

Steuerung der Struktur und Funktion von Biomakromolekülen durch Licht

Itamar Willner* und Shai Rubin

Der Sehvorgang sowie andere durch Licht ausgelöste biochemische Umsetzungen in Pflanzen und Lebewesen sind ausgeklügelte biologische Vorgänge, in denen optische Signale registriert und in (physiko)chemische umgesetzt werden. Photoschaltbare Biomakromoleküle sind eine neue Klasse von Substanzen, in denen optische Signale zwei diskrete Ein- und Aus-Zustände biologischer Funktionen erzeugen und die damit den Schaltelementen in Computern gleichen, die bei Änderung des elektrischen Stroms zwischen den Zuständen 0 und 1 wechseln. Die (Photo-)Chemie photochromer Stoffe wurde in den letzten vier Jahrzehnten sehr stark weiterentwickelt. Diese Substanzen isomerisieren bei Lichtabsorption, und die photoisomeren Zustände haben unterschiedliche spektroskopische und chemische Eigenschaften. Der Einbau photoisomerisierbarer (oder photochromer) Einheiten in Biomakromoleküle ermöglicht es, deren sekundäre Funktionen wie Biokatalyse, Bindung und Elektronentransfer nach

Wunsch ein- und ausschaltbar zu machen. Dies gelingt durch chemische Modifizierung des Biomakromoleküls durch photoisomerisierbare Einheiten oder durch Einbettung des Biomakromoleküls in photoisomerisierbare Mikroumgebungen wie Monoschichten oder Polymere. Die Photoschaltbarkeit ist im ersten Fall der lichtinduzierten Bildung und Störung des aktiven Zentrums über die photoisomeren Zustände zuzuschreiben und im zweiten durch Licht beeinflussbaren physikalischen oder chemischen Merkmalen der photoisomerisierbaren Systeme aus Polymeren, Monoschichten oder Membranen. Die Aktivierung katalytisch wirkender Biomakromoleküle durch Licht eröffnet eine Möglichkeit, das aufgenommene optische Signal durch biochemische Umwandlungen zu verstärken, und photostimulierte biochemische Redoxschalter ermöglichen die elektrochemische Weiterleitung und Verstärkung der registrierten optischen Signale. Über Photoschalter auf der Basis von Bioma-

kromolekülen wurde in den letzten Jahren als Teil der Suche nach molekularen Schalteinrichtungen und Mikromaschinen intensiv gearbeitet. Das umfangreiche Wissen über die Modifizierung von Biomakromolekülen, ihre gentechnische Erzeugung und die Herstellung von durch biologisch aktive Verbindungen modifizierten Oberflächen macht Biomakromoleküle mit verbesserten optischen Schalteigenschaften zugänglich. Ihr Einsatz in optoelektronischen/bioelektronischen Bauelementen ist nicht mehr nur eine Idee, sondern Realität. So wurde ihre Verwendung zur Informationsspeicherung und -verarbeitung (Biocomputer), in Sensoren, reversiblen Immunsensoren und biologischen Verstärkern optischer Signale bereits gezeigt; für die Zukunft bleiben aber noch bedeutende Herausforderungen.

Stichworte: Bioelektronik · Enzymaktivität · Optoelektronik · Photoschaltbare Systeme

1. Einleitung

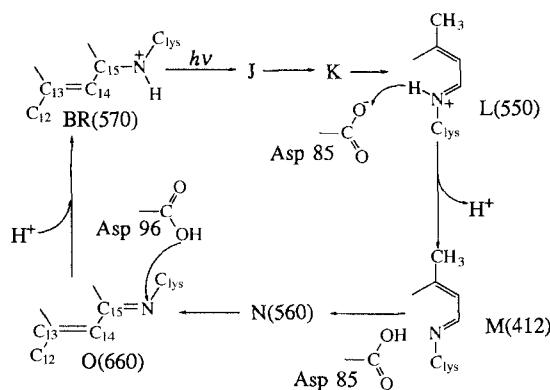
Viele biologische Prozesse werden durch Lichtsignale ausgelöst. Die Photosynthese^[1, 2] und der Sehprozeß^[3, 4] sind die fundamentalsten lichtgesteuerten biologischen Vorgänge. Die lichtinduzierte Bewegung auf mehreren biologischen Ebenen^[5] (Bewegung von mobilen Organismen, Dynamik von Pflanzengewebe), die lichtinduzierte Morphogenese^[6, 7] (Samenkeimung, Induktion der Blütenbildung, Synthese von Chlorophyll) und die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie^[8, 9] (ATP-Synthese, Protonenpumpen und Ionentransport)

sind weitere wichtige lichtinduzierte biologische Vorgänge. Das gemeinsame Merkmal dieser Systeme ist die Beteiligung eines Chromophors (Photosensors oder Photorezeptors), der durch Lichtabsorption eine Reihe von chemischen Umwandlungen in seiner Umgebung (Biomembran, Protein) induziert. Solche lichtaktivierte biochemischen Cyclen sind reversible, photobiologische optische Schalter, bei denen ein optisches Signal die biologische Reaktion auslöst, die im Dunkeln wieder gestoppt wird. Die fundamentalen Charakteristika von biologischen lichtgesteuerten Schaltern seien hier anhand der Funktionsweise des intensiv untersuchten Bacteriorhodopsinsystems kurz beschrieben.

Bacteriorhodopsin, ein retinalhaltiges Protein aus dem *Holobacterium Halobium*, wandelt Lichtenergie durch die Synthese von ATP in chemische Energie um^[10]. Der 11-*trans*-Retinal-Chromophor des Bacteriorhodopsins ist in die Bakterienmem-

[*] Prof. I. Willner, Dr. S. Rubin
Institute of Chemistry and Farkas Center for Light-Induced Processes
The Hebrew University of Jerusalem
IL-Jerusalem 91904 (Israel)
Telefax: Int. + 972/2-6527715

bran eingebettet und löst nach Lichtabsorption den Netto-Transport von Protonen von der inneren (cytoplasmatischen) auf die äußere (extrazelluläre) Seite der Zellmembran aus. Der dadurch entstehende Potentialgradient aktiviert eine membran gebundene ATPase zur ATP-Synthese^[11]. In Schema 1 sind die



Schema 1. Wechselwirkungen von Rhodopsin-Photoisomeren mit der umgebenden Membran, die im Protonenpumpen resultieren.

Wechselwirkungen des Photorezeptors mit dem ihn umgebenden Protein zusammengefaßt, das sowohl die zwischenzeitliche Netto-Bildung des Potentialgradienten als auch den Mechanismus der Relaxation des optischen Schalters beeinflußt. Aus der Photoisomerisierung des Chromophors (BR) resultiert der Zustand L, eine protonierte Schiff-Base, die durch einen Protonentransfer zum Asp85-Rest deprotoniert wird. Die nachfolgende Isomerisierung des Zustands O geht mit der Übertragung eines Protons vom Asp96-Rest einher, wodurch der ursprüngliche Chromophor regeneriert und der Photocyclus vervollständigt wird. Anhand des Photocyclus von Bacteriorhodopsin können die grundlegenden Prinzipien von biologischen Photoschaltern aufgezeigt werden:

- 1) Das optische Signal wird vom Photosensor aufgenommen und löst eine Strukturänderung im Chromophor aus.
- 2) Die Isomerisierung des Chromophors wird auf das umgebende Protein übertragen, wodurch dieses und damit eine Ionenpumpe stimuliert werden.

3) Der Photosensor-Protein-Komplex relaxiert so, daß der Photosensor für die Aufnahme eines zweiten optischen Signals regeneriert wird.

Photobiologische Schalter eignen sich wegen ihres schnellen Wechsels zwischen den verschiedenen Zuständen als optische Speicher^[12]. Die lichtstimulierten Übergänge des Bacteriorhodopsins BR → M → BR ermöglichen wiederholte Schreib- und Lösch-Cyclen^[13]. Zahlreiche Anwendungen^[14], wie das Speichern holographischer Aufnahmen^[15], das dynamische optische Filtern^[16] und assoziatives optisches Speichern^[17], wurden mit Bacteriorhodopsin als Photorezeptor entwickelt, was die weitreichenden praktischen Folgerungen aus der photochemischen Steuerung der Funktion von Biomakromolekülen veranschaulicht.

Daneben wurde und wird die Entwicklung von halbsynthetischen photobiologischen Schaltern vorangetrieben^[18]. Als photobiologischer Schalter wird ein biologisches System oder eine biologische Umgebung angesehen, deren biologische Funktion durch Licht aktiviert wird. Zwei prinzipiell unterschiedliche Unterklassen von biologischen Schaltern wurden entwickelt:

1) Einzelcyclus-Photoschalter sind eine Klasse von biologischen Photoschaltern, bei denen das Biomakromolekül durch die Verknüpfung mit lichtempfindlichen chemischen Schutzgruppen desaktiviert und durch die lichtstimulierte Abspaltung der Schutzgruppe in seine biologisch aktive Form umgewandelt wird (Schema 2)^[19, 20]. Die Aktivierung von Enzymen^[21–23],



Schema 2. Photobiologischer Einzelcyclus-Schalter. I = inaktives, II = aktives System; S = lichtempfindliche Schutzgruppe.

die lichtinduzierte Bildung von spezifischen Chelatbildnern^[24–26] und die lichtausgelöste Aktivierung von wichtigen biologischen Verbindungen wie cAMP^[27], cGMP^[28], ATP^[29] und InP₃^[30] konnten so bereits erreicht werden. Über die Einzelcyclus-Photoschalter gibt es schon mehrere Übersichtsartikel^[31–33].

Shai Rubin schloß das Studium an der Hebrew University of Jerusalem 1988 ab und promovierte dort 1994. Er arbeitet derzeit als Postdoc am Los Alamos National Laboratory, Materials Science and Technology Division. Sein Forschungsinteresse konzentriert sich auf die photo- und elektrochemische Aktivierung von Biopolymeren, auf durch Selbstorganisation gebildete Monoschichten und auf die Charakterisierung von Anordnungen aus dünnen Schichten mit physikalischen Methoden.

Itamar Willner wurde 1947 geboren. Er beendete sein Chemiestudium an der Hebrew University of Jerusalem 1978 mit der Promotion. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei M. Calvin an der University of California, Berkeley, und einer Forschungstätigkeit am Lawrence Berkeley Laboratory ging er 1982 als Senior Lecturer an das Institute of Chemistry der Hebrew University. Seine Forschungsinteressen umfassen lichtinduzierte Elektronentransferprozesse und künstliche Photosynthese, photo- und elektroschaltbare molekulare, makromolekulare und biologische Systeme und ihre Anwendung in der Optoelektronik/Bioelektronik, der Supramolekularen Chemie und der Photochemie sowie chemische und photochemische Umsetzungen an Monoschicht-Grenzflächen im Nanomaßstab.



I. Willner



S. Rubin

2) Mehrcyclen-Photoschalter sind das Ergebnis von Bemühungen, Biomakromoleküle oder biologische Umgebungen in lichtaktivierbare Matrizen umzuwandeln, die reversibel zwischen einem stummen (Schalter „aus“) und einem aktivierten Zustand (Schalter „ein“) wechseln (Abb. 1). Drei Methoden zur reversiblen Photostimulierung von Biomakromolekülen werden in Betracht gezogen:

a) Die chemische Modifizierung durch photoisomerisierbare Einheiten kann zu photoschaltbaren biologischen Systemen führen (Abb. 1 a), bei denen beispielsweise der Photosensor im

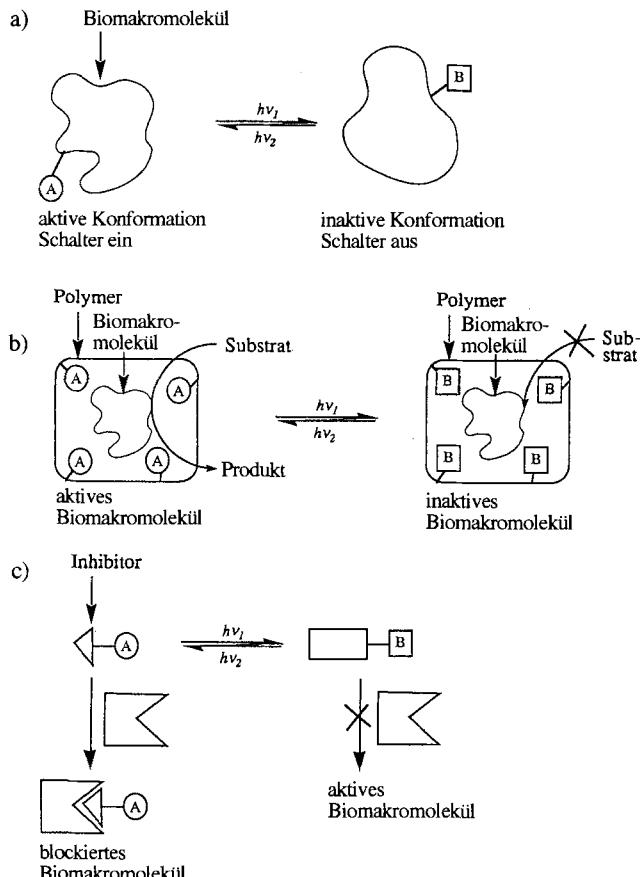


Abb. 1. Methoden zur Herstellung reversibler photobiologischer Schalter nach Maß: a) durch kovalente Anknüpfen photoisomerisierbarer Einheiten an das Biomakromolekül, b) durch Einbetten des Biomakromoleküls in eine photoisomerisierbare Umgebung, c) durch Verwenden eines niedermolekularen, photoisomerisierbaren Inhibitoren.

Zustand B die Konformation des Biomakromoleküls oder seiner Bindungsstelle (z.B. eines Proteins) stören und dadurch die biochemische Funktion unterbinden kann. Durch die Photoisomerisierung des Sensors in den Zustand A wird die ursprünglich induzierte Strukturänderung verringert, die Struktur der Bindungsstelle regeneriert und die biochemische Funktion aktiviert (Schalter „ein“). Bei reversibler lichtinduzierter Isomerisierung des Photosensors können die Funktionen des Biomakromoleküls, z.B. Biokatalyse oder Bindung, cyclisch ein- und ausgeschaltet werden.

b) Der Einbau in photoisomerisierbare Umgebungen ist eine weitere Möglichkeit, um biochemische Funktionen ein- und auszuschalten (Abb. 1 b). Die physikochemischen Eigenschaften von photoisomerisierbaren Modellmembranen (Polymeren,

Monoschichten und Liposomen) können durch Licht gesteuert werden^[34–38]. Dazu gehören die Benetzung^[39], der Sol-Gel-Übergang^[40], die effektive Volumenviskosität^[41] und die Permeabilität^[42]. Abbildung 1 b zeigt schematisch die Photostimulation der katalytischen Funktion eines Enzyms durch eine photoisomerisierbare Membran. In einem isomeren Zustand der Umgebung (A) ist die Membran undurchlässig für das Substrat, und das membrangebundene Enzym ist ausgeschaltet. Durch die Photoisomerisierung der Membran in den Zustand B wird sie permeabel für das Substrat, und die Funktion des Proteins wird aktiviert (Schalter „ein“).

c) Die Verwendung von niedermolekularen photoisomerisierbaren Verbindungen, die von Biomakromolekülen erkannt werden können, ist eine weitere Möglichkeit, diese reversibel zu aktivieren und zu deaktivieren (Abb. 1 c). Inhibitoren und Cofaktoren wirken als niedermolekulare Desaktivatoren bzw. Aktivatoren von Proteinen. Deshalb wird mit einem photoisomerisierbaren Inhibitor die reversible Desaktivierung und Aktivierung des entsprechenden Biomakromoleküls möglich. In einem photoisomeren Zustand (A) blockiert der Inhibitor die Bindungsstelle des Proteins, und die biologische Funktion ist ausgeschaltet. Im komplementären photoisomeren Zustand B fehlt der niedermolekulare Verbindung die inhibierende Wirkung, und sie wird aus der Bindungsstelle freigesetzt. Damit ist die biologische Funktion des Proteins wiederhergestellt^[33, 43–49]. Analog dazu kann mit einem photoisomerisierbaren Cofaktor ein reversibles Ein- und Ausschalten von biologischen Funktionen erreicht werden, wenn nur einer seiner photoisomeren Zustände vom Biomakromolekül erkannt wird.

Die Photochemie von reversibel photoisomerisierbaren Verbindungen wurde bereits im Zusammenhang mit photochromen Verbindungen ausführlich beschrieben^[50–53]. Mehrere Klassen von reversiblen Photoisomerisierungen sind verfügbar. Dazu gehören Isomerisierungen an Doppelbindungen (Stilbene, Azo-azorene, Indigo- und Thioindigoderivate)^[54, 55], photochemische $(4n+2)\pi$ -Elektronen-Ringschluß- und -Ringöffnungsreaktionen (Fulgide (= Dialkylidenbernsteinsäureanhydride), Spiropyran, Spirooxazine)^[56, 57], Photoisomerisierungen von $(4n-\pi)$ -Elektronen-Ringsystemen (Oxirane und Aziridine)^[58], Photoisomerisierungen durch Cycloadditionen^[59] und Photoisomerisierungen durch lichtinduzierte Tautomerie (*N*-Salicylidenedaniline, Schiff-Basen, *ac*-Nitroverbindungen)^[60, 61]. Die genannten Verbindungen können an biologische Substanzen, an Modellmembranen sowie an molekulare Inhibitoren (oder Cofaktoren) gekoppelt werden und dort als Photosensoren wirken.

Mehrere potentielle Anwendungen der photoschaltbaren Biomakromoleküle sind denkbar^[18, 62]: 1. Schnelle photobiologische Schalter als Schnittstellen für die Aufnahme und das Auslesen von optischen Signalen sind die Grundlage für optische Speicher und Biocomputer^[63, 64]. 2. Die Verstärkung von schwachen Lichtsignalen durch ein photoschaltbares katalytisches Biomakromolekül (Enzym) ist eine weitere optoelektronische Anwendung in der stummen Aus-Position. Die Absorption eines schwachen Lichtsignals durch den Photosensor aktiviert das Enzym, und die durch das Enzym katalysierte chemische Umwandlung verstärkt chemisch das Lichtsignal durch die cyclische Bildung des Reaktionsproduktes^[65]. 3. Auch therapeutische Anwendungen und die Entwicklung von reversiblen Biosensoren basierend auf photoschaltbaren Biomakromolekü-

len erscheinen möglich^[33]. Da viele Enzyme oder ihre Reaktionsprodukte als Therapeutica wirken^[66, 67], wäre mit ihrer reversiblen lichtinduzierten Aktivierung und Desaktivierung eine zielgerichtete und kontrollierte Freisetzung des therapeutischen Wirkstoffs im bestrahlten infizierten Organismus möglich. Die Verwendung von photoschaltbaren Biomakromolekülen zum Aufbau von reversiblen Biosensoren ist schematisch in Abbildung 2 gezeigt. Zahlreiche Biosensoren, z.B. Immunsen-

bunden sind, ausgeprägte Störungen der Struktur in der makromolekularen Matrix induziert, was sich in photoschaltbaren physikalischen Eigenschaften der makromolekularen Assoziate äußert^[39, 71–75]. Ähnlich lassen sich die Funktionen biologischer Makromoleküle durch Licht steuern, indem photoisomerisierbare Einheiten kovalent an sie gebunden werden.

