrümmten Spezies groß und für die gestreckten klein sind. Dies bedeutet auch, daß die Absorption der gestreckten Formen relativ schmalbandig ist (560–660 nm) und sich auf der kurzwelligen Flanke der viel breiteren Absorptionsbande der gekrümmten Spezies befindet. Die Absorption der gekrümmten Form ist in der Tat durch das normale Absorptionsspektrum von BVE hinreichend wiedergegeben, da diese Spezies in den meisten Lösungsmitteln und offenbar unabhängig von der Konzentration (siehe Abschnitt 3.5) überwiegt. Die Absorption der gestreckten Formen hingegen ist nur im Anregungsspektrum der kurzwelligen Fluoreszenz zu finden.

Die Erkenntnisse aus der vergleichenden Untersuchung der IX $\alpha$ -, IX $\gamma$ -, IX $\delta$ - und XIII $\alpha$ -Isomere können wie folgt

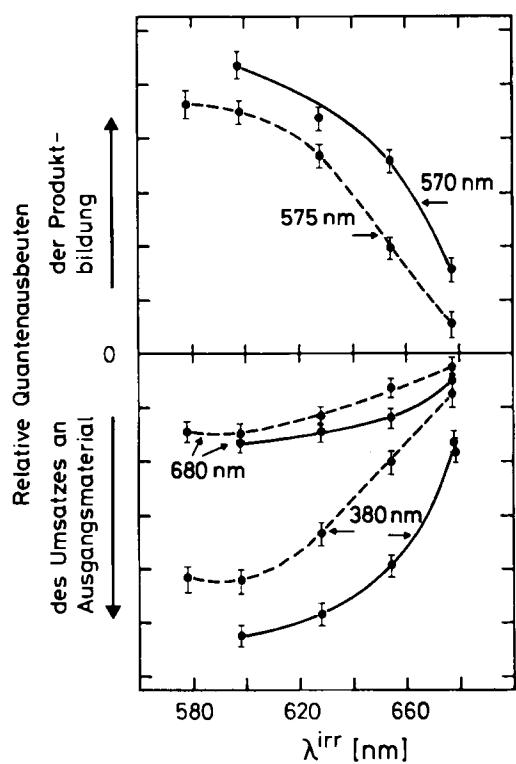
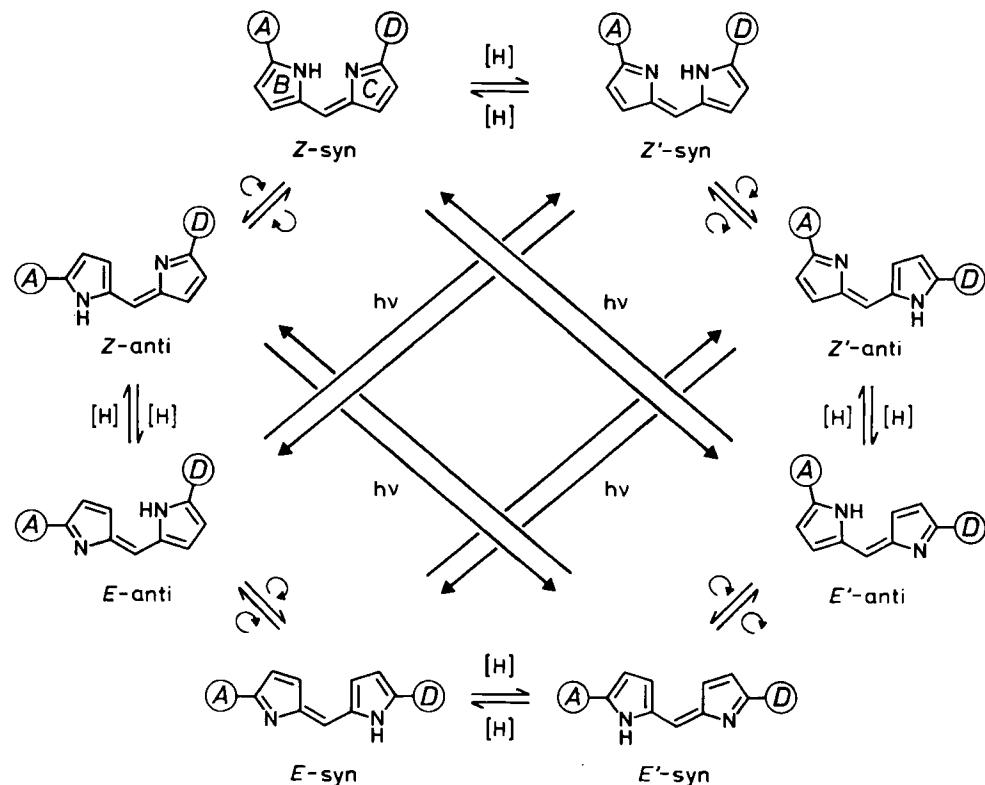


Fig. 12. Relative Quantenausbeuten als Funktion der Bestrahlungswellenlänge, des Umsatzes an BVE-IX $\gamma$  (—) und BVE-IX $\delta$  (---) (unten) und des Ringschlusses zu PBE (—) bzw. NBVE-IX $\delta$  (---) (oben). Für jede Reaktion sind die Messungen bei den jeweiligen Wellenlängen der drei Extrema der Differenzspektren vorgenommen worden, die bei der Bestrahlung in Dimethylsulfoxid erhalten werden. Die Anfangskonzentrationen von BVE-IX $\gamma$  und BVE-IX $\delta$  lagen bei  $10^{-5}$  M [48].