2.1. Photochemische Steuerung der Struktur von Polypeptiden

Polypeptide sind synthetische Proteinanaloga, die in Abhängigkeit vom Reaktionsmedium, vom pH-Wert und von der Temperatur statistische Knäuel, α -Helices oder β -Faltblattstrukturen bilden^[76]. Die photochemische Beeinflussung von Polypeptidstrukturen durch kovalent gebundene photoisomerisierbare Gruppen^[77] stellt die Verbindung zwischen photostimulierbaren Biopolymeren und synthetischen photoisomerisierbaren Polymeren her.

Poly(L-glutaminsäure) wurde mit Nitrospiropyran-Einheiten modifiziert und das erhaltene Polymer in der Merocyaninstruktur **1a** in Hexafluoropropanol (HFP) stabilisiert. Die basische Phenolatgruppe (**1a**) wird vom Lösungsmittel protoniert

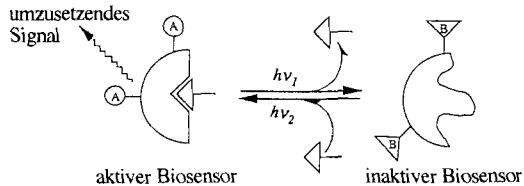


Abb. 2. Schematische Wirkungsweise eines reversiblen Biosensors, bei der eine photoisomerisierbare Reizaufnahmefläche eines Biomakromoleküls genutzt wird.

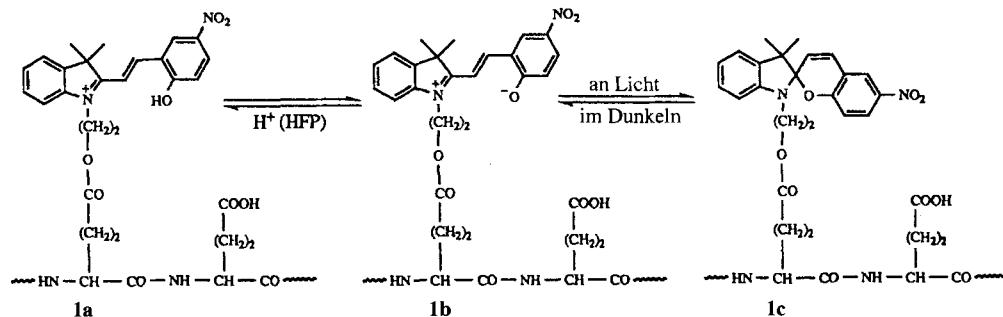
soren, wandeln den Prozeß der Bindung zwischen dem Analyten und dem biologischen Rezeptor in ein physikalisches Signal um (Farbe, Fluoreszenz, elektrochemische Antwort)^[68–70]. Wegen der starken Rezeptor-Analyt-Wechselwirkung können viele dieser Biosensoren jedoch nur einmal eingesetzt werden, sind also nicht wiederverwendbar. Mit photoisomerisierbaren Biomakromolekülen als Sensorschicht lassen sich die aktiven Biosensor-Oberflächen regenerieren. Der Biorezeptor, der mit einem Photosensor im isomeren Zustand A modifiziert wurde, ist für die Wechselwirkung mit dem Analyten aktiviert und damit für den Detektionsprozeß vorbereitet. Durch die Photoisomerisierung der biologischen Grenzschicht zum Zustand B nach dem ersten Detektionszyklus entsteht eine biologische Oberfläche mit einer geringen Affinität für den Analyten, was dessen Freisetzung erleichtert. Der Analyt kann folglich abgewaschen werden, und die Rückisomerisierung des biologischen Rezeptors zum Zustand A regeneriert die aktive Sensoroberfläche für den nächsten Analysezyklus^[33].

In dieser Übersicht sollen neuere Fortschritte bei der Entwicklung von photobiologischen Schaltern zusammenfassend dargestellt werden, die auf dem kovalenten Anbinden von photoisomerisierbaren Einheiten an biologische Materialien und auf der Immobilisierung von Biomakromolekülen^[*] in photoisomerisierbaren Umgebungen beruhen.

2. Photoregulierung der Struktur und Funktion von Biopolymeren und verwandten Makromolekülen durch verankerte photoisomerisierbare Einheiten

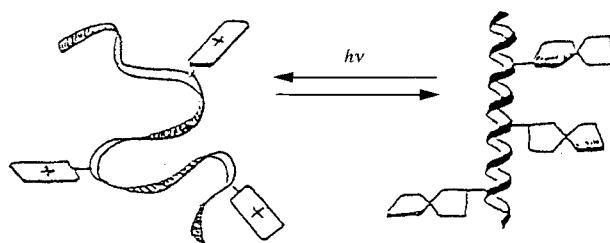
Es ist bekannt, daß die photochemische Isomerisierung von niedermolekularen Verbindungen, die an Makromoleküle ge-

[*] Im folgenden werden Biomakromoleküle vereinfachend als Biopolymere bezeichnet.



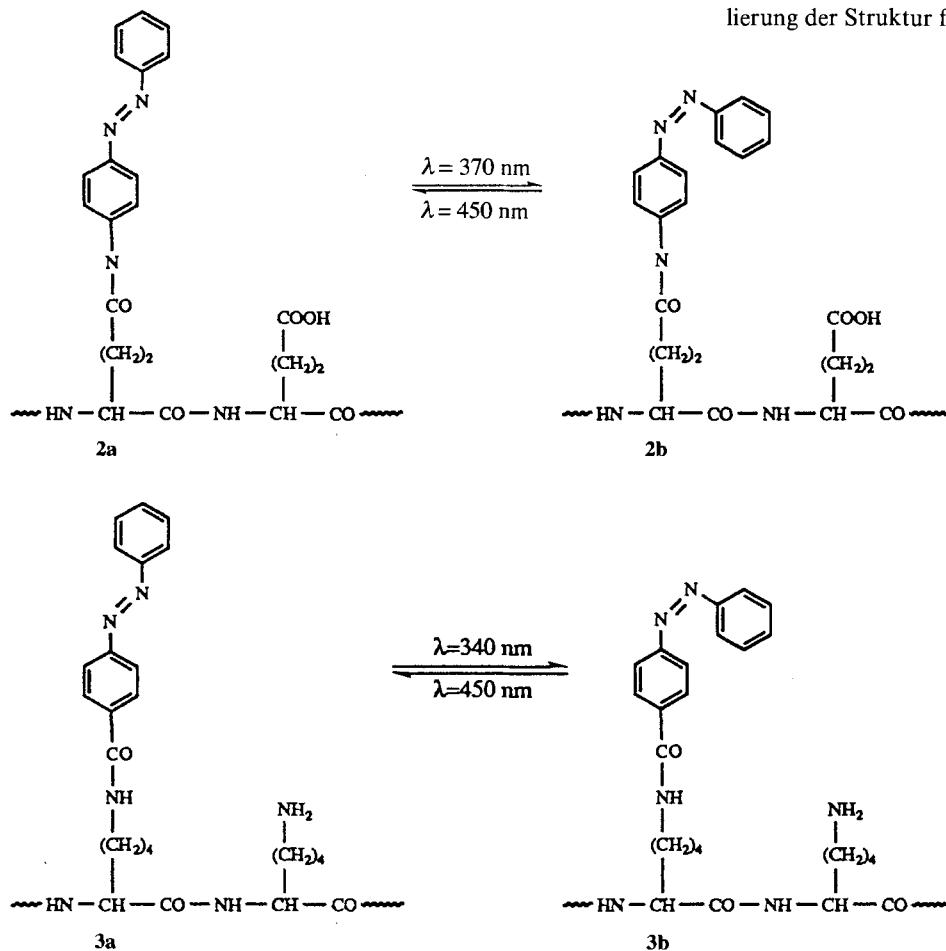
und dadurch das Polymer zu einer positiv geladenen Matrix. Die Bestrahlung der stabilen Mischung aus **1a** und **1b** mit sichtbarem Licht induziert die Isomerisierung zur Spiropyran-Poly(L-glutaminsäure) **1c**, die thermisch zu den Isomeren **1a** und **1b** zurückreagiert. Die Spiropyranform **1c** hat eine α -helicale Struktur, was sich in einem typischen CD-Spektrum mit zwei negativen Banden bei $\lambda = 208$ und 222 nm zeigt. Durch die Rückisomerisierung von **1c** zu **1a** und **1b** wird das CD-Signal schwächer, was bedeutet, daß sich das Peptid zu einer gestreckten Knäuelkonformation umorganisiert. Die Annahme einer geordneteren Struktur durch **1c** wird auf den hydrophoben, apolaren Charakter dieses Isomers zurückgeführt, der die Bildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und damit eine α -helicale Struktur begünstigt^[78, 79]. Die thermische Isomerisierung zu **1a**–**1b** führt zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den an das Polypeptid geknüpften positiv geladenen photoisomeren Einheiten. Dadurch wird die α -helicale Struktur gestört und in eine gestreckte Knäuelkonformation umgewandelt (Schema 3). Diese lichtstimulierte Umwandlung α -Helix \rightleftharpoons statistisches Knäuel ist reversibel.

Eine ähnliche Photoregulierung von Polypeptidstrukturen konnte mit Azobenzol-modifizierter Poly(L-glutaminsäure) **2**^[80, 81] und Azobenzol-modifiziertem Poly(L-lysin) **3**^[82] in Gegenwart geeigneter Detergentien erreicht werden. *trans*-Azoben-



Schema 3. Schematische Darstellung des durch Licht ausgelösten Übergangs statisches Knäuel \rightleftharpoons Helix bei der Spiropyran-modifizierten Poly-L-glutaminsäure 1.

zol-Poly(L-glutaminsäure) **2a** kann reversibel photoisomerisiert werden. Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 370 nm wandelt sie sich in das *cis*-Isomer **2b** um, das bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 450 nm zu **2a** rückisomerisiert. Die pK_a -Werte der freien Carbonsäurefunktionen einer Azobenzol-



Poly(L-glutaminsäure) (35 Mol-% Azobenzol-Einheiten) hängen von der Konfiguration der Azobenzol-Einheiten ab (pK_a = 6.8 für **2a** und 6.3 für **2b**). Der Unterschied in den pK_a -Werten des Polymers wurde auf die Polarität der *cis*-Azobenzol-Einheiten zurückgeführt, durch die die lokale Dielektrizitätskonstante der benachbarten Carbonsäurefunktionen erhöht wird. Daher wird durch Photoisomerisierung in wässriger Lösung ($pH = 6.5$) das *trans*-Isomer **2a** in das *cis*-Isomer **2b** in deprotonierter Form umgewandelt^[83]. Durch die photochemi-

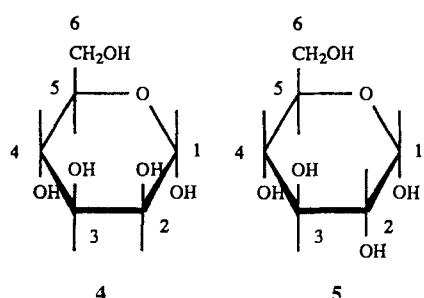
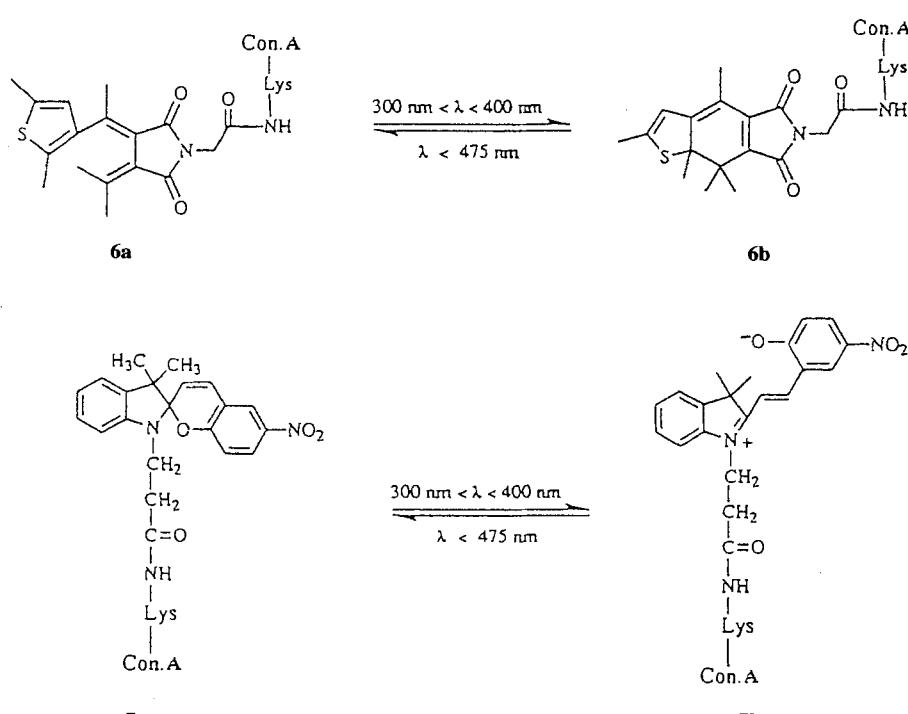
sche Isomerisierung wird jedoch nicht nur die Acidität der benachbarten Carbonsäurefunktionen, sondern auch die Struktur des Polymers beeinflußt: Es wurde festgestellt, daß das *trans*-Isomer **2a** (20 Mol-% photoisomerisierbare Gruppen) in Gegenwart von Micellen aus Dodecylammoniumchlorid als statisches Knäuel vorliegt. Die Photoisomerisierung zu **2b** induziert einen Knäuel \rightarrow Helix-Übergang, was zu zwei CD-Banden bei 210 und 228 nm führt. Die Existenz des *trans*-Isomers **2a** als ungeordneter Knäuel wurde auf den hydrophoben Charakter der *trans*-Azobenzol-Einheiten zurückgeführt, die durch ihre Gegenwart bei einer Reihe von Micellen eine Verzerrung des Polymers auslösen. Durch die Photoisomerisierung zu **2b** entstehen die polaren *cis*-Azobenzol-Polypeptide, die die Micellen verlassen. Dadurch wird die Bildung der stabilisierten α -Helix-Konformation des Polymers in der wässrigen Phase begünstigt^[84]. Bei Azobenzol-Poly(L-lysin) **3** konnte in Hexafluorpropanol/Wasser/Natriumdodecylsulfat (das Polymer enthielt 43 Mol-% Azobenzol-Einheiten) eine ähnliche Photoregulierung der Struktur festgestellt werden. Das CD-Spektrum des *trans*-Isomers **3a** ist für ein Polypeptid in der β -Faltblattstruktur charakteristisch. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 340 nm und Isomerisierung zu **3b** wurde die β -Faltblattstruktur zerstört und zum Teil eine α -Helix gebildet (α -Helix-Anteil 50%). Bei der Rückisomerisierung von **3b** zu **3a** durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 450 nm wurde die β -Faltblattstruktur zurückgebildet. Diese photo-stimulierten β -Faltblatt \rightleftharpoons α -Helix-Übergänge wurden auf die unterschiedlichen Geometrien und Polari täten der polymerfixierten Azobenzol-Einheiten zurückgeführt. Die β -Faltblattstruktur von Polypeptiden wird durch hydrophobe Wechselwirkungen der Polymerseitenketten stabilisiert. Entsprechend tragen die planare Struktur und die Hydrophobie der *trans*-Azobenzol-Einheiten zur Stabilisierung des β -Faltblatts bei. Die Photoisomerisierung zu **3b**, in dem die Seitengruppenchromophore eine polare Umgebung bilden, begünstigt die α -Helix-Konformation^[85].

2.2. Photogesteuerte Bindung von Proteinen

Die intermolekulare Erkennung ist eine Grundfunktion von Biopolymeren. In biologischen Prozessen wie der Katalyse im Enzym-Substrat-Komplex, dem Transport spezifischer Substrate durch natürliche Membranen und der Speicherung von Stoffen, insbesondere von niedermolekularen Verbindungen, spielen Erkennung und Bindung eine Hauptrolle. Die Modifizierung von Biopolymeren durch photoisomerisierbare Einheiten ist ein

gängiger Weg, die Bindungsaffinitäten der komplementären Komponenten mittels Licht zu steuern. Während in dem einen photoisomeren Zustand des Biopolymers die Bindungsstelle erhalten und die Bildung des intermolekularen Komplexes erleichtert ist, verzerrt der zweite photoisomere Zustand diese Stelle, so daß keine Bindung möglich ist.

Das Lectin Concanavalin A, Con. A, wurde mit photoisomerisierbaren Gruppen modifiziert und seine Bindungseigenschaften gegenüber α -D-Mannopyranose und α -D-Glucopyranose durch Licht gesteuert^[86-89]. Con. A ($M \approx 26$ kDa) ist ein aus vier Untereinheiten zusammengesetztes, kugelförmiges Lectin. Jede Untereinheit enthält Bindungsstellen für Mn^{2+} und Ca^{2+} , die bei der Erkennung von α -D-Mannopyranose **4** und α -D-Glucopyranose **5** zusammenwirken. Con. A wurde mit

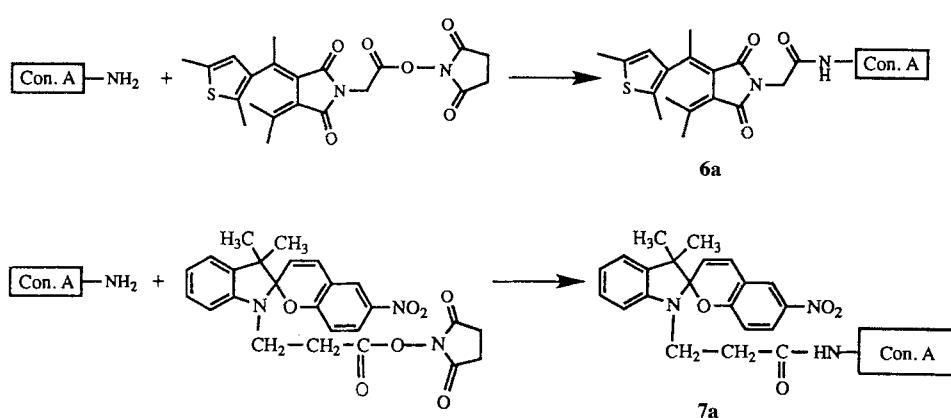


den photoisomerisierbaren Substanzen Thiophenfulgid^[86] und Nitrospiropyran^[87] modifiziert (Schema 4). Das nun lichtempfindliche Protein ist reversibel photoisomerisierbar: Beim Bestrahlen ($\lambda = 300-400$ nm) elektrocyclisiert das Derivat **6a** zu **6b**, das unter der Einwirkung von sichtbarem Licht, $\lambda > 475$ nm, wieder zu **6a** rückisomerisiert, und **7a** geht bei Belichtung mit $\lambda = 300-400$ nm eine photochemische 6π -Elektronen-Ringöffnung zum zwitterionischen Merocyaninderivat

7b ein. Dieses Photoisomer wird durch Bestrahlen mit sichtbarem Licht, $\lambda = 475$ nm, wieder zu **7a** elektrocyclisiert. In Tabelle 1 sind die Assoziationskonstanten für die Bindung zw.

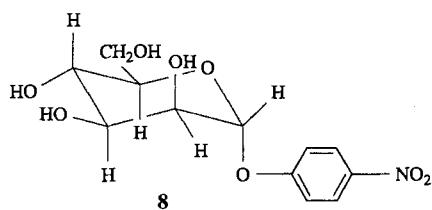
Tabelle 1. Assoziationskonstante K_a für die Bindung von **8** an die beiden photochromen Zustände von **6** und **7** als Funktion der Beladung des Proteins mit dem photochromen Substituenten.

| Beladung | K_a [M^{-1}] 6a | K_a [M^{-1}] 6b | K_a [M^{-1}] 7a | K_a [M^{-1}] 7b |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 22000 | | 24000 | |
| 3 | | | 23000 | 23000 |
| 6 | 16400 | 20000 | 18000 | 12000 |
| 8 | | | 10000 | 7300 |
| 9 | 7800 | | 12100 | |
| 12 | 6400 | 6400 | | |



Schema 4. Chemische Modifizierung von Concanavalin A durch photoisomerisierbare Thiophenfulgid- (oben) und Spiropyrrngruppen (unten).

schen **6/7** in den beiden photoisomeren Zuständen und Nitrophenyl- α -D-mannopyranose **8** bei mehreren Proteinbeladungen zusammengefaßt. Bei **6** hat der isomere Zustand **6b**, bei **7** dagegen **7a** eine höhere Affinität zu α -D-Mannopyranose. Der Unterschied in den Bindungseigenschaften der photoisomeren Con.-A-Zustände ist sehr empfindlich vom Belegungsgrad abhängig: Bei niedrigen Belegungen ändern sich die Affinitäten der photoisomeren Protein-zustände wenig, bei hohen Belegungen dagegen nehmen sie, ver-



mutlich wegen einer erheblichen Verzerrung des Proteins, signifikant ab.

Die unterschiedliche Affinität von **6a** und **6b** zu α -D-Mannopyranose wurde für die reversible photostimulierte Assoziation und Dissoziation des Wirtsubstrats genutzt (Abb. 3). In diesem

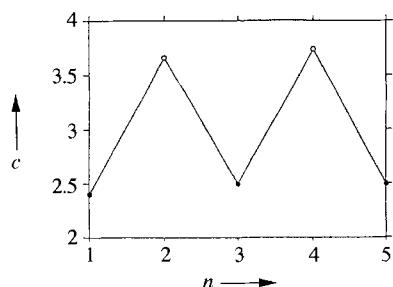


Abb. 3. Reversible photostimulierte Assoziation und Dissoziation im System **8/6**. (●) Protein im Zustand **6a**, (○) Protein im Zustand **6b**. *c* = Konzentration des Komplexes aus **6** und **8** in μM , *n* = Cyclenzahl.

System wird die Konzentration an freier α -D-Mannopyranose in Lösung durch den photoisomeren Zustand von Con. A gesteuert. Im Zustand **6b** bindet das Monosaccharid sehr wirksam an das Protein, seine freie Konzentration ist niedrig. Bei der Photoisomerisierung von **6b** zu **6a** nimmt die Bindungskonstante ab, und die Konzentration des freien Monosaccharids in Lösung steigt. Diese intermolekulare Komplexbildung und Dissoziation ist bei der Photoumschaltung von Con. A zwischen den Zuständen **6b** und **6a** vollständig reversibel.

Es gelang nicht nur die thermodynamische Steuerung der Bindung des Monosaccharids an die photoisomerisierbaren Con.-A-Proteine, sondern auch eine kinetische Steuerung der Assoziation zwischen Protein und Substrat wurde nachgewiesen^[90]. Dazu wurden auf Au-Elektroden selbstorganisierende Monoschichten aus Gastmonosacchariden aufgebaut (Abb. 4). Die

Kinetik der Assoziation der Con.-A-Derivate **7a** und **7b** an die Elektroden mit Monosaccharidmonoschicht wurde anhand der Elektrodenisolierung gegenüber einer in Lösung vorliegenden Redoxprobe verfolgt. Abbildung 5 veranschaulicht die Kinetik

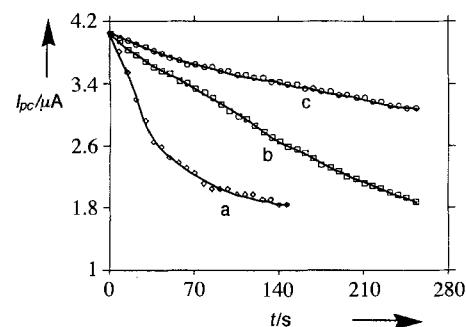


Abb. 5. Stromabfall I_{pc} bei einer $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -Redoxprobe durch Wechselwirkung der eine Phenyl- α -D-glucopyranose-Monoschicht tragenden Au-Elektrode mit a) natürlichem Con. A, b) **7a** und c) **7b**. Alle Versuche wurden in einer Drei-Elektroden-Zelle mit Ag/AgCl als Bezugselektrode durchgeführt. Elektrolytzusammensetzung: $1 \times 10^{-3} \text{ M K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $1 \times 10^{-3} \text{ M KCl}$ in 0.1 M Phosphatpuffer ($\text{pH} = 8$). Die Konzentration des zugefügten Proteins betrug 0.01 mg mL^{-1} . Alle Versuche wurden bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ durchgeführt; Abtastgeschwindigkeit 200 mV s^{-1} .

der Isolierung einer Elektrode, die mit einer über Thioharnstoff verknüpften Phenyl- α -D-glucopyranose-Monoschicht modifiziert wurde, mit natürlichem Con. A, dem Spiropyran-funktionalisierten Con. A **7a** und dem Merocyanin-modifizierten Con. A **7b**. Natürliches Con. A zeigt die höchste Affinität zur Gastmonoschicht-Elektrode, was sich in der raschen Isolierung der Monoschicht-Elektrode äußert. Das Photoisomer **7b** mit einer niedrigen Assoziationskonstante für die Bindung von α -D-Glucopyranose ($K_a = 12\,000 \text{ M}^{-1}$) zeigt für die Wechselwirkung mit der Elektrode eine langsame Kinetik. Das photoisomere Protein **7a** ($K_a = 18\,000 \text{ M}^{-1}$) assoziiert demgegenüber schneller an die Monoschicht-Elektrode. In Tabelle 2 sind die Zeitkonstanten für die Assoziation der Photoisomere **7a** und **7b** an die verschiedenen Monosaccharidmonoschicht-Elektroden zusammengefaßt.

Die unterschiedliche Assoziationsfähigkeit der Monosaccharide wurde auf verstärkte Störungen der Con.-A-Struktur und insbesondere der Bindungsstelle durch einen der photoisomeren Zustände zurückgeführt. Hinweise auf die strukturelle Verzer-

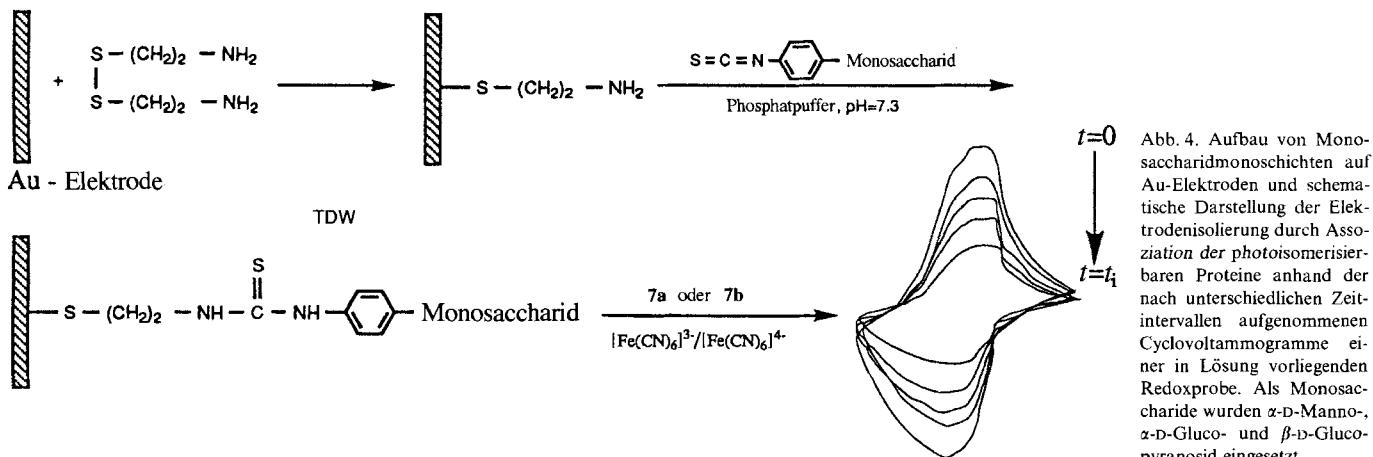


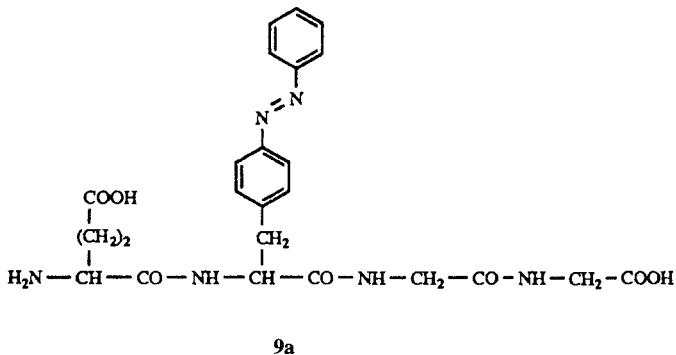
Tabelle 2. Zeitkonstante $\tau_{1/2}$ [s] [a] für die Assoziation von Con. A und Spiropyran-modifiziertem Con. A 7 an Monosaccharidsubstrate.

| Substrat | $\tau_{1/2}$ (Con. A) | $\tau_{1/2}$ (7a) | $\tau_{1/2}$ (7b) |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Phenyl- α -D-mannopyranosid | 40 | 60 | 160 |
| Phenyl- α -D-glucopyranosid | 85 | 220 | 670 |
| Phenyl- β -D-glucopyranosid | 100 | 100 | 100 |

[a] $\tau_{1/2}$ ist die Zeit, in der der Kathodenspitzstrom I_p auf die Hälfte seines ursprünglichen Wertes im Cyclovoltammogramm der $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -Redoxprobe abfällt. Diese Zeit entspricht der, nach der die Monoschicht zur Hälfte durch das Protein bedeckt ist.

rung von Con. A im Verlauf der Photoisomerisierung von 7a zu 7b und die damit verbundene Dynamik wurden durch zeitaufgelöste Lichtstreuungsversuche erhalten^[91]. Die Photoisomerisierung von 7a zu 7b ist mit einer vorübergehenden Zunahme des Protein-Lichtstreuungssignals verbunden, was auf eine Schrumpfung des Proteins bei der Isomerisierung schließen lässt. Die Dynamik der Proteinverdichtung wird durch die Zeitkonstante der Intensität des gestreuten Lichts wiedergegeben. Bei einem mit sechs photoisomerisierbaren Einheiten beladenen Protein schrumpfte die Matrix innerhalb von 60 μs . Bei einer Beladung mit acht Einheiten verlief die Strukturstörung mit einer biexponentiellen Kinetik, bei der die Schrumpfung zu einer metastabilen Proteinkonformation innerhalb von 60 μs auftrat und sich die Matrix über einen längeren Zeitraum ($\tau = 250 \mu\text{s}$) weiter verdichtete.

Die gegenseitige Erkennung von Antikörpern und Antigenen wurde unter Verwendung eines photoisomerisierbaren Antigens photostimuliert. Für das Hapten Glu-(trans-Azobenzol-Ala)-Gly₂ 9a wurde ein monoklonaler Antikörper (Z1HO1) herge-



stellt^[92]. Der trans-Azobenzol-Haptenzustand 9a zeigt eine hohe Affinität zum Antikörper. Der Bindungsvorgang wurde anhand der Lösung der Antikörperfluoreszenz durch Energietransfer zum assoziierten Azobenzol-Hapten verfolgt. Die erhaltene Assoziationskonstante beträgt $K_a = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Die Photoisomerisierung von 9a zum cis-Azobenzol-Hapten 9b ($\lambda = 360 \text{ nm}$) führt zu einem Haptenisomer mit geringer Antikörperaffinität, die sich in unvollständiger Lösung der Antikörperfluoreszenz äußerte. Bei weiterer Belichtung des Photoisomers 9b mit sichtbarem Licht ($\lambda = 430 \text{ nm}$) wird das aktive, vom Antikörper erkannte Hapten 9a wiederhergestellt. Die reversible Aufnahme und Freisetzung des Haptens wurde anhand der Fluoreszenz des Systems verfolgt (Abb. 6). Die lichtinduzierte Assoziation und Dissoziation eines Antigen-Antikörper-

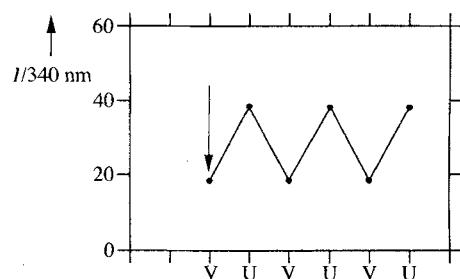
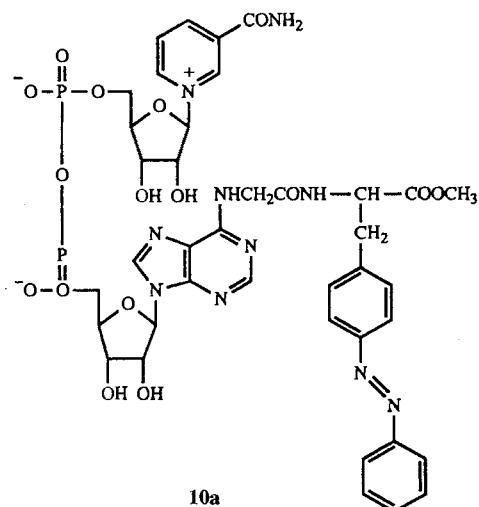


Abb. 6. Reversible photostimulated binding an den und Dissoziation des photoisomerisierbaren Haptens 9 vom monoklonalen Antikörper Z1HO1. V bezeichnet das Hapten in der *trans*-Konfiguration 9a, U steht für das Hapten im *cis*-isomeren Zustand 9b. Der Pfeil markiert die Zugabe von 9a, I ist die Intensität der Fluoreszenz bei 340 nm.

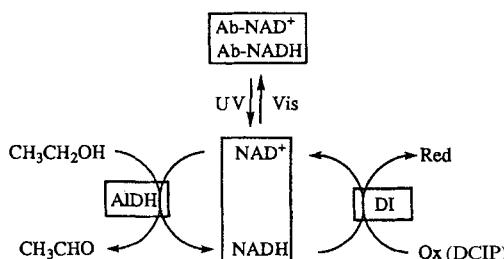
Paars könnte einen allgemeinen Zugang zu reversiblen Immunsensoren eröffnen (ein konkretes Beispiel findet sich in Abschnitt 3.3).

Der monoklonale Antikörper gegen *trans*-Azobenzol-Einheiten wurde kürzlich eingesetzt, um biokatalytische Aktivitäten reversibel photochemisch zu stimulieren. Dazu wurde der *trans*-Azobenzol-modifizierte NAD⁺-Cofaktor 10a hergestellt^[93].



Dieser Cofaktor ist photoisomerisierbar: Bei UV-Bestrahlung ($\lambda = 320 \text{ nm}$) bildet sich der *cis*-Azobenzol-NAD⁺-Cofaktor 10b. Ferner wird 10a durch Belichtung von 10b mit sichtbarem Licht, $\lambda > 420 \text{ nm}$, wiederhergestellt. Während 10a an den entsprechenden Antikörper bindet, wird 10b von diesem nicht erkannt und daher freigesetzt. Demzufolge bietet die Verknüpfung NAD⁺-abhängiger Enzyme mit dem *trans*-Azobenzol-NAD⁺-Antikörper eine Möglichkeit, die Verfügbarkeit des Cofaktors für biokatalysierte Umwandlungen zu steuern. Das heißt, die Bindung des Cofaktors im Zustand 10a an den Antikörper entfernt den freien Cofaktor aus der Lösung, und die Enzymaktivität ist inhibiert. Bei der Photoisomerisierung von 10a zu 10b dissoziert der Antikörper-Antigen-Komplex, der Cofaktor wird in die Lösung abgegeben und aktiviert das Enzym.

In Schema 5 ist die photostimulierte Aktivierung/Desaktivierung von NAD⁺-vermittelten biokatalytischen Umwandlungen mit dem photoisomerisierbaren Cofaktor 10 und dem entspre-



Schema 5. Reversible Photostimulierung von Alkoholdehydrogenase, ALDH, durch photoisomerisierbares, Azobenzol-modifiziertes NAD⁺ 10 in Gegenwart des monoklonalen Antikörpers (Ab) Z1H01. Diaphorase, DI, wird verwendet, um den oxidierten Cofaktor zu regenerieren. Die Ab-Komplexe oben sind inaktiv.

chenden *trans*-Azobenzol-Antikörper schematisch dargestellt. Die beiden NAD⁺/NADH-anhängigen Enzyme sind Alkoholdehydrogenase und Diaphorase. Im Zustand **10a** ist der Cofaktor an den Antikörper gebunden, und die Aktivitäten der beiden Enzyme sind blockiert. Durch Photoisomerisierung von **10a** zu *cis*-Azobenzol-NAD⁺ **10b** wird der Cofaktor vom Antikörper abgespalten und anschließend durch Ethanol in Gegenwart von Alkoholdehydrogenase zu *cis*-Azobenzol-NADH reduziert. Dieses wird in Gegenwart von Diaphorase durch 2,6-Dichlorphenol-indophenol, DCIP, oxidiert. Die biokatalytische Reduktion von DCIP durch Ethanol in Gegenwart der beiden Enzyme lässt sich durch Rückisomerisierung von **10b** zu **10a** und Einfangen des Cofaktors in der Antikörpermatrix blockieren. Dieser indirekte Zugang zu photomodulierbaren Enzymaktivitäten über Antikörper, die auf die mit einem Cofaktor verknüpfte photoisomerisierbare Einheit spezifisch ansprechen, sollte sich allgemein für die Erzeugung reversibel photoschaltbarer Biopolymere eignen. Die Anknüpfung photoisomerisierbarer Einheiten an Inhibitoren, Coenzyme, aktivierende Proteine usw. und die Verwendung entsprechender Antikörper könnten Enzymaktivitäten durch selektive Freisetzung der vom Biokatalysator abhängigen Cokomponente auslösen.