zusammengefaßt werden: Der Streckvorgang der gekrümmten Konformation ist sowohl im Grundzustand als auch im Anregungszustand auf Umformungen innerhalb des B/C-Teils beschränkt, während die Z-syn-Geometrie der A/B- und C/D-Teilstrukturen, wie in Schema 5 dargestellt, erhalten bleibt. Die Zusammenstellung in Schema 10 läßt erkennen, daß die acht möglichen C-10-Isomere eines unsymmetrisch substituierten Biliverdins drei topologisch differenzierte Gruppen bilden: 1) Zwei gekrümmte Z<sup>(i)</sup>-syn-Formen, 2) zwei gestreckte E<sup>(i)</sup>-syn-Formen sowie 3) vier gestreckte anti-Formen. Schema 10 zeigt außerdem, daß sich die gekrümmten (Z<sup>(i)</sup>-syn) und die gestreckten E<sup>(i)</sup>-anti-Formen durch direkte E $\rightarrow$ Z-Photoisomerisierung selektiv ineinander umwandeln lassen, während Ähnliches für die vier anderen gestreckten und die gekrümmten Formen nicht gilt.

Bei Bestrahlung in Ethanol bei 173 K ( $\lambda^{\text{irr}} = 650$  und 700 nm) stellt sich ein photostationäres Gleichgewicht ein, das im Vergleich zur grundzustandskontrollierten Zusammensetzung zugunsten der gestreckten Formen verschoben ist<sup>[44]</sup>. Die ursprüngliche Zusammensetzung wird beim Aufwärmen der Lösung auf Raumtemperatur wiederhergestellt, bei der sich weder eine ähnlich haltbare photochemische Änderung<sup>[44, 60, 71]</sup> noch Zwischenprodukt-Absorptionsen im Mikrosekundenbereich<sup>[7, 72]</sup> mehr nachweisen lassen. Wie allerdings eine LIOAS-Untersuchung aufdeckte<sup>[71]</sup>, kommt es bei BVE aber auch unter diesen Bedingungen zu einer jetzt bereits im Mikrosekundenbereich thermisch reversiblen Photoisomerisierung. Dies läßt sich aus marklichen Verlusten an „prompter“ Wärmeentwicklung,  $\alpha$ , herleiten, die bei der Bestrahlung von BVE in kleinen



Schema 10. Möglichkeiten zur gegenseitigen Umwandlung der acht C-10-Isomere von BVE durch Protonübertragung zwischen den B/C-Stickstoffatomen ([H]), Drehung um die Einfachbindung C-9-C-10 ( $\curvearrowright$ ) und E $\rightarrow$ Z-Isomerisierung der Doppelbindung C-10=C-11 (hv). Dieses Schema leitet sich von Schema 5 durch Einführung der unsymmetrischen IX $\alpha$ -Substitution ab, wobei auch hier die Geometrie innerhalb der A/B- und C/D-Teilstrukturen nicht verändert wird.

Konzentrationen ( $10^{-6}$  M) gemessen werden (siehe Fig. 13). Diese Befunde sind analog zu denjenigen mit BVE in Liposomen (Abschnitt 3.3). Es ist in diesem Zusammenhang auch interessant, daß für die (*E,Z,Z*)- und (*Z,Z,E*)-isomeren BVEs<sup>[46]</sup>  $\alpha$ -Werte über 1 (z. B.  $\alpha = 1.3$  bei  $\lambda^{irr} = 640$  nm)<sup>[71]</sup> erhalten werden. Diese zusätzliche „prompte“ Wärmeabgabe ergibt ein Energiegefälle von ca. 40 kJ/mol für den insgesamt exothermen Übergang zu all-Z-BVE.

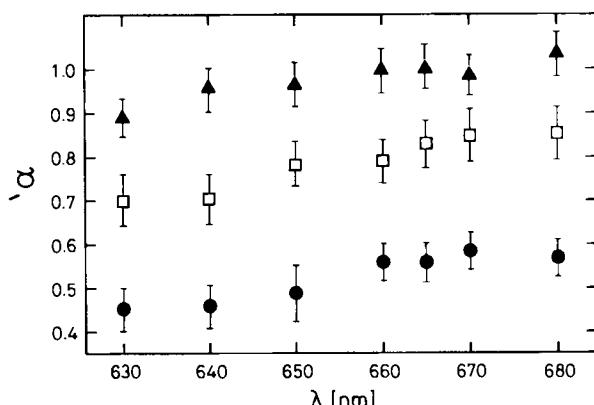


Fig. 13. LIOAS von BVE in Ethanol: Anteile ( $\alpha$ ) der „prompten“ Wärmeentwicklung;  $\bullet = 1.0 \times 10^{-6}$  M,  $\square = 2.0 \times 10^{-6}$  M,  $\blacktriangle = 1.3 \times 10^{-5}$  M [71].

Die thermische Stabilität von gestrecktem BVE ist somit verschieden, je nachdem ob es durch Erwärmung oder Ultraschall-Behandlung (Abschnitt 3.3) oder photochemisch aus gekrümmtem BVE entstanden ist. Die in Schema 10 dargestellten gegenseitigen Beziehungen der Formen lassen eine mögliche Erklärung dieser anscheinend widersprüchlichen Feststellung erkennen. Während die photochemische Streckung von gekrümmtem BVE direkt die *E*<sup>(1)</sup>-anti-Formen liefert, mögen sich beim Erwärmen darüber hinaus *E*<sup>(1)</sup>-syn-Konformationen bilden. Damit ist aber auch die C–C-Drehung in diesen letzteren als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Rückbildung von gekrümmtem BVE impliziert. Für die umgekehrte Richtung, d. h. die thermische Streckung von gekrümmtem BVE zur *E*<sup>(1)</sup>-syn-Form, steht noch nicht fest, welche der beiden beteiligten C–C-Drehungen geschwindigkeitsbestimmend ist.

In Anbetracht des photochemischen Verhaltens von BVE und seiner  $IX\gamma$ - und  $IX\delta$ -Isomere erscheint die Annahme berechtigt, daß die  $10E \rightarrow 10Z$ -Photoisomerisierung eine möglicherweise beachtliche Rolle als Desaktivierungs-kanal von angeregtem BVE spielt. Diese Schlußfolgerung ruft zwei weitere Aspekte der Bilatrien-Photochemie in Erinnerung. Der eine betrifft das photochemische Verhalten von BVE, das an Aluminiumoxid adsorbiert<sup>[46, 73]</sup> oder in Lösung in Gegenwart starker Elektronendonoren<sup>[74]</sup> bestrahlt wird. Bei den unter diesen Bedingungen beobachteten Photoreaktionen handelt es sich eigentlich um „bilirubin-artige“ Isomerisierungen der Doppelbindungen an C-4 und C-15 unter Bildung der (*E,Z,Z*)- und (*Z,Z,E*)-Isomere. Diese Produkte sind thermisch stabiler als die (*Z,E,Z*)-Isomere von BVE und wären bei der Bestrahlung von BVE in inerten Lösungsmitteln nicht unentdeckt geblieben. Der bemerkenswerte Unterschied in der Photochemie ist einer starken Wechselwirkung zwischen einem Donor und C-10 oder sogar einer intermediären nucleophilen Addition an

diese Stelle zugeschrieben worden. Das solchen Anlagerungen<sup>[4, 75]</sup> zugrunde liegende Elektronendichte-Minimum beruht auf der extensiven Delokalisierung im Bereich der Ringe B und C, die ihrerseits durch die Wasserstoffbrücke zwischen den zentralen Stickstoffatomen bewirkt wird<sup>[76]</sup>. Es entstehen dabei Zwischenprodukte vom Bilirubintyp, die anschließend photoisomerisieren. Bei tiefer Temperatur bedeutend effizienter fluoreszierend als die Verdine (vgl. Tabelle 1), sind sie auch als die in Spuren auftretenden Quellen der sogenannten „blauen“ oder „anormalen“ Emission von BVE<sup>[4, 77]</sup> und Phytochrom<sup>[25]</sup> identifiziert worden<sup>[4]</sup>. Die Schrittfolge der Isomerisierung ist für die 2,3-Dihydrobilatrien-Modellsubstanz des Phytochroms experimentell nachvollzogen worden. Nach Anlagerung von 2-Mercaptoethanol an C-10 findet eine selektive *Z*  $\rightarrow$  *E*-Photoisomerisierung des Dipyrromethenon-Teilchromophors statt<sup>[46]</sup>, während bei der Bestrahlung des intakten 2,3-Dihydrobilatriens in Gegenwart von Iod als Oxidationsmittel und von Pyridin letzteres an C-5 angelagert wurde<sup>[78]</sup>.

Der zweite Aspekt betrifft die Frage, warum sich die *E*  $\rightarrow$  *Z*-Photoisomerisierung in Abwesenheit mediuminduzierter Vorgänge auf die Doppelbindung zwischen den Ringen B und C beschränkt. Nach Berechnungen an und Versuchen mit Modellverbindungen<sup>[79]</sup> wurde vorgeschlagen, daß die Verdrillung im Anregungszustand bevorzugt an derjenigen Doppelbindung erfolgt, die bereits im Grundzustand am wenigsten planar ist. Dies wird eindeutig durch Resultate mit Etiobiliverdinen illustriert, deren Dipyrromethenon-Teilstrukturen aus sterischen Gründen durch *N*-Methylierung an den endständigen Ringen aus der Ebene gedreht sind. Die betreffenden Subchromophore werden dementsprechend destabilisiert. Die Bestrahlung ergibt daher bereits in inerer Lösung (*E,Z,Z*)- und (*Z,Z,E*)-Isomere, wobei jeweils selektiv nur die einem methylierten Ring benachbarte Doppelbindung reagiert<sup>[79]</sup>.

### 3.5. Die Aggregatbildung

Die Tendenz von BVE zur Aggregatbildung (siehe Abschnitt 3.1) kann sich auf verschiedene Weise manifestieren. So vermag BVE, wie übrigens auch BRE, starke Addukte variabler Stöchiometrie mit Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran, Acetonitril und Milchsäureethylester zu bilden<sup>[80]</sup>. Eine weitere Art der Aggregierung ist aus den LIOAS-Resultaten in Figur 13 ersichtlich. Es wurde vorgeschlagen<sup>[71]</sup>, daß statische Unterdrückung der Bildung der (*Z,E,Z*)-Photoisomere durch Assoziation eines nichtidentifizierten Inhibitors mit BVE im Grundzustand die Konzentrationsabhängigkeit von  $\alpha$  hervorruft; eine Abweichung vom Lambert-Beer-Gesetz im Bereich der langwelligen Absorption tritt dabei nicht auf. Erst kürzlich ließ sich nachweisen, daß es sich um eine Assoziation von gleichen BVE-Molekülen handelt<sup>[68]</sup>. Wie aus Figur 14 hervorgeht, befindet sich das Emissionsmaximum von  $10^{-4}$  M BVE in Methanol bei etwa 735 nm. Seine Intensität verringert sich mit zunehmender Verdünnung, und es sind eine Verschiebung nach kürzeren Wellenlängen und zugleich das Auftreten der bei höheren Konzentrationen nicht sichtbaren Bande bei etwa 650 nm zu verzeichnen. Bei Konzentrationen von  $10^{-6}$  M ist die längstwellige Fluoreszenzbande