2.3. Photochemische Stimulierung von Enzymaktivitäten

Die Verknüpfung photoisomerisierbarer Einheiten mit Enzymen ist ein allgemeiner Weg, biokatalytische Aktivitäten zu steuern (Abb. 7). In dem einen photoisomeren Zustand sind die Tertiärstruktur des Proteins und die Konformation seines aktiven Zentrums erhalten; das Enzym kann seine natürliche Aktivität entfalten. Die Photoisomerisierung führt zu einer Verzerrung der Proteinstruktur, die auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Isomerzustand und dem Protein,

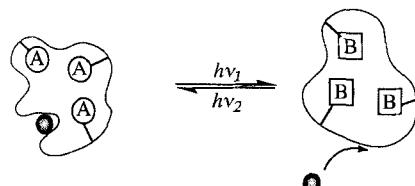
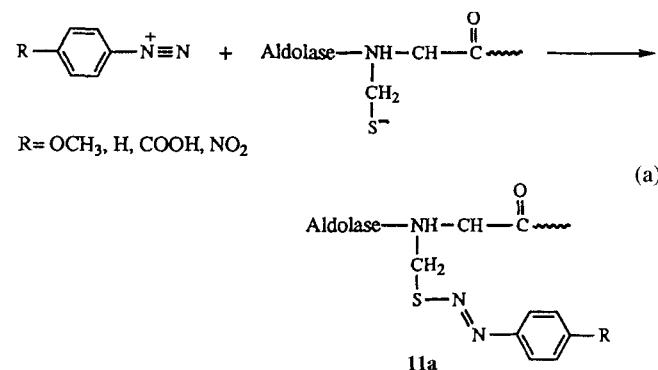


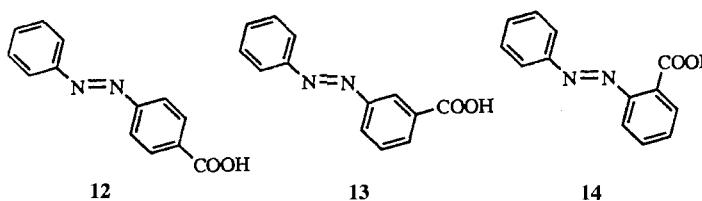
Abb. 7. Schematische Darstellung der reversiblen photoschaltbaren Aktivierung und Desaktivierung eines Enzyms durch kovalente Bindung photoisomerisierbarer Verbindungen. Im ungestörten Protein links ist die Bindungsstelle zugänglich, im gestörten Isomer rechts nicht.

sterische Verzerrungen oder das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen, die mit der Tertiärstruktur des Enzyms zusammenhängen, zurückgehen könnte. Die ersten Versuche zum photostimulierten Ein-/Ausschalten von Enzymen mit dieser Methode wurden von Montagnoli et al. beschrieben, die Aldolase am Cys237- und Cys287-Rest mit einer Reihe von Diazoniumsalzen modifizierten [Gl. (a)]^[94, 95]. Die erhaltene diazo-modifizierte Aldolase **11** war zwar photoisomerisierbar, aber die biokatalytischen Eigenschaften der beiden Zustände **11a** und **11b**

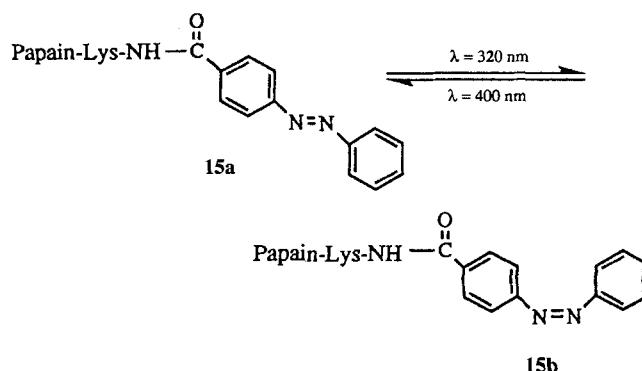


unterschieden sich nur wenig. In der Gelelektrophorese zeigten die isomeren Zustände unterschiedliche Beweglichkeiten, was darauf hindeutet, daß sie wahrscheinlich unterschiedliche Strukturen haben, das in das Protein eingebettete aktive Zentrum aber nicht verzerrt genug ist, um schaltbare biokatalytische Aktivitäten zu entfalten.

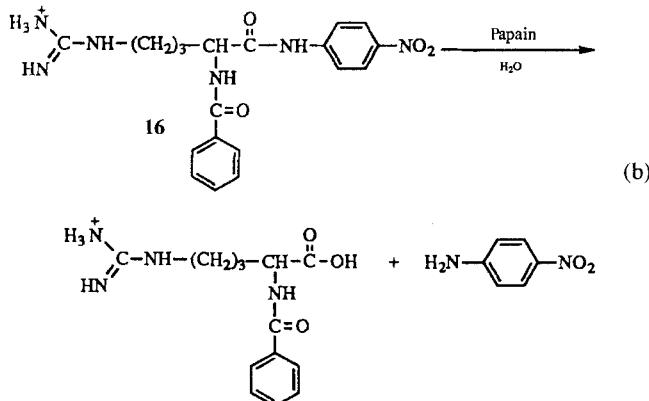
Das Verfahren wurde erfolgreich zur Photosteuerung der Aktivität von Papain eingesetzt^[96]. Dieses Enzym wurde durch kovalente Anbindung von *trans*-4-Carboxyazobenzol **12**, *trans*-3-Carboxyazobenzol **13** oder *trans*-2-Carboxyazobenzol **14** an seine Lysinreste modifiziert. Diese Azobenzol-modifizierten Pa-



paine unterliegen einer reversiblen *trans* \rightleftharpoons *cis*-Photoisomerisierung (**15a** \rightleftharpoons **15b**). Die Aktivität der modifizierten Enzyme



hängt von der Art der Azobenzolkomponente ab. (*trans*-4-Carboxyazobenzol)-Papain, (*trans*-3-Carboxyazobenzol)-Papain und (*trans*-2-Carboxyazobenzol)-Papain zeigen 80, 36 bzw. 1 % der Aktivität des natürlichen Enzyms. Die beste photostimulierte Enzymaktivität wurde für das 4-Carboxyazobenzolderivat **15** mit einer Beladung, die fünf photoaktiven Einheiten je Protein entspricht, nachgewiesen: Das *trans*-Isomer **15a** war bei der Hydrolyse von *N*-Benzoyl-D,L-arginin-*p*-nitroanilid **16** um etwa das 2.75fache aktiver als das *cis*-Isomer **15b** [Gl. (b)]. Die Photo-



toisomerisierung von **15a** zu **15b** führt zu einem photostationären Gleichgewicht, in dem $[15b]/[15a] = 0.89$ verdeutlicht, daß sogar die partielle Umwandlung zum *cis*-Isomer ausreicht, um die hydrolytische Aktivität des Enzyms zu hemmen. Die unterschiedlichen Aktivitäten der photoisomeren Papainzustände **15a** und **15b** ermöglichen die reversible cyclische Photostimulation des Hydrolyseprozesses [Gl. (b)], wie Abbildung 8 zeigt.

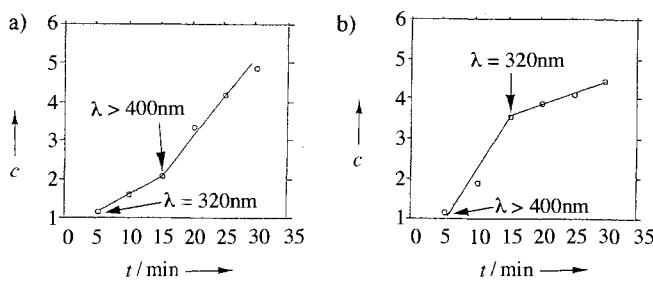
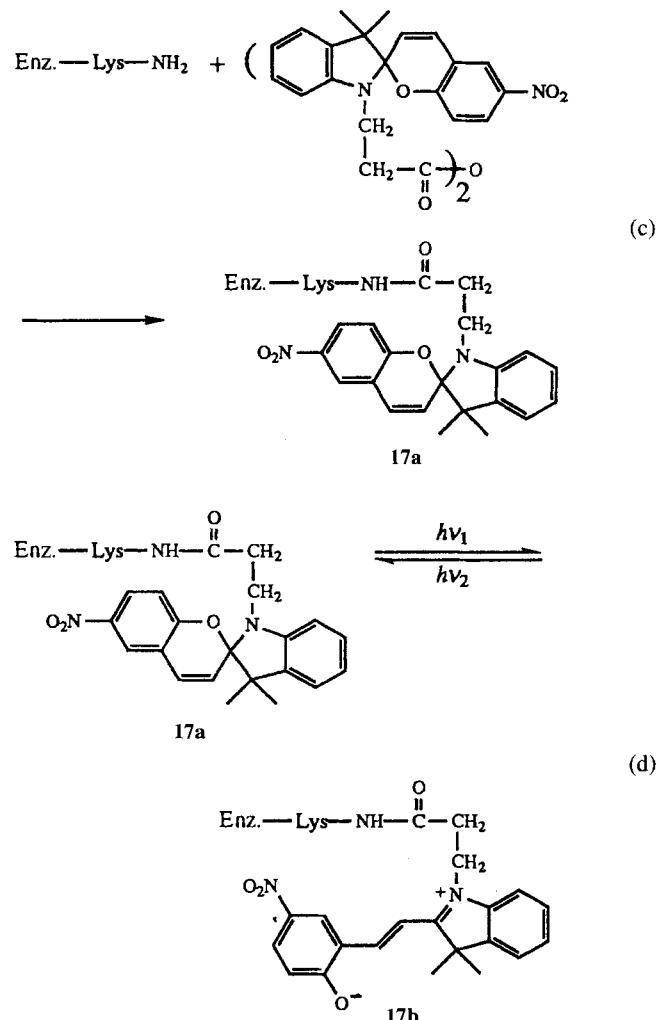


Abb. 8. Photostimulated Hydrolyse von **16** durch Azobenzol-modifiziertes Papain. a) Die Hydrolyse wird durch das *cis*-Derivat **15b** initiiert und durch Bestrahlung mit $\lambda > 400$ nm und Umwandlung von **15b** in das *trans*-Derivat **15a** eingeschaltet (Pfeil). b) Die Hydrolyse wird mit **15a** initiiert und durch Bestrahlung mit $\lambda = 320$ nm und Umwandlung von **15a** in **15b** ausgeschaltet (Pfeil). c = Produktkonzentration in 10^{-5} M.

Um den Mechanismus der photoschaltbaren Enzymaktivität aufzuklären, wurden kinetische Analysen des Biokatalysators in den beiden photoisomeren Zuständen **15a** und **15b** durchgeführt. Die beiden photoisomeren Zustände zeigen ähnliche V_{max} -Werte ((1.9 ± 0.2) mm min $^{-1}$), unterscheiden sich aber in ihren K_m -Werten ($K_m = (2.2 \pm 2)$ mm für **15a** und (6.5 ± 0.6) mm für **15b**). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die Bindung des Substrats an die aktive Enzymposition im Aus-Zustand von Papain, **15b**, inhibiert ist, die katalytischen Funktionen des aktiven Zentrums durch die Photoisomerisierung aber nicht beeinflußt werden.

Eine sehr ähnliche Aktivierung/Desaktivierung biokatalytischer Funktionen wurde für eine Reihe Spiropyran-modifizierter Enzyme beschrieben^[97, 98]. Die durch kovalente Anknüpfung von Spiropyran-Einheiten an Enzyme (Enz.) erhaltenen Derivate [Gl. (c)] zeigten reversible Photoisomerisierung [Gl. (d)]. In Tabelle 3 sind die für diese Studie verwendeten En-



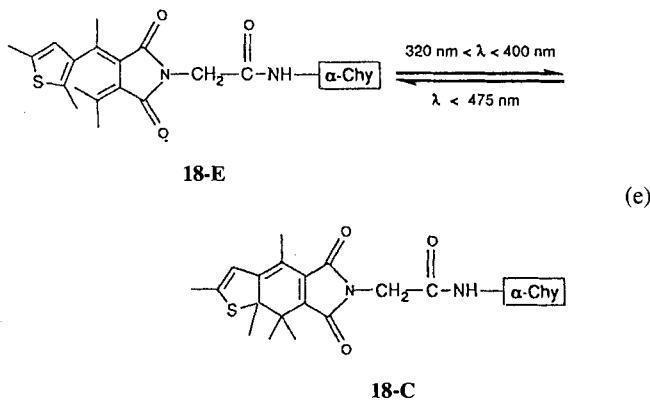
zyme, die Substrate für ihre Untersuchung und die relativen Aktivitäten der jeweiligen isomeren Enzymzustände **17a** und **17b** zusammengefaßt. Ferner sind die K_m -Werte der entsprechenden isomeren Enzymzustände angegeben. Am ausgeprägtesten ist die photoschaltbare Aktivierung/Desaktivierung bei der β -Amylase, bei der die Aktivität im isomeren Zustand **17b** nur

Tabelle 3. Aktivitäten und Affinitätsparameter von photoisomerisierbaren, Spiropyran-modifizierten Enzymen **17**.

| Enzym | Substrat | 17a | | 17b | |
|------------------------|--|------------|------------|------------|------------|
| | | Aktivität | K_m [mM] | Aktivität | K_m [mM] |
| α -Chymotrypsin | <i>N</i> -Benzoyl-L-tyrosinethylester | 1 | 15 | 1.5 | 4.3 |
| β -Glucosidase | <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-glucosid | 1 | 4.0 | 1.15 | 3.3 |
| β -Amylase | Amylose | 1 | 3.4 | 0.13 | 60 |
| α -Amylase | Amylose | 1 | 12 | 0.64 | 15 |

etwa ein Zehntel der Aktivität im Zustand **17a** beträgt. Der wesentlich höhere K_m -Wert der β -Amylase im Zustand **17b** deutet darauf hin, daß die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum in dieser isomeren Konformation gestört ist.

Die Modifizierung von Enzymen mit photoisomerisierbaren Einheiten führt zu unvollständig photoschaltbaren Aktivitäten der Biokatalysatoren in wäßrigem Milieu: Die Enzyme zeigten in den Aus-Zuständen Reste biokatalytischer Eigenschaften. Photoisomerisierbare Enzyme in organischen Lösungsmitteln sollten sich als bessere lichtgesteuerte Biokatalysatoren erweisen^[99], da vermutlich Proteine in organischen Lösungsmitteln gegenüber strukturellen Störungen, die von photoaktiven Gruppen induziert werden, aufgrund des begrenzten Wassergehalts, der zur Stabilisierung ihrer Tertiärstruktur beiträgt, empfindlicher sind^[100-102]. α -Chymotrypsin wurde daher mit Thiophen-fulgid zum reversibel zwischen **18-E** und **18-C** schaltbaren Derivat [Gl. (e)] modifiziert. Die beiden photoisomeren Zustände sind in wäßriger Lösung ähnlich hydrolyseaktiv, wie anhand der Hydrolyse des *N*-Acetyl-*N*-phenylalaninethylesters oder von *N*-Succinyl-L-phenylalanin-*p*-nitroanilid untersucht wurde.



In einem organischen Lösungsmittel (Cyclohexan) zeigt das photoisomerisierbare α -Chymotrypsin dagegen lichtgesteuerte biokatalytische Aktivitäten. Die Veresterung von *N*-Acetyl-L-phenylalanin **19** mit Ethanol verläuft in Gegenwart von **18-E** langsam, die Photoisomerisierung zu **18-C** beschleunigt die Reaktion um etwa das Fünffache [Abb. 9 und Gl. (f)].

Die Steuerung von Enzymaktivitäten mit Licht über kovalent verknüpfte isomerisierbare Gruppen ist mit dem statistischen Einbau der photoisomerisierbaren Einheiten in die Proteine ver-

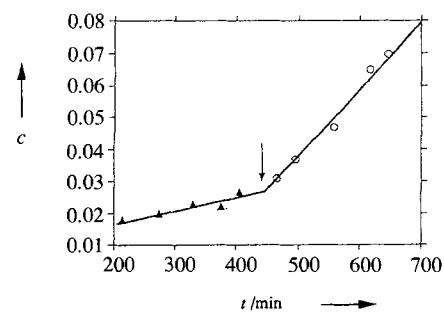
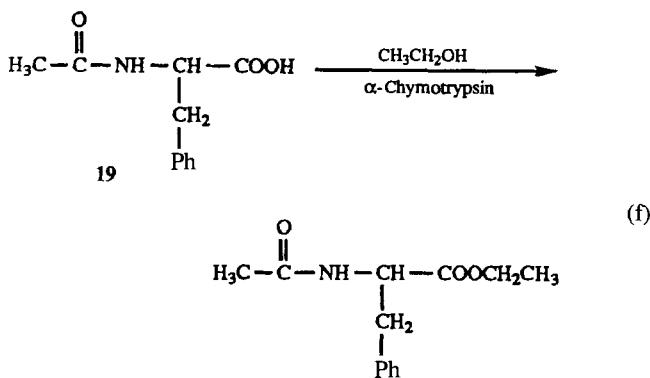
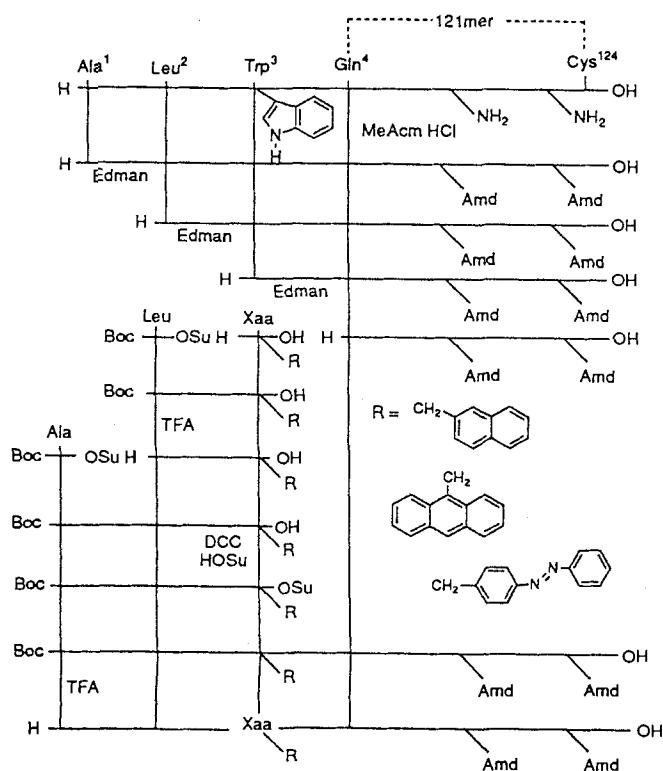


Abb. 9. Photostimulierte Veresterung von **19** mit Ethanol in Cyclohexan unter Verwendung des α -Chymotrypsinderivats **18**. Die biokatalytische Umsetzung wird mit **18-E** initiiert und durch Photoisomerisierung ($320 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$) des Biokatalysators zum Zustand **18-C** eingeschaltet (Zeitpunkt mit Pfeil markiert). c = Produktkonzentration in 10^{-3} M .

bunden, und die besseren schaltbaren Aktivitäten wurden bei hohen Beladungen beobachtet. Man nimmt an, daß dabei die Proteine maximal verzerrt sind, was zu einer Hemmung ihrer katalytischen Aktivität oder der Bindungsfähigkeit ihrer aktiven Zentren führt. Ein wesentlicher Fortschritt wäre jedoch die gezielte Veränderung ausgewählter Aminosäurereste durch photoisomerisierbare Einheiten. Damit wäre die direkte Korrelation der berechneten Tertiärstruktur isomerisierbarer Mutanten, und insbesondere ihrer aktiven Zentren, mit den auftretenden photoschaltbaren Eigenschaften möglich.