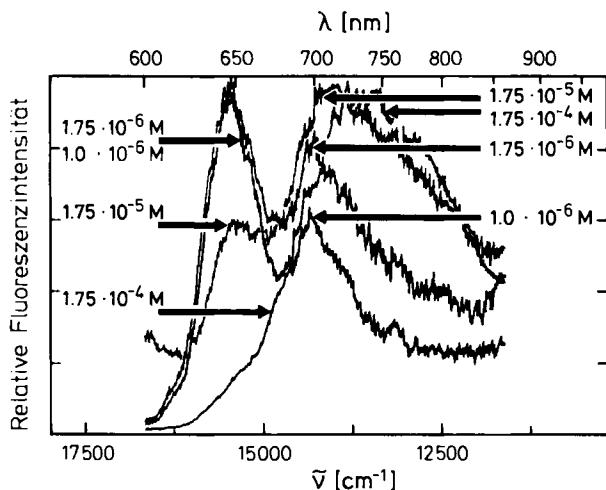


Fig. 14. Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz von BVE in Methanol bei Raumtemperatur;  $\lambda^{irr} = 580$  nm. Die Stammlösung ( $1.75 \cdot 10^{-4}$  M) wurde ohne Erwärmung oder Ultraschall-Behandlung hergestellt. Die Maxima der Spektren sind normiert [68].

verschwunden; es verbleiben jene bei 700 und 650 nm. Eine quantitative Erfassung der drei Emissionsbanden ist mit einem großen Fehler behaftet, da diese Messungen die Grenze der instrumentellen Empfindlichkeit erreichen. Es ließ sich dennoch mit ausreichender Sicherheit feststellen, daß die Fluoreszenz um 700 nm, die dem gekrümmten Monomer zuzuordnen ist, weitgehend unabhängig von der Konzentration ist. Die Banden der gestreckten Formen um 650 und um 735 nm hingegen werden mit abnehmender Konzentration stärker bzw. schwächer. Es ist somit erwiesen, daß es sich bei der Assoziation um eine Dimerisierung der gestreckten *Z-syn, E<sup>(r)</sup>-anti, Z-syn*-Formen handelt. Die Anregungsspektren der in Figur 14 wiedergegebenen Fluoreszenzen lassen mit zunehmender Konzentration erwartungsgemäß eine deutliche Verbreiterung der beiden Banden erkennen, zusammen mit einer hypsochromen Verschiebung des Vis-Maximums von 635 nm nach etwa 600 nm und einer bathochromen Verschiebung des UV-Maximums von 345 nm nach etwa 380 nm.

#### 4. Schlußbemerkungen und Ausblick

Die heutige Kenntnis des konformativen Verhaltens sowie der Photophysik und der Photochemie der Gallenpigmente BRE und BVE stützt sich auf eine Vielfalt experimenteller und theoretischer Studien, von denen in diesem Beitrag nur eine Auswahl berücksichtigt werden konnte<sup>[82]</sup>. Die Formenvielfalt in organischen Lösungsmitteln und der unterschiedliche Einfluß von Medium, Temperatur und Konzentration auf die Komponenten – sowohl im elektronischen Grundzustand als auch im ersten angeregten Singulettzustand – sind beiden Verbindungstypen gemeinsam, auch wenn in Details wichtige Unterschiede bestehen mögen. Es ist auch zu bedenken, daß noch nicht alle Einzelheiten verstanden werden. Die bisher ausführlichste Untersuchung ist an BVE unter Ergänzung der statischen Spektroskopiemethoden durch solche mit mittlerer (LIOAS) sowie größtmöglicher Zeitauflösung (PP und SPT) durchgeführt worden. Sie ergibt ein schon recht vollständiges Bild der strukturellen und dynamischen Merkmale der diversen Komponenten, ihrer selektiven gegenseitigen Umwandlun-

gen auf photochemischem und thermischem Weg, sowie der Natur und jeweiligen Bedeutung der Desaktivierungskanäle der individuellen Singulettanregungszustände.

Wie bereits in Abschnitt 1 erwähnt, dürfte allein schon das physikalische und (photo)chemische Verhalten der linearen Tetrapyrrole *in vitro* das relativ aufwendige spektroskopische Studium dieser Verbindungen und die damit zum Teil verbundenen instrumentell-methodischen Entwicklungen (z. B. <sup>[61, 71]</sup>) rechtfertigen. Die Resultate bestätigen aber darüber hinaus auch die Erwartung, daß sie eine Hilfe bei der Erforschung der molekularen Grundlagen biologischer Systeme mit solchen Pigmenten sind, eine Hilfe, auf die nicht verzichtet werden kann. So war die Aufklärung der anaeroben Photochemie von BR im Zusammenhang mit der Neugeborenen-Gelbsucht und der Weiterentwicklung der Phototherapie dieser Krankheit von großer Bedeutung. Auf den Wert der Rückschlüsse aus Kurzzeitkinetik und Photochemie von BVE für native Biliproteine wie Phytochrom und Phycocyanine ist schon kurz in den Abschnitten 3.2 und 3.5 hingewiesen worden. Es ist mit Sicherheit zu erwarten, daß Ergebnisse solcher Untersuchungen auch weiterhin<sup>[81]</sup> zu der noch viel anspruchsvoller Aufklärung der Vorgänge in den biologischen Systemen beizutragen vermögen. Dies wird noch verstärkt zutreffen, wenn als Modellsubstanzen Dihydrobilindione verwendet werden, die den nativen Chromophoren der Biliproteine strukturell noch näher stehen. An Oligopeptide gebunden, wie man sie durch partiellen Proteinabbau erhält, lassen sie sich in Experimenten verwenden, die nach den bisherigen Erfahrungen mit BVE in Lösung konzipiert sind, aber in noch naturnäheren Medien (z. B. Membranen) ausgeführt werden. Es sind ferner auch entscheidende Fortschritte bei den *in-vivo*-Studien durch Anwendung der spektroskopischen Methoden zu erwarten, die nicht zuletzt auch im Zusammenhang mit Arbeiten an den Tetrapyrrolmodellen entwickelt worden sind (z. B. LIOAS und SPT mit Mehrkomponentenauflösung in einem dynamischen Erfassungsbereich von  $> 3$  Größenordnungen).

Unsere hier zusammengefaßten Untersuchungen sind durch Zusammenarbeit mit Freunden und Kollegen an anderen Laboratorien erheblich bereichert worden, so mit Dr. W. Kufer und Professor H. Scheer, Universität München, Dr. A. A. Lamola, Bell Laboratories, Murray Hill, Professor D. A. Lightner, Universität von Nevada, Reno, sowie Dr. V. Sundström, Herrn Å. Sandström und Dr. T. Gillbro, Universität von Umeå. Die Untersuchungen wären aber vor allem nicht möglich gewesen ohne die Beiträge der Mitarbeiter des Mühlheimer Instituts, dem der mit diesem Beitrag gefeierte Jubilar als erster Direktor vorstand. Es sind dies unter anderem die Wissenschaftler Dr. H. Al-Ekabi, Dr. S. Culshaw, Dr. R. M. Ellul, Dr. H. Lehner, Dr. J. I. Matthews, Professor C. Nicolau, Dr. C. Pétrier, Dr. I.-M. Tegmo-Larsson, Professor R. G. Weiss (während seines Forschungsaufenthalts von der Georgetown-Universität) und J. Wendler, die technischen Assistent(innen) H.-J. Herbert, A. Keil, G. Koc, D. Kreft, W. Riemer, W. Schuster, V. Seeling und G. Wojciechowski sowie die Mitarbeiter des Rechenzentrums und der elektronischen und feinmechanischen Werkstätten.

Eingegangen am 13. Mai 1983 [A 467]