Erste Untersuchungen auf der Grundlage dieser Überlegungen wurden kürzlich mit der Semisynthese einer photoisomerisierbaren Mutante von Phospholipase A₂ veröffentlicht^[103]. Dieses Lipolyse-Enzym spaltet 2-Acylbindungen von Phosphoglyceriden, und seine Aktivität ist bei Substraten, die an Aggregatoberflächen wie Micellen oder Vesikel assoziiert sind, erhöht. Man nimmt an, daß der aus Ala1-, Leu2-, Trp3-, Arg6-, Leu15-, Met20-, Leu31- und Try69-Resten zusammengesetzte N-Terminus von Phospholipase A₂ eine α -Helix-Konformation einnimmt, die eine Grenzflächen-Erkennungsstelle bildet^[104, 105]. Diese Stelle erleichtert die Assoziation des Enzyms an Lipid-Wasser-Grenzflächen und erhöht dadurch die Aktivität für die Hydrolyse von Substraten an solchen Phasengrenzflächen^[106]. Die kovalente Anknüpfung einer photoisomerisierbaren Einheit an einen Aminosäurerest, der zur Erkennungsstelle der Phasengrenzfläche gehört, führt zu einer photoanregbaren Enzymaktivität. Mit einem halbsynthetischen Verfahren wurde eine photoisomerisierbare Mutante von Phospholipase A₂ hergestellt (Schema 6)^[103]. Die terminalen Ala1-, Leu2- und Trp3-Aminosäurereste des ϵ -amidierten Enzyms wurden durch drei aufeinanderfolgende Edman-Abbaureaktionen abgespalten. Anschließend wurde das Protein durch stufenweise Synthese des Tripeptids Boc-Ala-Leu-(*trans*-Azobenzol-Phe) ($X_{\text{aa}} =$ *trans*-Azobenzol-Phenylalanin) und dessen nachfolgende Kupplung an das bei der Spaltung erhaltene 121-mer wieder aufgebaut. Bei diesem Verfahren wird der Trp3-Rest spezifisch durch photoisomerisierbares Azobenzol-Phe ersetzt.

Die Aktivitäten der photoisomerisierbaren Mutante von Phospholipase A₂ wurden anhand der Hydrolyse von in Palmitoylphosphatidylcholin-Vesikel eingebauten Lipiden untersucht. (Zum Verfolgen der Lipidhydrolysen wurden radioaktiv markierte Lipide oder in die Vesikel eingebettete fluoreszierende Verbindungen verwendet.) In der *trans*-Konfiguration von Azo-



Schema 6. Halbsynthetisches Verfahren zur Spaltung von Phospholipase A₂ und zum Aufbau von Azobenzol-modifizierter Phospholipase A₂. Acm = Acetimidat, Amd = ϵ -amidiniert, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOSu = N-Hydroxysuccinimid, TFA = Trifluoressigsäure, Xaa = *trans*-Azobenzol-Phenylalanin.

benzol-Phe zeigt die Mutante keinerlei Hydrolyseaktivität. Die Photoisomerisierung zum *cis*-Isomer aktiviert die Mutante für die Lipidhydrolyse. In der *cis*-Form hat die Mutante noch ca. 10%

der Aktivität des natürlichen Enzyms. CD-Spektren der Phospholipase-A₂-Mutante zeigten, daß der α -Helix-Anteil im *cis*-Isomer wesentlich höher ist als im *trans*-Isomer. Die Enzymerkennungsstelle für Phasengrenzflächen hat α -Helix-Konformation und ist das aktive Gegenstück für die biokatalytische Lipidhydrolyse. Dies läßt darauf schließen, daß die Grenzflächen-Erkennungsstelle in der *trans*-Form der Mutante gestört und die Enzymaktivität blockiert ist. Bei der Photoisomerisierung zur *cis*-Mutante wird die Erkennungsstelle wiederhergestellt (wie aus der α -Helix-Struktur laut CD-Spektrum hervorgeht), und das Enzym wird für den Hydrolysevorgang eingeschaltet.

Photoschaltbare Biopolymere zeigen das für eine optoelektronisch aktive Schnittstelle wesentliche Merkmal der optischen Registrierung. Die aufgenommenen optischen Signale werden in „stumme“ oder chemisch aktivierte Funktionen übertragen. Ein schnelles Auslesen der registrierten optischen Information, vorzugsweise durch ein anderes physikalisches Signal, ist erforderlich, um photoschaltbare Biopolymere in der Optoelektronik als aktive Schnittstellen einzusetzen. Kürzlich wurde mit einem photoisomerisierbaren Redoxenzym als optischer Registrierungs- und Übermittlungsmatrix die amperometrische Übertragung von registrierten optischen Signalen demonstriert^[107]. Glucose-Oxidase, GOD, wurde mit photoisomerisierbaren Nitrospiropyran-Einheiten modifiziert. Das veränderte Enzym ist zwischen Nitrospiropyran-GOD (SP-GOD) **20a** und protoniertem Merocyanin-GOD (MRH⁺-GOD) **20b** photoisomerisierbar und zeigt lichtgesteuerte Aktivitäten: **20a** ist etwa doppelt so wirksam wie **20b**. Die photoschaltbaren amperometrischen Aktivitäten des photoisomerisierbaren GOD-Derivats wurden für die Übertragung aufgenommener optischer Signale verwendet. **20a** wurde dazu als Monoschicht auf eine Au-Elektrode aufgebracht (Abb. 10a). Die Elektrode mit der Monoschicht im

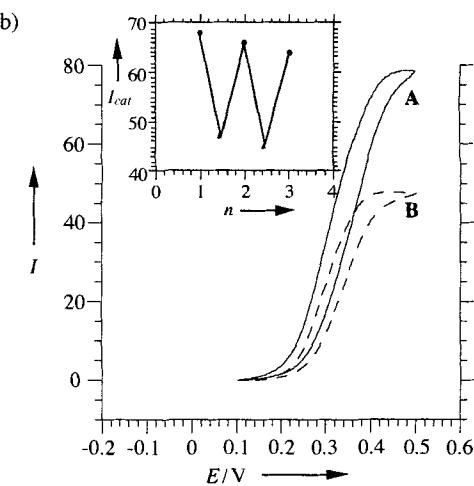
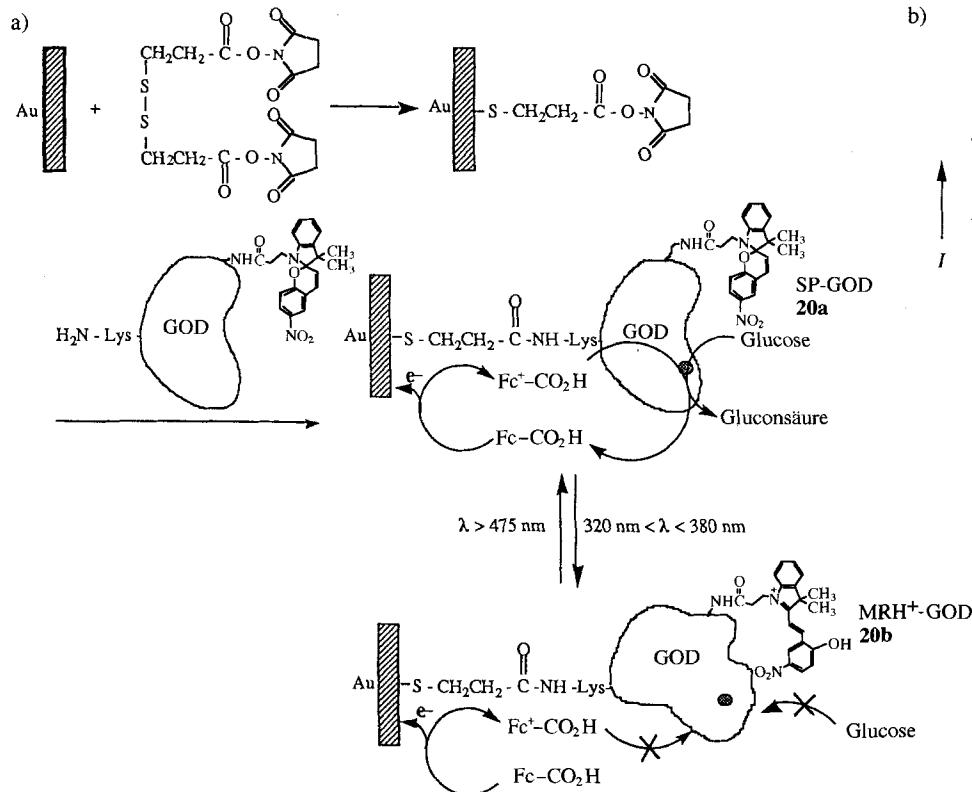


Abbildung 10. a) Aufbau einer photoisomerisierbaren GOD-Monoschicht auf einer Au-Elektrode. b) Photostimulierte bioelektrokatalytische Oxidation von Glucose durch die photoisomerisierbare GOD-Monoschicht-Elektrode mit Ferrocencarbonsäure als Elektronentransfervermittler: A: Elektrode im **20a**-Zustand der Monoschicht, B: Elektrode im **20b**-Zustand. Der Einschub zeigt die cyclische amperometrische Übertragung der mit **20a** bzw. **20b** registrierten Signale. I jeweils in μA , n = Cyclenzahl.

20a-Zustand zeigt elektrobiokatalytische Eigenschaften: In Gegenwart von Ferrocencarbonsäure als Elektronentransfervermittler wird Glucose elektrokatalytisch oxidiert, was einen elektrokatalytischen Anodenstrom (I_{cat}) hervorruft. Durch Photoisomerisierung der Monoschicht zum **20b**-Zustand wird das Enzym deaktiviert und der Wirkungsgrad der bioelektrokatalytischen Oxidation von Glucose nimmt ab. Dies drückt sich in einer niedrigeren amperometrischen Antwort der Enzymelektrode aus. Bei cyclischer Photoisomerisierung der Monoschicht zwischen den beiden Zuständen werden die aufgenommenen optischen Signale amperometrisch übertragen (Abb. 10b).

3. Steuerung der Funktionen von Biopolymeren durch photoisomerisierbare Umgebungen

Der Einfluß photoisomerisierbarer Komponenten auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften membranmimeticischer Systeme wie Micellen, Mikroemulsionen und Liposomen ist gut untersucht^[108–112]. Die photochemische Steuerung der Bildung von flüssigkristallinen Phasen^[113–116] und der Sol-Gel-Übergänge von Polymeren^[117–119] mit geeigneten photoisomerisierbaren Komponenten sind Möglichkeiten, Strukturen und Eigenschaften mikroskopischer und makroskopischer Phasen durch Licht zu regulieren. Durch den Einbau von Biopolymern in solche photomodulierbaren Phasen könnten ihre Funktionen durch Umgebungseffekte ein- und ausgeschaltet werden. In Abbildung 11 ist schematisch dargestellt, wie die katalytische Funktion eines Proteins oder die Bindungseigenschaften eines Biopolymers durch Licht beeinflußt werden. Die Immobilisierung eines Enzyms in einem Liposom, das eine photoisomerisierbare Komponente als Teil der Membrangrenze enthält, könnte die katalytischen Funktionen des Proteins photoaktivierbar machen: Im photoisomeren Zustand B (Abb. 11a) ist das Liposom für das Substrat nicht permeabel, die Enzymaktivität ist ausgeschaltet. Durch Photoisomerisierung zum Zustand A wird das Liposom für das Substrat permeabel,

und die katalytische Funktion des Proteins ist eingeschaltet. Die Membranpermeabilität könnte durch einen Phasenübergang der hydrophoben Grenzfläche oder durch Nutzung des photoisomeren Zustands A als Substraträger moduliert werden. Die Beeinflussung der Bindungsfähigkeit eines Biopolymers durch seine Umgebung ist in Abbildung 11b am Beispiel der lichtstimulierten Bindung eines Antikörpers dargestellt. Die Umgebung im isomeren Zustand A enthält keinerlei Erkennungselement für den Antikörper. Folglich bestehen zwischen dem Antikörper und seiner Umgebung keine bindenden Wechselwirkungen. Die Photoisomerisierung der Umgebung zum Zustand B erzeugt eine antigene Berührungsfläche, und das Binden des Antikörpers ist eingeschaltet. Bei der Rückisomerisierung zum Zustand A wird die Antigenfläche gestört, und der Komplex aus Antikörper und Umgebungsphase dissoziiert. In den folgenden Abschnitten wird die lichtstimulierte Aktivierung/Desaktivierung von Biopolymern durch photoisomerisierbare Umgebungen unter besonderer Berücksichtigung der praktischen Bedeutung solcher Systeme erörtert.

3.1. Lichtgesteuerte Struktur und Permeabilität membranmimetischer Systeme

Monoschichten sind zweidimensionale Anordnungen, die Membransysteme nachbilden. Aus Poly(L-lysin) mit 43 % Beladung durch Azobenzol-Einheiten wurden Monoschichten hergestellt^[82]. Die Einwirkung von UV-Strahlung auf eine auf einen Druck von 7 mN m^{-1} komprimierte *trans*-Azobenzol-Monoschicht resultierte in der Isomerisierung zur *cis*-Azobenzol-Monoschicht und in einem Abfall des Oberflächendrucks der Monoschicht auf $(1.8 \pm 0.2) \text{ mN m}^{-1}$. Bei Wiederherstellung der *trans*-Azobenzol-Monoschicht durch Belichten mit sichtbarem Licht nahm der Oberflächendruck der Monoschicht reversibel zu. Diese Änderungen des Oberflächendrucks wurden auf unterschiedliche Strukturen der Monoschichten zurückgeführt, wobei das *trans*-Isomer eine gestreckte Form mit größerer Oberfläche einnimmt, während das *cis*-Isomer eine α -Helix bildet. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Monoschichten aus Spiropyran-modifiziertem Poly(methylmethacrylat) **21a** gemacht^[120]. Beim Bestrahlen dieser Monoschicht mit UV-Licht, was die Isomerisierung zum Merocyanin-Isomer bewirkt, nahm der Oberflächendruck bei $\text{pH} = 1.5$ um 10^{-3} N m^{-1} und bei $\text{pH} = 5.5$ um $0.3 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-1}$ zu. Die Rückisomerisierung zur Spiropyranmonoschicht geht mit einer Abnahme des Oberflächendrucks auf seinen ursprünglichen Wert einher. Die pH-Abhängigkeit wurde auf die Protonierung des photoisomeren Spiropyranpolymers zurückgeführt. Dieses liegt bei $\text{pH} < 3$ als *o*-Hydroxystyryl-Kation **21c** vor, während sich bei $\text{pH} > 4$ das zwitterionische Merocyanin-Isomer **21b** bildet. Ferner wurde angenommen, daß Änderungen in der Oberflächengröße mit der Position der Chromophore im Monoschichtsystem zu tun haben. Die geladenen Chromophore der Monoschicht aus **21b** und **21c** sind sicherlich nahe der wässrigen Subphase in der an der Luft/Wasser-Grenze gebildeten Monoschicht lokalisiert, während das apolare Spiropyran-Isomer **21a** in die hydrophobe Monoschicht eingebettet ist, ohne signifikant zum Oberflächendruck beizutragen.

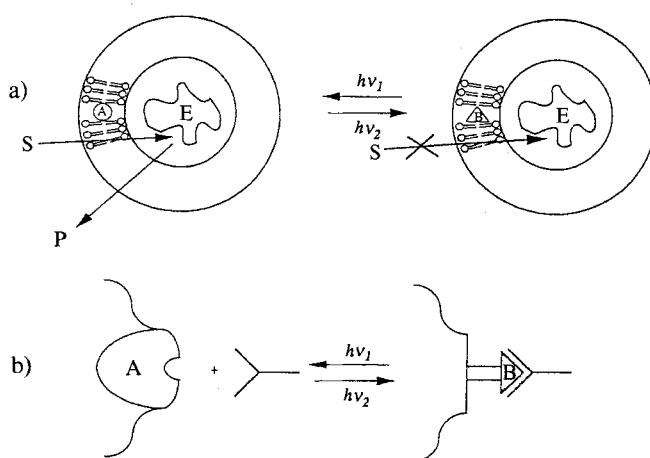
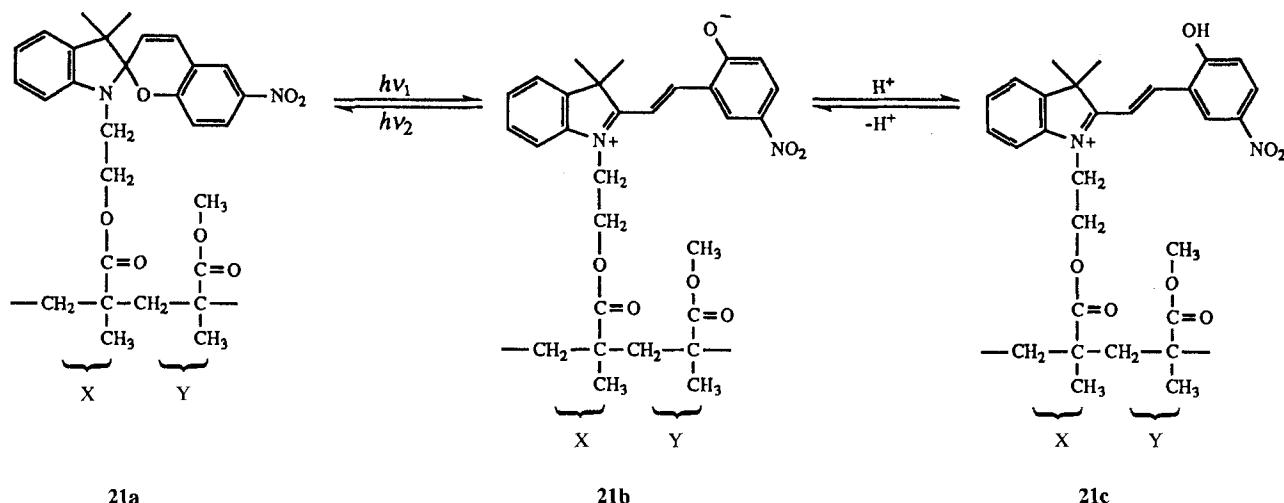


Abb. 11. Grundzüge der Photostimulation von Biopolymerfunktionen durch photoisomerisierbare Umgebungen: a) Ein-Aus-Aktivierung eines Enzyms E über die Steuerung der Substrat(S)-Permeabilität eines photoisomerisierbaren Liposoms. P = Produkt. b) Photoschaltbare Bindung eines Antikörpers an eine photoisomerisierbare antigene Oberfläche.