- [1] R. F. Troxler, A. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* 215 (1970) 503; R. F. Troxler, J. M. Dokos, *Plant Physiol.* 51 (1973) 72.
- [2] Neuere Übersichten siehe a) H. Scheer, *Angew. Chem.* 93 (1981) 230; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 241; b) H. Scheer in F. K. Fong: *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Bd. 35, Springer, Berlin 1982, S. 7.
- [3] A. F. McDonagh, L. A. Palma, D. A. Lightner, *Science* 208 (1980) 145; S. Onishi, K. Isobe, S. Itoh, N. Kawade, S. Sugiyama, *Biochem. J.* 190 (1980) 533; A. A. Lamola, W. E. Blumberg, R. McClead, A. Fanaroff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1882.
- [4] A. R. Holzwarth, H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Liebigs Ann. Chem.* 1978, 2002; S. E. Braslavsky, A. R. Holzwarth, H. Lehner, K. Schaffner, *Helv. Chim. Acta* 61 (1978) 2219.
- [5] R. W. Sloper, T. G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 445.
- [6] R. F. Chen in A. A. Thaer, M. Sernetz: *Fluorescence Techniques in Cell Biology*, Springer, New York 1973, S. 273; A. A. Lamola, J. Eisinger, W. E. Blumberg, S. C. Patel, J. Flores, *Anal. Biochem.* 100 (1979) 25.
- [7] E. J. Land, *Photochem. Photobiol.* 24 (1976) 475; 29 (1979) 483.
- [8] I. B. C. Matheson, N. U. Curry, J. Lee, *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 115.
- [9] A. R. Holzwarth, E. Langer, H. Lehner, K. Schaffner, *J. Mol. Struct.* 60 (1980) 367; *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 17.
- [10] M. Jirska, J. P. Dickinson, G. H. Lathe, *Nature* 22 (1968) 1322; C. C. Kuenzle, *Biochem. J.* 119 (1970) 395; A. Cu, G. Bellah, D. A. Lightner, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 2579; M. Carey, A. P. Koretzky, *Biochem. J.* 179 (1979) 675; J. Dalton, L. R. Milgrom, R. Bonnett, *Chem. Phys. Lett.* 61 (1979) 242.
- [11] R. Brædersen, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 2364.
- [12] C. C. Kuenzle, M. H. Weibel, R. R. Pelloni, P. Hemmerich, *Biochem. J.* 133 (1973) 364.
- [13] C. D. Tran, G. S. Beddard, *Biochim. Biophys. Acta* 678 (1981) 497.
- [14] B. I. Greene, A. A. Lamola, C. V. Shank, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2008.
- [15] C. D. Tran, G. S. Beddard, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6741.
- [16] A. A. Lamola, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, D. A. Lightner, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 263.
- [17] G. Blauer, D. Harmatz, A. Naparstek, *FEBS Lett.* 9 (1970) 53; G. Blauer, D. Harmatz, J. Snir, *Biochim. Biophys. Acta* 278 (1972) 68; G. Blauer, D. Harmatz, *ibid.* 278 (1972) 89; G. H. Beaven, A. d'Albis, W. B. Gratzer, *Eur. J. Biochem.* 33 (1973) 500; G. Blauer, G. Wagnière, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 1949.
- [18] W. Kufer, H. Scheer, A. R. Holzwarth, *Isr. J. Chem.* 23 (1983), im Druck.
- [19] W. West, B. H. Carroll in C. E. K. Mees, T. H. James: *Theory of the Photographic Process*, Macmillan, New York 1966, 3. Aufl., S. 243; G. Calzaferri, H. Gugger, S. Leutwyler, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 1969; W. Windhager, S. Schneide, F. Dörr, *Z. Naturforsch.* A 32 (1977) 876; G. Beddard, T. Doust, M. Windsor in R. M. Hochstrasser, W. Kaiser, C. V. Shank: *Picosecond Phenomena*, Springer, Berlin 1980, Bd. II, S. 166; V. Sundström, T. Gillbro, *Chem. Phys.* 61 (1981) 257; A. D. Osborne, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 76 (1980) 1638.
- [20] A. A. Lamola, J. Flores, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2530.
- [21] E. Vos de Wael, J. A. Pardo, J. A. van Koeveringe, J. Lugtenburg, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 96 (1977) 306.
- [22] H. Falk, S. Gergely, K. Grubmayr, *Monatsh. Chem.* 107 (1976) 987.
- [23] H. Falk, N. Müller, *Monatsh. Chem.* 113 (1982) 111.
- [24] H. Falk, F. Neufingerl, *Monatsh. Chem.* 110 (1979) 987.
- [25] A. R. Holzwarth, S. E. Braslavsky, S. Culshaw, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 581.
- [26] R. Bonnett, J. E. Davies, M. B. Hursthouse, G. M. Sheldrick, *Proc. R. Soc. London B* 202 (1978) 249.
- [27] D. A. Lightner, T. A. Wooldridge, A. F. McDonagh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 29.
- [28] A. F. McDonagh, D. A. Lightner, T. A. Wooldridge, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 110.
- [29] D. A. Lightner, T. A. Wooldridge, A. F. McDonagh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86 (1979) 235.
- [30] A. A. Lamola, J. Flores, F. H. Doleiden, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 649.
- [31] A. F. McDonagh, L. A. Palma, F. R. Trull, D. A. Lightner, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6865.
- [32] H. Falk, N. Müller, M. Ratzenhofer, K. Winsauer, *Monatsh. Chem.* 113 (1982) 1421.
- [33] A. F. McDonagh, L. A. Palma, D. A. Lightner, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6867.
- [34] G. L. Landen, Y.-T. Park, D. A. Lightner, *Tetrahedron* 33 (1983), im Druck; J. A. de Groot, R. van der Steen, R. Fokkens, J. Lugtenburg, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 101 (1982) 35, 219; A. Hori, S. Mangani, G. Pépe, E. F. Meyer, Jr., D. L. Cullen, H. Falk, K. Grubmayr, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1981, 1525; H. Falk, K. Grubmayr, G. Höllbacher, O. Hofer, A. Leodolter, F. Neufingerl, J. M. Ribo, *Monatsh. Chem.* 108 (1977) 1113; W. S. Sheldrick, A. Borkenstein, M. Blacha-Puller, A. Gosauer, *Acta Crystallogr.* 33 (1977) 3625; D. A. Lightner, Y.-T. Park, J. Heterocycl. Chem. 14 (1977) 415; H. Falk, K. Grubmayr, V. Herzig, O. Hofer, *Tetrahedron Lett.* 1975, 559.
- [35] D. A. Lightner, *Photochem. Photobiol.* 26 (1977) 427.
- [36] A. R. Holzwarth, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 635.
- [37] R. E. Davies, S. J. Keohane, *Photochem. Photobiol.* 17 (1973) 303.
- [38] R. W. Sloper, T. G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 743.
- [39] J. J. Lee, G. D. Gillispie, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 757.
- [40] A. J. Knell, F. Hancock, D. W. Hutchinson in A. F. Bakken, J. Fog: *Metabolism and Chemistry of Bilirubin and Related Tetrapyrroles*, Pediat. Res. Inst., Rikshospitalet, Oslo 1 1975, S. 234.
- [41] D. Kaplan, G. Navon, *Biochem. J.* 201 (1981) 605; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1981, 1374.
- [42] P. Manitto, D. Monti, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 122.
- [43] G. Favini, D. Pitea, P. Manitto, *Now. J. Chim.* 3 (1979) 299.
- [44] S. E. Braslavsky, A. R. Holzwarth, E. Langer, H. Lehner, J. I. Matthews, K. Schaffner, *Isr. J. Chem.* 20 (1980) 196; siehe auch idem, in J. De Greef: *Photoreceptors and Plant Development*, Proc. Annu. Eur. Symp. Plant Photomorphogenesis, Antwerpen University Press 1980, S. 89.
- [45] H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Liebigs Ann. Chem.* 1978, 1990.
- [46] H. Falk, K. Grubmayr, E. Haslinger, T. Schleiderer, K. Thirring, *Monatsh. Chem.* 109 (1978) 1451.
- [47] A. R. Holzwarth, J. Wendler, K. Schaffner, V. Sundström, Å. Sandström, T. Gillbro in T. Doust, M. A. West: *Picosecond Chemistry and Biology*, Science Reviews, Northwood 1983, im Druck; *Isr. J. Chem.* (1983), im Druck.
- [48] S. E. Braslavsky, H. Al-Ekabi, C. Pétrier, K. Schaffner, noch unveröffentlicht.
- [49] W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1976, 1457; H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Angew. Chem.* 90 (1978) 1012; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 948.
- [50] H. Falk, G. Höllbacher, *Monatsh. Chem.* 109 (1978) 1429.
- [51] H. Lehner, W. Riemer, K. Schaffner, *Liebigs Ann. Chem.* 1979, 1798.
- [52] G. Wagnière, G. Blauer, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 7806.
- [53] M. J. Burke, D. C. Pratt, A. Moscovitz, *Biochemistry* 11 (1972) 4052.
- [54] Q. Chae, P.-S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 4176; T. Sugimoto, K. Ishikawa, H. Suzuki, *J. Phys. Soc. Jpn.* 40 (1976) 258.
- [55] R. Pasternak, G. Wagnière, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 1662.
- [56] H. Scheer, H. Formanek, S. Schneider, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 259.
- [57] H. Falk, N. Müller, *Monatsh. Chem.* 112 (1981) 791.
- [58] M. Choussy, M. Barbier, *Helv. Chim. Acta* 58 (1975) 2651.
- [59] M. Bois-Choussy, M. Barbier, *Heterocycles* 9 (1978) 677.
- [60] M. Choussy, M. Barbier, *C. R. Acad. Sci. Paris C* 282 (1976) 619.
- [61] J. Wendler, A. R. Holzwarth, noch unveröffentlicht; vgl. A. R. Holzwarth, J. Wendler, W. Wehrmeyer, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 479.
- [62] M. E. Lippitsch, A. Leitner, M. Riegler, F. R. Aussenegg, *Springer's Series in Chemical Physics* 14 (1980) 327; 23 (1982) 323; *7th Vavilov Conference on Nonlinear Optics*, Akademgorodok/Novosibirsk 1981.
- [63] C. Pétrier, P. Jardon, C. Dupuy, R. Gautron, *J. Chim. Phys.* 78 (1981) 519.
- [64] H. Falk, K. Grubmayr, F. Neufingerl, *Monatsh. Chem.* 110 (1979) 1127.
- [65] H. Scheer, H. Formanek, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch.* C 34 (1979) 1085.
- [66] H. Falk, G. Höllbacher, O. Hofer, N. Müller, *Monatsh. Chem.* 112 (1981) 391.
- [67] a) I.-M. Tegmo-Larsson, S. E. Braslavsky, C. Nicolau, K. Schaffner, *Biophys. Struct. Mech., Suppl. zu Bd.* 6 (1980) 112; b) I.-M. Tegmo-Larsson, S. E. Braslavsky, S. Culshaw, R. M. Ellul, C. Nicolau, K. Schaffner, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 7152.
- [68] S. E. Braslavsky, I.-M. Tegmo-Larsson, H. Al-Ekabi, K. Schaffner, unveröffentlichte Resultate.
- [69] Die Photoakustik hat die allgemeine Aufmerksamkeit der modernen Spektroskopiker, der instrumentellen Analytiker und insbesondere der Photochemiker erst etwa 100 Jahre nach der Entdeckung des Effekts durch A. G. Bell [*Philos. Mag.* 11 (1881) 510] erweckt. Eine der ersten photoakustischen Untersuchungen dieses Jahrhunderts wurde in Professor Schencks Institut ausgeführt; E. Hey und K. Gollnick berichteten 1967 darüber auf der Internationalen Konferenz über Photochemie in München [zusammengefaßt in: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 72 (1968) 263; vgl. dazu *J. Photoacoustics* 1 (1982) 1]. Wie heute allgemein üblich, sprechen wir von optoakustischer Spektroskopie, wenn die Anregung durch Laser erfolgt.
- [70] A. M. Bonch-Bruevich, T. K. Razumova, I. O. Starobogatov, *Opt. Spectrosc. (USSR)* 42 (1977) 45, zit. Lit.
- [71] S. E. Braslavsky, R. M. Ellul, R. G. Weiss, H. Al-Ekabi, K. Schaffner, *Tetrahedron* 39 (1983) 1909.
- [72] C. K. N. Patel, A. C. Tam, *Rev. Mod. Phys.* 53 (1981) 517.
- [73] H. Falk, K. Grubmayr, *Angew. Chem.* 89 (1977) 487; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 470.
- [74] W. Kufer, E. Cmiel, F. Thümmler, W. Rüdiger, S. Schneider, H. Scheer, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 603.

- [75] H. Falk, T. Schlederer, *Monatsh. Chem.* 109 (1978) 1013; H. Falk, N. Müller, T. Schlederer, *ibid.* 111 (1980) 159; T. Manitto, D. Monti, *Experientia* 35 (1979) 1418; W. Kufer, H. Scheer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360 (1979) 935; *Z. Naturforsch. C* 37 (1982) 179.
- [76] B. Pullman, A.-M. Pérault, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45 (1959) 1476; J.-H. Fuhrhop, J. Subramian, *Philos. Trans. R. Soc. London B* 273 (1976) 335; V. Wray, A. Gossauer, B. Grünig, G. Reifenstahl, H. Zilch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1979, 1558.
- [77] P.-S. Song, Q. Chae, D. A. Lightner, W. R. Briggs, D. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 7892.
- [78] C. Krauss, C. Bubenzer, H. Scheer, *Photochem. Photobiol.* 30 (1979) 473.
- [79] H. Falk, K. Thirring, *Z. Naturforsch. B* 34 (1979) 1448, 1600; *B* 35 (1980) 376.
- [80] S. E. Braslavsky, H.-J. Herbert, A. R. Holzwarth, K. Schaffner, *J. Chromatogr.* 205 (1981) 85.
- [81] Es sei in diesem Zusammenhang speziell auf eine erst nach der Erstellung dieses Manuskripts veröffentlichte Sammlung neuester Mitteilungen auf diesem Gebiet in *Tetrahedron* hingewiesen; siehe vor allem H. Falk, N. Müller, *Tetrahedron* 39 (1983) 1875; A. Gossauer, *ibid.* 39 (1983) 1933; F. Thümmler, W. Rüdiger, *ibid.* 39 (1983) 1943; siehe ferner: H. Falk, K. Grubmayr, G. Kapl, N. Müller, U. Zrunek, *Monatsh. Chem.* 114 (1983) 753; H. Falk, G. Kapl, N. Müller, *ibid.* 114 (1983) 773.
- [82] J. A. Schellman, *Acc. Chem. Res.* 1 (1968) 144; G. Haas, P. B. Hulbert, W. Klyne, V. Prelog, G. Snatzke, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 491.