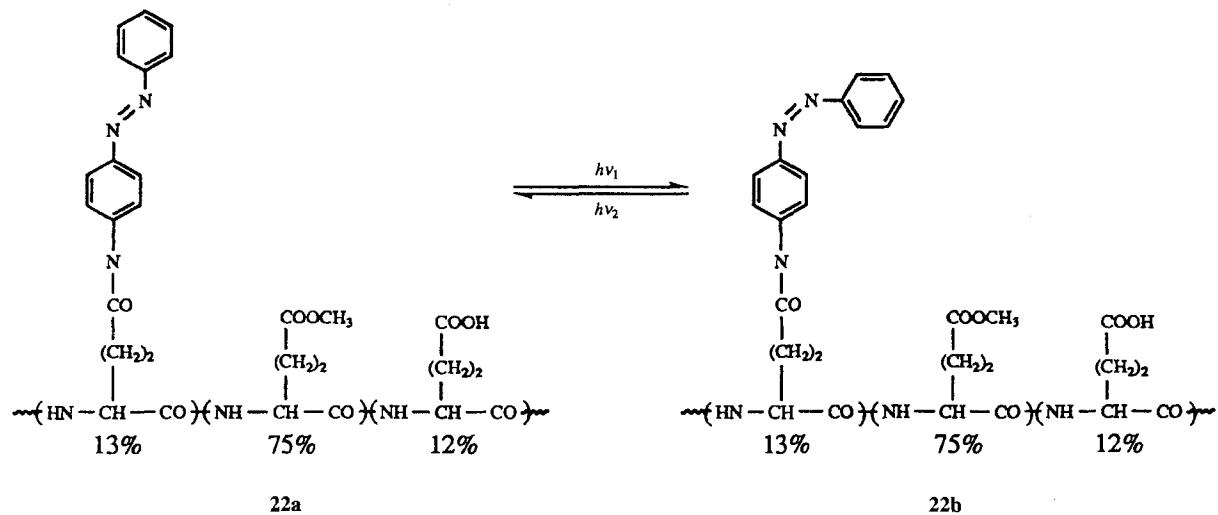


Die Photosteuerung der Adhäsion und der Wirkung von Vesikeln wurde mit einem in die Doppelschichtmembran des Vesikels eingelagerten photoisomerisierbaren Polypeptid nachgewiesen^[124]. Azobenzol-modifizierte Poly(γ -methyl-L-glutamico-L-glutaminsäure) **22a** wurde in die Doppelschicht von Dimethyldistearylammnoniumchlorid-Vesikeln eingebaut. Bei der Photoisomerisierung von **22a** zum *cis*-Isomer **22b** fand ein Verschieben der Polypeptidkette an die hydrophile äußere Subphase des Liposoms statt. Bei Rückisomerisierung des *cis*-Isomers mit sichtbarem Licht orientierte sich die Polypeptidkette nicht an die innere Grenzfläche zurück, sondern behielt ihre veränderte Position. In einem Vesikelsystem, dessen Temperatur oberhalb der des Gel-Flüssigkeit-Phasenübergangs gehalten wurde, fand ein Verschieben des *trans*-Azobenzol-Polypeptids **22a** in den inneren Teil der Doppelschicht statt, und nach dem Abkühlen zeigten die wiederhergestellten Vesikel ähnliche Eigenschaften wie die ursprünglichen. Die Positionen und die Verschiebung der Polypeptidisomere **22a** und **22b** in der Vesikel wurden anhand von Einflüssen der Polarität der Mikroumgebung auf die Emission der an das Copolymer **22** gebundenen fluoreszenzaktiven Gruppe in der *trans*- bzw. *cis*-Konfiguration verfolgt. Die durch Bestrahlung ausgelöste Verschiebung des *cis*-Azobenzol-modifizierten Polypeptids **22b** hat auf die Eigenschaften und

Funktionen der Vesikel wesentliche Auswirkungen. So trat bei Vesikeln, die **22b** an der äußeren Grenze enthalten – vermutlich über intervesikuläre Wechselwirkungen der Polypeptidketten – eine Adhäsion zwischen den Vesikeln auf. Auch wird die Ionenpermeation durch die Vesikelgrenze durch die Position des photoisomerisierbaren Polypeptids beeinflußt: Na^+ kann durch die Vesikelmembran, die das eingebettete *trans*-Polypeptid **22a** enthält, durchtreten; bei der Photoisomerisierung zu **22b** und der Verschiebung der Polypeptidkette an die äußere Begrenzung der Doppelschicht nimmt die Permeabilität der Vesikel um etwa das Fünffache ab. Die Dissoziation der intervesikulären Aggregate und die Wiederherstellung der Ionenpermeabilität der Vesikel gelang durch Rückisomerisierung des Polypeptids zum Zustand **22a** und anschließendes Erwärmen des Vesikelaggregats auf die Temperatur des Gel-Flüssigkeit-Phasenübergangs ($T_c = 40^\circ\text{C}$).

3.2. Lichtsteuerung katalytischer Funktionen von Biopolymeren durch photoaktive Umgebungen

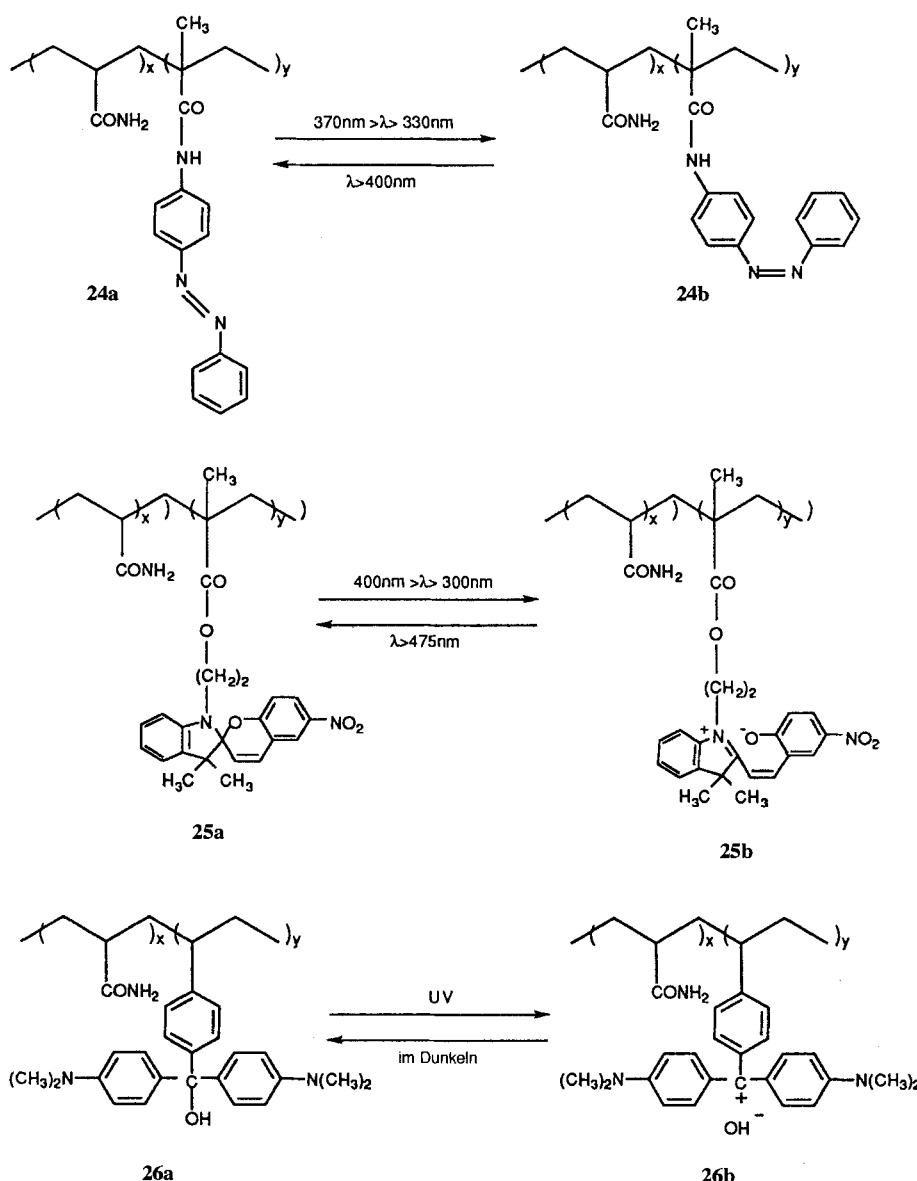
Versuche, Proteinfunktionen durch photoisomerisierbare Umgebungen zu beeinflussen, wurden bereits 1975 von Balasubramanian et al. durchgeführt, die die Wirkung von Modell-



membransystemen mit photoisomerisierbaren Komponenten auf die Aktivität von α -Chymotrypsin untersuchten^[122].

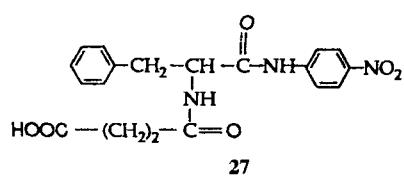
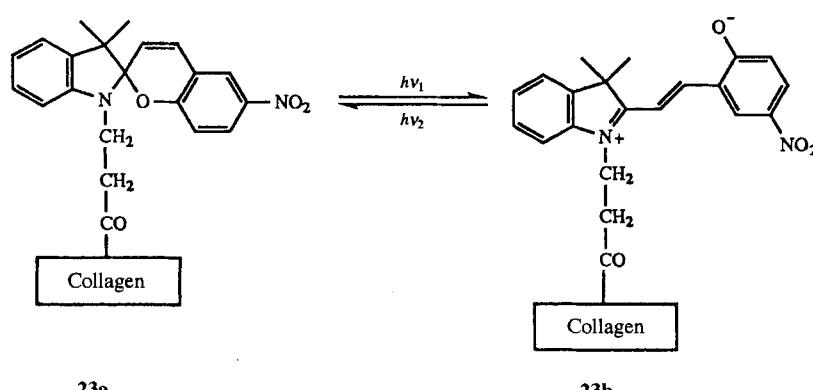
Dabei wurde nachgewiesen, daß die Zugabe von *trans*-4-Carboxyazobenzol **12** zu einer Mikroemulsion mit lamellarer Doppelschichtstruktur, die α -Chymotrypsin enthält, zu einer photochemisch steuerbaren Enzymaktivität führt. In Gegenwart von *cis*-4-Carboxyazobenzol zeigte der Biokatalysator eine achtfach höhere Aktivität. Die Ursache der Photostimulierbarkeit von α -Chymotrypsin ist noch nicht geklärt, man nimmt aber an, daß das photoisomerisierbare Additiv die lamellare Doppelschichtstruktur beeinflußt und daß α -Chymotrypsin mit den lichtgesteuerten Zuständen der Doppelschichtmembran unterschiedlich wechselwirkt. Auch die Immobilisierung von Urease in der Spiropyran-modifizierten Collagenmembran **23** resultierte in lichtgeregelten Enzymaktivitäten^[123–125]. Der Biokatalysator spaltet Harnstoff in der Merocyanin-Collagenmembran **23b** etwa doppelt so schnell wie im Spiropyran-Membranzustand **23a**. Die Harnstoff-Permeabilitäten der Membranzustände **23a** und **23b** sind ähnlich und können daher nicht zur Erklärung der unterschiedlichen Aktivitäten des Biokatalysators herangezogen werden. Man schlug als Erklärung vor, daß die erhöhte Aktivität der Urease im Polymer **23b** auf einer schnelleren Freisetzung des Reaktionsprodukts (NH_4^+) aus dem aktiven Komplex im polaren isomeren Zustand der Collagenmembran beruht.

Die Steuerung des Durchtritts von Substraten mit Hilfe photoisomerisierbarer Polymere ist ein allgemeiner Weg, in Poly-



mere eingeschlossene Enzyme mit Licht zu stimulieren (siehe Abb. 11 a).

Als makromolekulare Matrizen für die Einlagerung von α -Chymotrypsin und seine reversible Photoaktivierung/-desaktivierung dienten die Polymere **24**–**26**^[126–128]. In Abbildung 12 sind Geschwindigkeiten der Hydrolyse von *N*-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-*p*-nitro anilid **27** durch im Azobenzol-Acrylamidcopolymer **24** bzw. im Spiropyran-Acrylamidcopolymer **25** immobilisiertes α -Chymotrypsin wiedergegeben. Bei einer Poly-



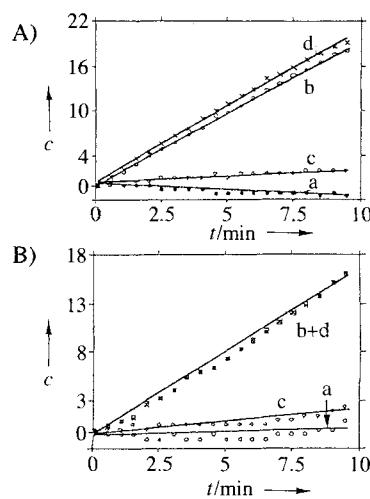


Abb. 12. Reversible Photoaktivierung von α -Chymotrypsin für die Hydrolyse von 27 durch Immobilisierung in photoisomerisierbaren Polymeren: A) Immobilisierung im Polymer 24. Die Kurven a und c geben die Hydrolysegeschwindigkeiten in dem durch Belichtung ($\lambda > 400$ nm) erzeugten Polymer 24a wieder, die Kurven b und d die im Polymer 24b, das durch cyclische Belichtung ($330 \text{ nm} < \lambda < 370 \text{ nm}$) gebildet wird. B) Immobilisierung im Polymer 25. Die Kurven a und c gelten für 25a (Belichtung mit $\lambda > 475$ nm), die Kurven b und d für das durch cyclische Belichtung ($300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$) erzeugte Polymer 25b. $c = \text{Produktkonzentration in } 10^{-6} \text{ M}$.

merbeladung mit 0.5 Mol-% Azobenzol-Einheiten ist die Hydrolyseaktivität des immobilisierten Enzyms im *trans*-Azobenzol-Copolymer 24a vollständig blockiert (Abb. 12 A). Die photochemische Isomerisierung zum *cis*-Azobenzol-Copolymer 24b schaltet die Aktivität des Biokatalysators ein, $V_{\max} = 2 \text{ mM min}^{-1}$, die Rückisomerisierung von 24b zu 24a schaltet sie wieder aus. Durch cyclische Isomerisierung des Polymers zwischen den Zuständen 24a und 24b lässt sich die biokatalytische Umsetzung wiederholt ein- und ausschalten. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Spiropyran-Acrylamidcopolymer 25 erhalten (Abb. 12 B). In dem mit 0.12 Mol-% Spiropyran-Einheiten beladenen Copolymer 25a ist die Enzymaktivität nahezu blockiert. Im Copolymerzustand 25b ist die Aktivität von α -Chymotrypsin um mehr als das Zehnfache erhöht ($v = 1.5 \mu\text{M min}^{-1}$). Die photostimulierte Ein/Aus-Aktivierung/Desaktivierung des Biokatalysators ist bei cyclischer Photoisomerisierung des Copolymers zwischen den Zuständen 25a und 25b vollständig reversibel. Das Copolymer 26 geht keine reversible Photoisomerisierung ein; bei Belichtung von 26a bildet sich der kationische Copolymerzustand 26b. Dieser wandelt sich *thermisch* wieder in die Copolymerform 26a um. In einem mit 0.2 Mol-% photoisomerisierbarer Gruppen beladenen Copolymer 26a immobilisiertes α -Chymotrypsin ist vollständig Hydrolyse-inaktiv, während es bei Photoisomerisierung ($330 \text{ nm} < \lambda < 370 \text{ nm}$) des Copolymers zum Zustand 26b deutliche Hydrolyseaktivität ($v = 1 \mu\text{M min}^{-1}$) aufweist. Komplementä-

re Flußdialyseversuche, bei denen die Permeabilität der jeweils isomeren Zustände von 24, 25 und 26 für 27 untersucht wurde, zeigten, daß die photostimulierte Aktivität von α -Chymotrypsin mit der Permeabilität der Polymermembran korreliert: Die Polymerzustände 24a, 25a und 26a sind für das Enzymsubstrat kaum durchlässig, Zustände 24b, 25b und 26b dagegen sehr wohl. Man nimmt an, daß das hohe Dipolmoment der *cis*-Azobenzol-Einheiten im Copolymer 24b von 3.0 D (verglichen mit $\mu = 0$ für *trans*-Azobenzol-Einheiten) und die mit den Copolymerzuständen 25b und 26b verbundenen elektrischen Ladungen durch elektrische Abstoßung zu porösen Membransystemen führen. Solche Poren erleichtern die Permeation des Substrats 27 und ermöglichen seinen Transport ans aktive Zentrum.

3.3. Photoschaltbares Binden an Biopolymere in photoisomerisierbaren Umgebungen

An Oberflächen gebundene photoisomerisierbare Monoschichten sind organisierte zweidimensionale membranmimetische Mikroumgebungen, in denen Wechselwirkungen von Biopolymeren mit der Monoschicht und der Oberfläche des Trägers mit Hilfe von Licht reguliert werden können. Durch Lichtschaltbare Wechselwirkungen von Antikörpern mit photoisomerisierbaren selbstorganisierten Antigenmonoschichten bildeten die Grundlage für die Entwicklung reversibler amperometrischer Immunsensoren^[129]. Abbildung 13 zeigt den Aufbau einer Dinitrospiropyranmonoschicht-Elektrode durch Selbstorganisation. Diese Monoschicht lässt sich zwischen den Zuständen 28a und 28b reversibel photoisomerisieren. Es ist bereits bekannt, daß das Dinitrospiropyran 28a in homogener Phase eine hohe Affinität zum anti-DNP-Antikörper zeigt, während das Merocyanin-Isomer 28b nur eine geringe Affinität zu diesem Antikörper hat. Die schaltbaren bindenden Wechselwirkungen der Isomere 28a und 28b bilden die Grundlage für eine amperometrische Immunsensorelektrode und insbesondere für einen reversiblen amperometrischen Immunsensor. In einer

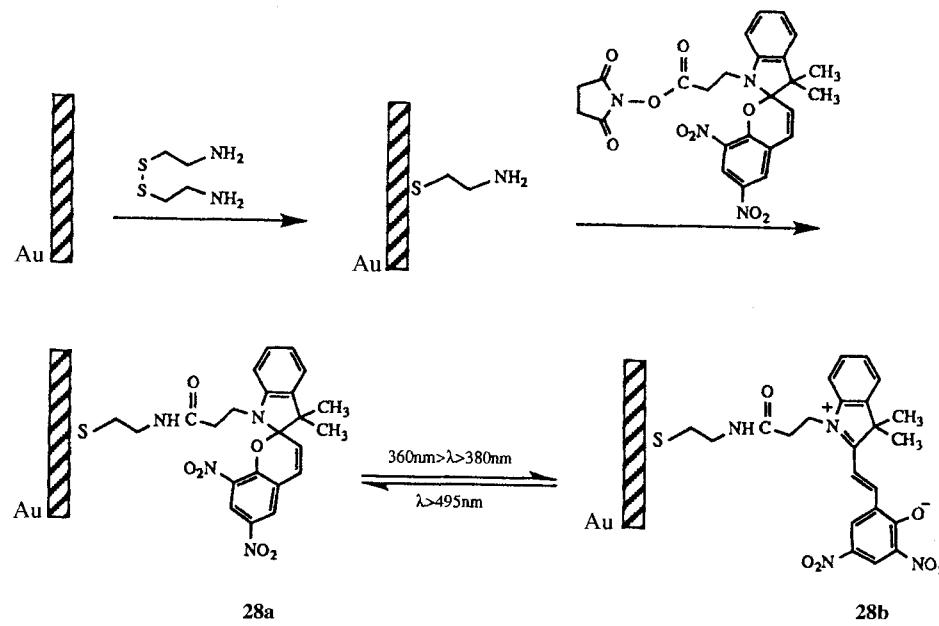


Abb. 13. Aufbau einer photoisomerisierbaren Dinitrospiropyranmonoschicht auf einer Au-Elektrode.

elektrochemischen Zelle, die ein Redoxpaar R^+/R (beispielsweise $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) enthält, führt die Spiropyranmonoschicht-Elektrode **28a** zu einer elektrochemischen Antwort. Die Behandlung der Elektrode mit dem Antikörper resultiert in der Bindung des Antikörpers an die Antigenmonoschicht und der Isolierung der Elektrode gegen das Redoxpaar (Abb. 14).