## Turgorine, Hormone der endogenen Tagesrhythmis höher organisierter Pflanzen – Nachweis, Isolierung, Strukturaufklärung, Synthese und Wirkung\*\*

Von Hermann Schildknecht\*

*Professor Adolf Butenandt zum 80. Geburtstag gewidmet*

Die auffallendste Lebenserscheinung ist die Bewegung, die man auch bei höher organisierten Pflanzen eindrucksvoll wahrnimmt, wenn durch eine Art „Flucht aus dem Raum“ z. B. die Sinnpflanze nach Berührung plötzlich „verschwindet“, oder wenn alle Fiederblättchen einer Akazie abends sich paarweise so zusammenlegen, als würde der Baum „schlafen“. Muskeln für die Lageänderung ihrer Organe im Raum haben diese Pflanzen nicht. Anstelle der Kontraktion eines „primitiv“ gebliebenen Actomyosinsystems wird bei dieser Bewegungsmechanik der hydrostatische Innendruck der Zellsaftvakuolen – der Turgor – in den Parenchymzellen der Bewegungsorgane oft drastisch und einseitig verringert. Kurzfristig und manchmal plötzlich ändert sich nach der Perception eines äußeren Reizes die Semipermeabilität der Plasmagrenzschichten und, vermittelt durch eine Reizleitung, auch des ganzen Symplasten eines vielzelligen pflanzlichen Organismus. Die Phytohormone, welche die molekulare Basis der hier diskutierten Bewegungsphysiologie bilden, sind isoliert und strukturell aufgeklärt worden. Diese als Turgorine bezeichneten chemischen Agonisten der Phytodynamik lösen die Blattbewegungen aus; darüber hinaus steuern sie sehr wahrscheinlich auch, eventuell gemeinsam mit anderen Phytohormonen, die stomatäre Transpiration über den Mechanismus der Spaltöffnungen. Somit ermöglichen die Turgorine nicht nur eine Temperaturregulierung, sondern sogar ihren eigenen Transport im Saftstrom des Pflanzenkörpers.

### 1. Zum Geleit

*Alexander der Große* hat auf seinen Feldzügen dem Generalstab befohlen, die „Wissenschaftlichen Erkundigungen“ – die „*ἰστοριατ*“, wie sie schon Jahrhunderte früher von den Ioniern genannt wurden – sorgfältig niederzuschreiben. Nachher wurden alle diese Berichte bei der Gründung des Weltreiches im Reichsarchiv zu Babylon gesammelt. Hier fertigte man auch für die gelehrte Welt wichtige Auszüge an, die später Anreiz und Grundlage für *Theophrast*s großartige „Pflanzengeographie“ waren<sup>[2]</sup>, in der er die botanischen Forschungen des Alexanderzuges umfassend und sachkundig verarbeitete und die „Physio-

gnomie“ und das „Verhalten“ vor allem der Gewächse des Morgenlandes erstmals schilderte. Ganz besonders widmete sich *Theophrast* den Bäumen mit gefiederten Blättern – mit ihrem lichten Schatten – und beschreibt diese mit dem Wort *τὸ πτερυγώδες*<sup>[3]</sup>.

*Mimosa asperata L.*, die Sinnpflanze des Altertums, zeigt diese Blattform sogar zweifach. Wie *Theophrast* treffend sagte, ist es dadurch der wunderbaren Mimose von Memphis möglich, bei Berührung in sich zusammenzufallen – sie vertrocknet! Nach einer Weile aber erholt sie sich und steht dann wieder in voller Kraft<sup>[4]</sup>.

Damit hat *Theophrast* wohl zum ersten Mal ein pflanzliches Mimikry beschrieben, wovon es inzwischen weitere Beispiele bei den attraktiven Orchideen und den insektenlockenden Pflanzen gibt<sup>[5]</sup>.

Daß die Griechen als vorzügliche Beobachter schon damals das Zusammenfallen und die nachfolgende Erholungsphase mit der Ab- bzw. Zunahme des Zelldruckes –

[\*] Prof. Dr. H. Schildknecht

Organisch-chemisches Institut der Universität  
Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg

[\*\*] Pflanzenabwehrstoffe, 21. Mitteilung. – 20. Mitteilung: [56].