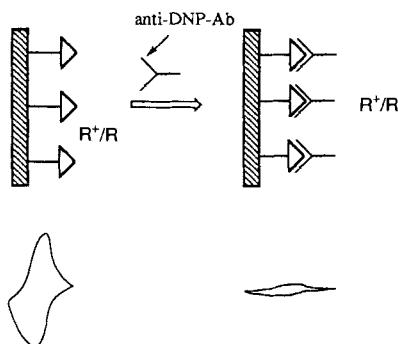


Abb. 14. Verwendung einer Antigenmonoschicht-Elektrode für die amperometrische Analyse (unten schematisch gezeigt) eines Antikörpers (anti-DNP-Ab).

Die mit der Monoschicht-Elektrode in Wechselwirkung tretende Menge an Antikörper und das Ausmaß der Elektrodenisolierung hängen von der Antikörperkonzentration in Lösung ab. Durch Kalibrieren der amperometrischen Elektrodenanzeige als Funktion der Antikörperkonzentration gelang die quantitative amperometrische Analyse des Antikörpers. Im Gegensatz zu Antigen-Elektroden, die nur für Einzelcyclen geeignet sind,

bietet die photoisomerisierbare Antigenmonoschicht **28a** die Möglichkeit, die aktive Antigen-Elektrode zu regenerieren: Die Photoisomerisierung der Antigenmonoschicht zum Zustand **28b** führt zu einer Phasengrenzfläche mit geringer Affinität zum Antikörper, der daher abgewaschen werden konnte. Die antikörperfreie Monoschicht-Elektrode wurde anschließend in den Zustand **28a** rückisomerisiert und war so für einen zweiten immunamperometrischen Aufnahmecyclus reaktiviert (Abb. 15 oben). Abbildung 15 unten zeigt die reversible Arbeitsweise der Dinitrospiropyran/Merocyaninmonoschicht-Elektrode beim amperometrischen Nachweis des anti-DNP-Antikörpers. Zuerst wird im Elektrodenzustand **28b** der Antikörper zugesetzt. Wegen der geringen Wechselwirkung mit der Monoschicht wird die Elektrode nicht isoliert und liefert ein hohes amperometrisches Signal. Die Photoisomerisierung zum Zustand **28a** ergibt die aktive Antigenoberfläche, die den Antikörper bindet. Dadurch wird die Elektrode isoliert, so daß ihr amperometrisches Signal abnimmt. Die anschließende Photoisomerisierung der Monoschicht in den Zustand **28b** setzt den Antikörper frei und erhöht das elektrochemische Elektrodensignal.

Die Potentialänderungen einer mit einer photoisomerisierbaren Polymermatrix modifizierten Elektrode wurden zur Untersuchung von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen herangezogen. Als polymere Deckmembran für eine Glaskohlenstoff-Elektrode wurde Carboxy-substituiertes Polyvinylchlorid verwendet. In dieses Polymer wurden 2,4-Dinitrophenyldecyllamin und das Spiro(2H-1-benzopyran-2,2'-indolin) **29a**^[130] eingelagert. Durch **29a** wurde das Polymer zu einem photoisomerisierbaren Membransystem. Das Elektrodenpotential ist abhängig

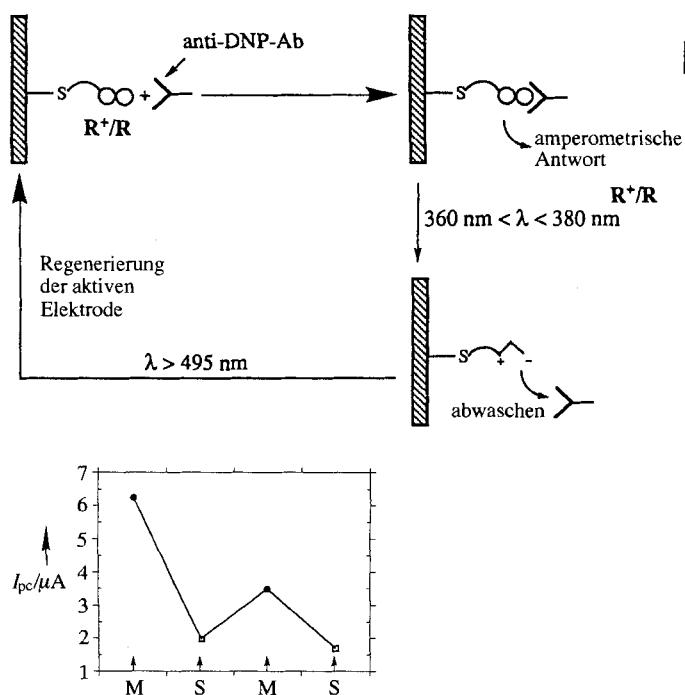
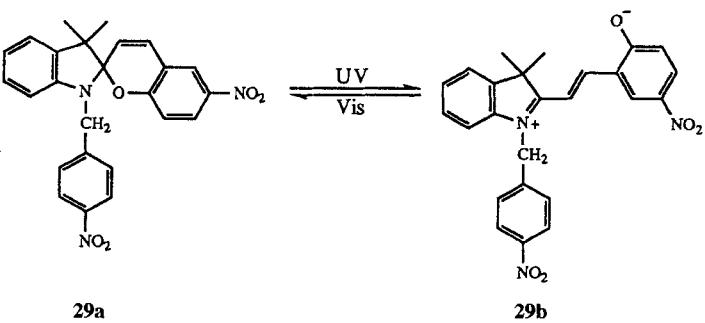


Abb. 15. Oben: Verwendung einer Dinitrospiropyran-modifizierten Monoschicht-Elektrode für die reversible amperometrische Analyse des anti-DNP-Antikörpers. Unten: Reversible amperometrische Antworten der **28**-Monoschicht-Elektrode in Gegenwart von $1.5 \mu\text{M}$ des anti-DNP-Antikörpers. □ Elektrode in dem durch Beleuchtung mit $\lambda > 495 \text{ nm}$ erzeugten Zustand **28a** (S). ● Elektrode im durch Bestrahlung mit $360 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ erhaltenen Zustand **28b** (M). Die Elektroden wurden vor jeder Messung gewaschen.



vom photoisomeren Zustand: Bei der lichtinduzierten Isomerisierung des Zustands **29a** zum Merocyanin-Isomer **29b** nimmt das Elektrodenpotential um ca. 120 mV zu. Abbildung 16 A zeigt die reversiblen lichtinduzierten Potentialänderungen der Elektrode bei der cyclischen Photoisomerisierung von **29a** zu **29b** und zurück. Das Einbringen des anti-Dinitrophenyl-BSA-Antikörpers in das aus der Elektrode mit der Polymermembran im Zustand **29b** (hohes Elektrodenpotential) bestehende System führt zu einem Abfall des Elektrodenpotentials (Abb. 16 B): Bei einer Antikörperkonzentration von $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ fällt das Elektrodenpotential um ca. 100 mV. Da die Abnahme des Elektrodenpotentials von der Antikörperkonzentration abhängt, ist sie ein quantitatives Maß für die Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Die Abnahme des Elektrodenpotentials bei der Assoziation des Antikörpers an die Antigenmembran der Elektrode wurde auf eine Störung des Elektrolytgradienten an

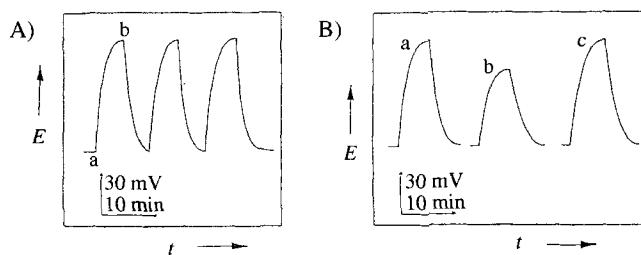


Abb. 16. A) Photostimulierte Potentialänderungen einer Polyvinylchlorid-modifizierten Elektrode, die 29 enthält. Der Potentialwert a entspricht der Elektrode im Zustand **29 a**, der Potentialwert b entspricht ihr im Zustand **29 b**. B) Photostimulierte Potentiale einer Polyvinylchlorid-modifizierten Elektrode, die 29 enthält, mit und ohne Zusatz des anti-DNP-Antikörpers. a: Elektrodenpotential im Zustand **29 b** ohne den Antikörper. b: Elektrodenpotential im Zustand **29 b** in Gegenwart des Antikörpers. c: Elektrodenpotential nach Isomerisierung der **29 b**-Elektrode mit gebundenem Antikörper zum Zustand **29 a**, Abwaschen des Antikörpers und Rückisomerisierung der Elektrode aus dem Zustand **29 a** in den Zustand **29 b**.

der Grenze zwischen Polymer und Lösung als Folge der Antikörperadsorption zurückgeführt. Die Elektrode konnte nach dem Abwaschen des absorbierenden Antikörpers in einer reinen Elektrolytlösung wiederverwendet werden.

Die lichtgesteuerte Assoziation von Cytochrom c, Cyt. c, an eine mit einer Elektrode verbundene photoisomerisierbare Monoschichtmembran ist für das Verständnis des Sehprozesses von besonderer Bedeutung^[131]. Auf der Oberfläche einer Au-Elektrode wurde eine gemischte Monoschicht aus Pyridin-Einheiten und photoisomerisierbaren Nitrospiropyran-Komponenten aufgebaut (Abb. 17). Die Pyridinreste wirken als aktivierende Stelle, über die Cytochrom c an die Monoschichtgrenze assoziiert. Diese Assoziation erleichtert die elektrische Kommunikation zwischen dem Häm-Redoxzentrum von Cytochrom c und der Elektrode. Durch Photoisomerisierung entsteht die gemischte protonierte Nitromerocyaninmonoschicht. Die elektrostatische Abstoßung des positiv geladenen Cytochroms c von der Monoschicht blockiert nun die elektrische Kommunikation zwischen

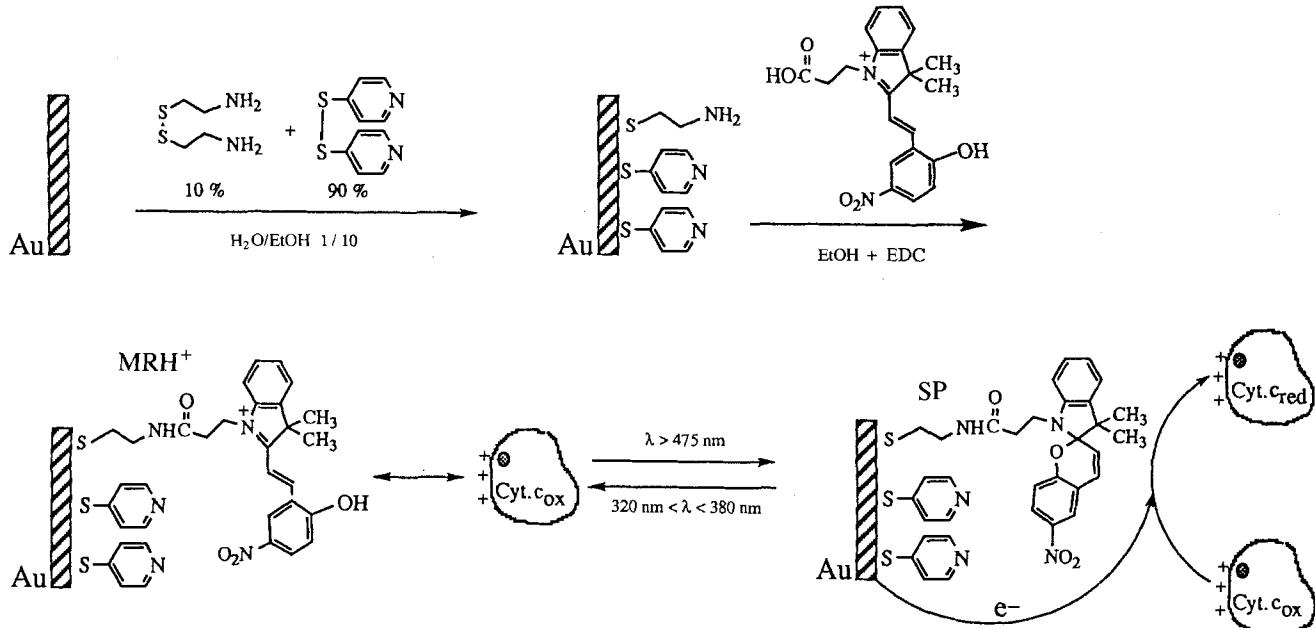


Abb. 17. Aufbau einer gemischten Nitrospiropyran/Nitromerocyanin-Pyridin-Monoschicht auf einer Au-Elektrode.

Cytochrom c und der Elektrodenoberfläche. Die cyclische Registrierung optischer Signale durch die Monoschicht führt zu photostimulierten Ein/Aus-Mitteilungen zwischen Cytochrom c und der Elektrode und wird in Form amperometrischer Signale weitergeleitet (Abb. 18). Bei der Kopplung der

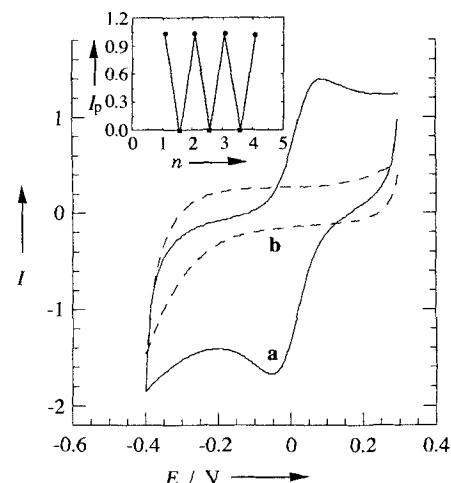


Abb. 18. Photostimulierte elektrische Kommunikation von Cytochrom c mit einer photoisomerisierbaren gemischten Pyridinmonoschicht-Elektrode a) im SP-Zustand, b) im MRH⁺-Zustand (siehe Abb. 17). Der Einschub zeigt die reversible amperometrische Umwandlung der mit der Monoschicht registrierten optischen Signale. I jeweils in μA , n = Cyclenzahl.

durch Licht stimulierten elektrischen Kommunikation von Cytochrom c mit einer enzymatischen Reaktion tritt eine Verstärkung des übermittelten amperometrischen Signals auf. Im Nitrospiropyranzustand der Pyridinmonoschicht-Elektrode ist die elektrische Kommunikation zwischen Cytochrom c und der Elektrode aufrechterhalten. Das reduzierte Cytochrom c wurde mit der Reduktion von Cytochrome-c-Oxidase (COX) gekop-

pelt, das wiederum die Reduktion von molekularem Sauerstoff biokatalysiert. Die enzymatische Umsetzung regeneriert die elektrische Wechselwirkung von Cytochrom c mit der Elektrode, und das optische Signal, das den Elektronentransfer auslöst, wird verstärkt. Die enzymatische Reaktionskaskade wird durch die Photoisomerisierung der Monoschicht und die Steuerung der primären elektrischen Wechselwirkungen von Cytochrom c mit der Elektrode reversibel aktiviert und blockiert (Abb. 19).

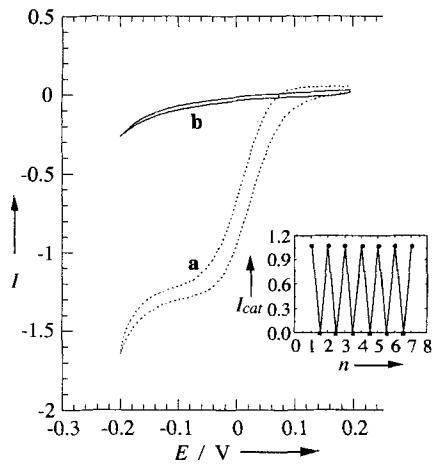


Abb. 19. Photostimulierte verstärkte amperometrische Umwandlung von optischen Signalen, die mit der in Abbildung 17 beschriebenen photoisomerisierbaren gemischten Pyridinmonoschicht-Elektrode aufgenommen wurden, unter Verwendung von Cyt. c/COX als enzymatischer Kaskade. a) Elektrode im SP-Zustand, b) Elektrode im MRH^+ -Zustand. Der Einschub zeigt die reversible amperometrische Umwandlung der mit der Monoschicht registrierten optischen Signale. I jeweils in μA , n = Cyclenzahl.

Dieses System ähnelt in mancher Hinsicht dem Sehprozeß^[132]. Bei diesem wird das Protein durch Isomerisierung von protein gebundenem 11-cis-Retinal in eine Konformation überführt, die das G-Protein bindet. Das assozierte G-Protein löst eine enzymatische Kaskade aus, die schließlich c-GMP liefert, das die Nervenleitung aktiviert. Die in dem hier vorgestellten Beispiel an die Elektrode gebundene gemischte Monoschicht steuert die Bindung von Cytochrom c an die photoisomerisierbare Membran. Diese Bindung resultiert in einer elektrischen Kommunikation mit der Elektrode und löst eine enzymatische Kaskade aus, bei der Sauerstoff reduziert wird. Das optische Signal wird durch die enzymatische Kaskade verstärkt und in ein elektrochemisches amperometrisches Ausgangssignal umgewandelt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben hier einen Überblick über wissenschaftliche Fortschritte bei der Entwicklung reversibler photobiologischer Schalter gegeben. Zwei Arten von Verfahren, mit denen bioaktive Stoffe in lichtgesteuerte Systeme überführt werden, wurden besprochen. Eine Methode besteht in der chemischen Modifizierung der Biopolymere durch synthetische photoisomerisierbare Komponenten. Bei diesem Verfahren stimulieren die beiden photoisomeren Zustände des Photorezeptors die Ein/Aus-Aktivitäten des Biopolymers, d. h. in dem einen photoisomeren Zustand behält dieses seine bioaktive Struktur und ist für seine

biologische Funktion eingeschaltet, während im komplementären photoisomeren Zustand die Struktur verzerrt und die Bioaktivität daher ausgeschaltet ist. Bei der zweiten Methode werden die Biopolymere in eine photoisomerisierbare Umgebung eingebunden. Die Beeinflussbarkeit physikalischer Eigenschaften der photoisomerisierbaren Matrix wie Substratpermeabilität, Phasenviskosität oder lokales elektrisches Potential durch Licht führt zur lichtinduzierten Aktivierung/Desaktivierung des immobilisierten Biopolymers. Die Entwicklung solcher künstlicher photobiologischer Schalter ist der wissenschaftliche Versuch, in der Natur arbeitende photoschaltbare biologische Systeme wie den Sehvorgang nachzuahmen. Photobiologische Schalter können daher gewissermaßen als Ansatz des Chemikers betrachtet werden, bioaktive Verbindungen in „intelligente“ neue Materialien umzuwandeln, deren Funktion auf äußere Lichtsignale anspricht.

Mögliche Anwendungen photoschaltbarer Biopolymere in der Maßanfertigung von zielgerichteten, durch Licht aktivierbaren bioaktiven Therapeutika, der Entwicklung reversibler Biosensoren und dem Aufbau von Lichtverstärkerelementen wurden diskutiert. Künftige Ziele umfassen jedoch auch die Aufgabe, photoschaltbare Biopolymere als bioelektronische Bauteile einzusetzen. Das Auslesen der optischen Registrierung über eine biochemische Umwandlung ist praktisch nicht erwünscht. Dagegen weisen Fortschritte bei der elektrischen Kommunikation von Redoxproteinen mit Elektroden^[133–136] und die neue Technik, aus Biopolymeren selbstorganisierende Monoschichten auf Elektrodenoberflächen zu bilden^[136–138], darauf hin, daß die optische Registrierung durch photoschaltbare Biopolymere und das elektrochemische Auslesen der Information ein attraktiver, weiter zu verfolgender Weg ist. Tatsächlich bewiesen die kürzlich beschriebenen amperometrischen Übermittlungen registrierter optischer Signale durch photoisomerisierbare Redoxproteine^[107] und durch eine an Redoxproteine gekoppelte photoisomerisierbare Monoschicht^[131] die Brauchbarkeit dieses Verfahrens. Es ist zu erwarten, daß photoschaltbare Biopolymere in Zukunft intensiv zur Speicherung, Registrierung und Übertragung von Informationen genutzt werden. Photoschaltbare Biopolymere bieten in den Grenzgebieten von Chemie, Biologie, Physik, Medizin und Materialwissenschaften zweifellos interessante Perspektiven.

Das Forschungsprojekt über photobiologische Schalter wurde vom israelischen Ministerium für Wissenschaft und Technik und von der Kommission der Europäischen Union gefördert.

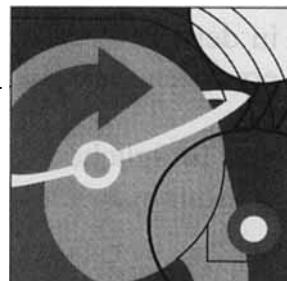
Eingegangen am 5. Dezember 1994,
veränderte Fassung am 6. Juli 1995 [A 96]
Übersetzt von Dr. Kathrin-Maria Roy, Langenfeld

- [1] G. Feher, J. P. Allen, M. Okamura, D. C. Rees, *Nature* **1989**, 339, 111.
- [2] S. Kartha, R. Das, J. R. Norris in *Metal Ions in Biological Systems* (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, **1991**, S. 323.
- [3] L. Stryer, *Am. Rev. Neurosci.* **1986**, 9, 87.
- [4] F. Siebert in [51], S. 756.
- [5] W. Haupt, *Philos. Trans. R. Soc. London B* **1983**, 303, 467.
- [6] H. Senger, W. Schmidt in *Photomorphogenesis in Plants* (Hrsg.: R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg), Nijhoff, Dordrecht, **1986**, S. 137.
- [7] H. Smith, *Phytochrome and Photomorphogenesis*, McGraw-Hill, London, **1975**, S. 22.
- [8] R. R. Birge, *Biochem. Biophys. Acta* **1991**, 1016, 293.
- [9] T. Merinetti, *Biophys. J.* **1987**, 52, 115.
- [10] W. Stoeckenius, R. A. Bogomolni, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 52, 587.
- [11] T. Kouryama, K. Kinoshita, A. Ikegami, *Adv. Biophys.* **1988**, 24, 123.

- [12] C. Bräuchle, N. Hampp, D. Oesterhelt, *Adv. Mater.* **1991**, *3*, 420.
- [13] N. Hampp, C. Bräuchle, D. Oesterhelt, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 83.
- [14] *Optical Processing and Computing* (Hrsg.: H. H. Arsenault, T. Szoplik, B. Macukow) Academic Press, New York, **1989**.
- [15] N. Hampp, C. Bräuchle in [51], S. 954.
- [16] R. Thoma, N. Hampp, C. Bräuchle, D. Oesterhelt, *Opt. Lett.* **1991**, *16*, 651.
- [17] A. Yariv, S. K. Kwong, *Opt. Lett.* **1986**, *11*, 186.
- [18] F. L. Carter, A. Schultz, D. Duckworth in *Molecular Electronic Devices II* (Hrsg.: F. L. Carter), Dekker, New York, **1987**, S. 183.
- [19] V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1990**, *1*.
- [20] R. W. Binkley, T. W. Flechtnar in *Synthetic Organic Photochemistry* (Hrsg.: W. M. Horspool), Plenum, New York, **1984**, S. 375.
- [21] A. D. Turner, S. V. Pizzo, G. Rozakis, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 244.
- [22] N. A. Porter, J. D. Bruhnke, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 37.
- [23] P. M. Koenigs, B. C. Faust, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9371.
- [24] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7957.
- [25] G. C. R. Ellis-Davies, J. H. Kaplan, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1966.
- [26] R. Warmuth, E. Grell, J.-M. Lehn, J. W. Bats, G. Quinkert, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 671.
- [27] J. Nargeot, J. M. Nerbonne, J. Engels, H. A. Lester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2395.
- [28] J. M. Nerbonne, S. Richard, J. Nargeot, H. A. Lester, *Nature* **1984**, *310*, 74.
- [29] J. H. Kaplan, R. J. Hollis, *Nature* **1980**, *288*, 587.
- [30] J. W. Walker, A. V. Somlyo, Y. E. Goldman, A. P. Somlyo, D. R. Trentham, *Nature* **1987**, *327*, 249.
- [31] A. M. Gurney, H. A. Lester, *Physiol. Rev.* **1987**, *67*, 583.
- [32] H. A. Lester, J. M. Nerbonne, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1982**, *11*, 151.
- [33] "Biological Applications of Photochemical Switches": I. Willner, B. Willner in *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: H. Morrison), Wiley, **1993**, S. 1.
- [34] H. R. Allcock, C. Kim, *Macromolecules* **1991**, *24*, 2846.
- [35] V. A. Krongauz, E. S. Goldburg, *Macromolecules* **1981**, *14*, 1382.
- [36] J. Verborgt, G. Smets, *J. Polym. Sci.* **1974**, *12*, 2511.
- [37] S. Kato, M. Aizawa, S. Suzuki, *J. Membr. Sci.* **1976**, *1*, 289.
- [38] J. Anzai, K. Sakamura, T. Osa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 888.
- [39] K. Ishihara, A. Okazaki, N. Negishi, I. Shinohara, T. Okano, K. Kataoka, Y. Sakurai, *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, *27*, 239.
- [40] A. Mamada, T. Tanaka, D. Kungwatchakum, M. Irie, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1517.
- [41] M. Irie, K. Hayashi, *J. Macromol. Sci. Chem.* **1979**, *A13*, 511.
- [42] S. M. Fatahur Rahman, K. Fukurishi, M. Kuwabara, H. Yamanaka, M. Momura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 1461.
- [43] J. Bieth, S. M. Vratsanos, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *64*, 1103.
- [44] J. Bieth, N. H. Wassermann, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 850.
- [45] K. T. Galley, M. DeSorgo, W. Prins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *50*, 300.
- [46] M. A. Wainberg, B. F. Erlanger, *Biochemistry* **1971**, *10*, 3816.
- [47] E. Bartels, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1820.
- [48] P. R. Westmark, J. P. Kelly, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3416.
- [49] B. F. Erlanger, *Annu. Rev. Biochem.* **1976**, *45*, 267.
- [50] *Photochromism* (Hrsg.: G. H. Brown), Wiley, New York, **1971**.
- [51] *Photochromism: Molecules and Systems* (Hrsg.: H. Dürr, H. Bouas-Laurent), Elsevier, Amsterdam, **1990**.
- [52] *Organic Photochromism* (Hrsg.: A. V. Elstov), Plenum, New York, **1990**.
- [53] *Applied Photochromic Polymer Systems* (Hrsg.: C. B. McArdle), Chapman & Hall, New York, **1992**.
- [54] J. Saltiel, Y. P. Sun in Lit. [51], S. 64.
- [55] D. L. Ross, J. Blanc in Lit. [50], S. 471.
- [56] J. Whittall in Lit. [51], S. 467.
- [57] R. Guglielmetti in Lit. [51], S. 314.
- [58] C. Schulz, H. Dürr in Lit. [51], S. 193.
- [59] H. Bouas-Laurent, J.-P. Desvergne in Lit. [51], S. 561.
- [60] E. Hadjoudis in Lit. [51], S. 685.
- [61] M. Ottolenghi, D. S. McClure, *J. Chem. Phys.* **1967**, *46*, 4613.
- [62] K. Schaumburg, J.-M. Lehn, C. Gouille, S. Roth, H. Byrne, S. Hagen, J. Poplawsky, K. Brufeldt, K. Beechgard, T. Bjornholm, P. Fredericksen, M. Jörgensen, K. Lerstrup, P. Sommer-Larsen, O. Goscinsky, J.-L. Calais, L. Erikson in *Nanostructure Based Molecular Materials* (Hrsg.: W. Gopel, C. Ziegler), VCH, Weinheim, **1992**, S. 153.
- [63] D. A. Parthenopoulos, P. M. Rentzepis, *Science* **1989**, *245*, 843.
- [64] Z. F. Liu, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Nature* **1990**, *347*, 658.
- [65] K. Martinek, I. V. Berezin, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 637.
- [66] H. Flohé, R. Giertz, R. Beckmann, *Handbook of Information*, Vol. 5, Elsevier, Amsterdam, **1985**.
- [67] K. Lechner, *Blutgerinnungsstörungen*, Springer, Berlin, **1982**.
- [68] *Biosensors: Fundamentals and Applications* (Hrsg.: A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson), Oxford University Press, **1989**.
- [69] F. Scheller, F. Schubert, *Tech. Instrum. Anal. Chem.* **1992**, *11*.
- [70] *Biosensors and Chemical Sensors* (Hrsg.: P. G. Edelman, J. Wang) American Chemical Society, Washington, D. C., **1991**; K. Cammann, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, B. Winter, *Angew. Chem. 1991*, *103*, 519; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 516.
- [71] M. Irie in *Applied Photochromic Polymer Systems* (Hrsg.: C. B. McArdle), Chapman & Hall, New York, **1992**, S. 174.
- [72] M. Irie, *Adv. Polym. Sci.* **1990**, *94*, 27.
- [73] G. Smets, *Adv. Polym. Sci.* **1983**, *50*, 17.
- [74] M. Irie, Y. Hirano, S. Hashimoto, K. Hayashi, *Macromolecules* **1981**, *14*, 262.
- [75] M. Irie, M. Hosoda, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1985**, *6*, 533.
- [76] L. Stryer, *Biochemistry*, Freeman, New York, **1988**, S. 25.
- [77] O. Pieroni, A. Fissi, *J. Photochem. Biol. B* **1992**, *12*, 125.
- [78] F. Ciardelli, D. Fabbri, O. Pieroni, A. Fissi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3470.
- [79] O. Pieroni, A. Fissi, A. Viegi, D. Fabbri, F. Ciardelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2734.
- [80] O. Pieroni, J. L. Houben, A. Fissi, P. Costantino, F. Ciardelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5913.
- [81] J. L. Houben, A. Fissi, D. Baccida, N. Rosato, O. Pieroni, F. Ciardelli, *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5*, 94.
- [82] B. R. Malcolm, O. Pieroni, *Biopolymers* **1990**, *29*, 1121.
- [83] F. Ciardelli, O. Pieroni, A. Fissi, J. L. Houben, *Biopolymers* **1984**, *23*, 1423.
- [84] O. Pieroni, D. Fabbri, A. Fissi, F. Ciardelli, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1988**, *9*, 637.
- [85] A. Fissi, O. Pieroni, F. Ciardelli, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1993.
- [86] I. Willner, S. Rubin, J. Wönnner, F. Effenberger, P. Bäuerle, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3150.
- [87] S. Rubin, I. Willner, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, *246*, 201.
- [88] I. Willner, S. Rubin, *React. Polym.* **1993**, *21*, 177.
- [89] E. Zahavy, S. Rubin, I. Willner, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, *246*, 195.
- [90] I. Willner, S. Rubin, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4937.
- [91] E. Zahavy, S. Rubin, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1753.
- [92] M. Harada, M. Sisido, J. Hirose, M. Nakanishi, *FEBS Lett.* **1991**, *286*, 6.
- [93] T. Hohsaka, K. Kawashima, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 413.
- [94] G. Montagnoli, S. Monti, L. Nannicini, R. Felcioli, *Photochem. Photobiol.* **1976**, *23*, 29.
- [95] S. Monti, G. Montagnoli, L. Nannicini, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3808.
- [96] I. Willner, S. Rubin, A. Riklin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3321.
- [97] M. Aizawa, K. Namba, S. Suzuki, *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, *182*, 305.
- [98] K. Namba, S. Suzuki, *Chem. Lett.* **1975**, 947.
- [99] I. Willner, M. Lion-Dagan, S. Rubin, J. Wönnner, F. Effenberger, P. Bäuerle, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 491.
- [100] A. M. Klibanov, *CHEMTECH* **1986**, 354.
- [101] C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 711; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695.
- [102] J. S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 194.
- [103] T. Ueda, K. Murayama, T. Yamamoto, S. Kimura, Y. Imanishi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 225.
- [104] R. Verger, M. C. E. Mieras, G. H. de Haas, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4023.
- [105] W. A. Pietersen, J. C. Vidal, J. J. Völwerk, G. H. de Haas, *Biochemistry* **1974**, *13*, 1455.
- [106] M. C. E. van Dam-Mieras, M. C. E. A. J. Slotboom, W. A. Pietersen, G. H. de Haas, *Biochemistry* **1975**, *14*, 5387.
- [107] a) M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbom, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1730; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1604; b) I. Willner, M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbom, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6581.
- [108] J. Sunamoto, K. Iwamoto, Y. Mohri, T. Kominato, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5502.
- [109] I. Willner, S. Sussan, S. Rubin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 100.
- [110] S. Marx-Tibbom, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1261.
- [111] M. Aoyama, J. Watanabe, S. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5542.
- [112] J. Anzai, Y. Hasebe, A. Ueno, T. Osa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 1515.
- [113] T. Seki, M. Sakuragi, Y. Kawanishi, Y. Suzuki, T. Tamaki, R. Fukuda, K. Ichimura, *Langmuir* **1993**, *9*, 211.
- [114] Y. Kawanishi, T. Tamaki, T. Seki, M. Sakuragi, Y. Suzuki, K. Ichimura, K. Aoki, *Langmuir* **1991**, *7*, 1314.
- [115] K. Ichimura, Y. Suzuki, T. Seki, A. Hosoki, K. Aoki, *Langmuir* **1988**, *4*, 1214.
- [116] K. Aoki, T. Seki, Y. Suzuki, T. Tamaki, A. Hosoki, K. Ichimura, *Langmuir* **1992**, *8*, 1007.
- [117] M. Irie, H. Tanaka, *Macromolecules* **1983**, *16*, 210.
- [118] T. Amiya, T. Tanaka, *Macromolecules* **1987**, *20*, 1162.
- [119] A. Suzuki, T. Tanaka, *Nature* **1990**, *346*, 345.
- [120] R. Vilanove, H. Hevet, H. Gruler, F. Rundale, *Macromolecules* **1983**, *16*, 825.
- [121] M. Higuchi, A. Takizawa, T. Kinoshita, Y. Tsujita, *Macromolecules* **1987**, *20*, 2888.
- [122] D. Balasubramanian, S. Subramani, C. Kumar, *Nature* **1975**, *254*, 252.
- [123] I. Karube, Y. Nakamoto, S. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *445*, 774.
- [124] I. Karube, Y. Nakamoto, K. Namba, S. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *429*, 975.

- [125] Y. Hasebe, J.-I. Anzai, A. Ueno, T. Osa, *J. Phys. Org. Chem.* **1988**, *1*, 309.
 [126] I. Willner, S. Rubin, T. Zor, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4013.
 [127] I. Willner, S. Rubin, R. Shatzmiller, T. Zor, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8690.
 [128] I. Willner, S. Rubin, *React. Polym.* **1993**, *21*, 177.
 [129] I. Willner, R. Blonder, A. Dagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9365.
 [130] J.-I. Anzai, K. Sakamura, Y. Hasebe, T. Osa, *Anal. Chim. Acta* **1993**, *281*, 8543.
 [131] M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2741.
 [132] L. Stryer, *Biochemistry*, Freeman, New York, **1988**, S. 1028.
 [133] R. Maidan, A. Heller, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2889.
 [134] Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1285.
 [135] I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1428.
 [136] I. Willner, A. Riklin, B. Shoham, D. Rivenzon, E. Katz, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 912.
 [137] I. Willner, A. Riklin, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1535.
 [138] I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10965.

Lexikon Elektrotechnik



H.-D. Junge/ G. Müller

1994. XIV, 889 Seiten mit 847 Abbildungen und 65 Tabellen.

Gebunden. DM 168.-/SFR 156.-/ÖS 1310.-.

ISBN 3-527-28154-1

In mehr als 8000 Stichworten bietet dieses umfassende Nachschlagewerk ein Maximum an Information über die moderne Elektrotechnik.

Zu den thematischen Schwerpunkten zählen Grundlagen der Elektrotechnik, elektronische Bauelemente und Schaltungen in der Elektroenergiotechnik, Anwendung der Elektrotechnik in der Energieerzeugung, Umwandlung elektrischer Energie in andere Energieformen und alle aktuellen Entwicklungen auf neueren Gebieten.

Eine Besonderheit ist das integrierte englisch-deutsche Fachwörterbuch, das der wachsenden Bedeutung internationaler Kommunikation gerecht werden soll.

Ausführliche Erläuterungen, rund 900 Abbildungen und zahlreiche Querverweise machen dieses Lexikon zu einem wertvollen Ratgeber für alle, die an Elektrotechnik und Elektroenergiotechnik interessiert sind.

Bitte bestellen Sie bei Ihrer Buchhandlung oder direkt bei:

VCH, Postfach 10 11 61,
D-69451 Weinheim
Fax 0 62 01 - 60 61 84

