

Blau fluoreszierende Exciplexe aus *trans*-Stilben und Antikörpern

Herbert Meier*

Stilben und seine Derivate gehören zu den am besten untersuchten Molekülen in der Photochemie und der Photophysik organischer Verbindungen.^[1-4] Neben der Vielfalt der auf die elektronische Anregung folgenden Deaktivierungsprozesse haben in den letzten zwei Jahrzehnten vor allem materialwissenschaftliche Aspekte^[2] das Interesse an stilbenoiden Systemen geweckt. Ein ganz neues Anwendungsbereich wurde kürzlich von A. Simeonov et al.^[5] erschlossen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen Stilben-Haptene untersuchten, wie elektronisch angeregte Zustände durch Protein-Ligand-Wechselwirkungen beeinflusst werden.^[6]

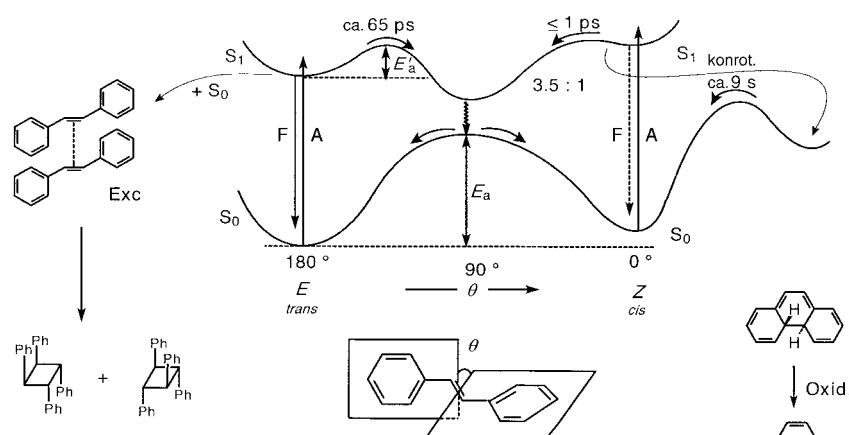
In Schema 1 ist ein Überblick über die Stilben-Photochemie gegeben. Die *trans/cis*-Isomerisierung (*E/Z*-Isomerisierung) weist im Grundzustand S_0 eine hohe Aktivierungs-

Modelle^[1-4] haben den „Schnitt“ durch die S_1 -Energiehyperfläche in analoger Weise gelegt – nämlich so, dass die Torsion um die C-C-Doppelbindung der entscheidende Parameter auf der Reaktionskoordinate ist.

Auf der Seite der (*E*)-Konfiguration gibt es im S_1 -Zustand eine Aktivierungsschwelle E'_a , die durch das vermiedene Überkreuzen mit einem höher angeregten Singulettzustand erklärt werden kann. Diese Barriere führt zu einer temperaturabhängigen Konkurrenz mit der Fluoreszenz. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F steigt von 4–8 % bei Raumtemperatur auf nahezu 100 % bei sehr tiefen Temperaturen.^[1, 2] Auf der Seite der (*Z*)-Konfiguration gibt es eine sehr kleine Barriere, und die Deaktivierung durch Fluoreszenz spielt eine ganz untergeordnete Rolle: $\Phi_F \approx 10^{-4}$ bei Raumtemperatur in *n*-Hexan.^[8]

Von beiden Ausgangskonfigurationen führt die Reaktionskoordinate auf der S_1 -Energiehyperfläche zu dem um $\theta = 90^\circ$ verdrillten Zustand, dessen mittlere Lebensdauer im Femtosekundenbereich liegt; durch einen „Funnel“ wird in der nichtadiabatischen Photoreaktion der Grundzustand S_0 erreicht,^[9] wobei die Rotationsrelaxationen zur (*E*)- und zur (*Z*)-Konfiguration ungefähr gleich wahrscheinlich sind.^[1, 2] Als Konkurrenzreaktion zur Isomerisierung gibt es auf der *trans*-Seite die stereoselektive Dimerisierung über nichtfluoreszierende Excimere Exc , die besonders bei Konzentrationen oberhalb von 10^{-2} M zum beherrschenden Produktkanal wird; auf der *cis*-Seite bildet die konrotatorische elektrocyclische Reaktion zu 4a,4b-Dihydrophenanthren eine monomolekulare Konkurrenzreaktion. Die Cyclisierung ist in Abwesenheit von Oxidationsmitteln thermisch und photochemisch reversibel. Internal Conversion ($S_1 \rightarrow S_0$) und Intersystem Crossing ($S_1 \rightarrow T_1$) spielen weder bei (*E*)- noch bei (*Z*)-Stilben eine Rolle.^[10, 11] Die hier gestellte, kritische Frage lautet nun: Wie verändern sich die beschriebenen und in Schema 1 zusammengefassten Eigenschaften, wenn Stilbenmoleküle kompliziert in monoklonalen Antikörpern vorliegen?

Um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen und eine bessere Kopplung an das Trägerprotein zu gewährleisten, haben Simeonov et al.^[5] anstelle des unsubstituierten Stilbens das Glutarsäuremonoamid-Derivat **1** verwendet, dessen elektro-

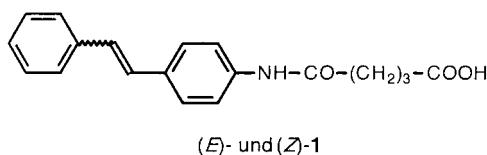


Schema 1. Die *E/Z*-Isomerisierung von Stilben und ihre Konkurrenzprozesse.^[1-3] F = Fluoreszenz; A = Absorption.

schwelle ($E_a = 180 \pm 20$ kJ mol⁻¹) auf, die allerdings durch eine Vielzahl von Katalysatoren stark abgesenkt werden kann. Wesentlich einfacher ist die Entkopplung der olefinischen π -Bindung im elektronisch angeregten Singulettzustand S_1 . Das erste detaillierte Reaktionsmodell wurde vor mehr als 30 Jahren von J. Saltiel^[7] vorgeschlagen; alle späteren

[*] Prof. Dr. H. Meier

Institut für Organische Chemie
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-39-22605
E-mail: hmeier@mail.uni-mainz.de



nische Natur sich nur unwesentlich von der des Grundkörpers unterscheidet.

Bei der stöchiometrischen Zugabe von (E)-1 zu einer Reihe von monoklonalen Antikörpern (EP2 mAb: **19G2**, **20F2**, **21C6**, **16H10** etc.) trat unter UV-Licht eine intensive Fluoreszenz auf, deren Farbton je nach Komplex **mAb-(E)-1** von leuchtendem Blau bis purpurfarben reichte. Aus den Untersuchungen mit insgesamt 15 Antikörpern^[5, 12] seien hier zum Vergleich mit unkomplexiertem Stilben **1** zwei Beispiele ausgewählt: der blau fluoreszierende Komplex **19G2-(E)-1** und der purpur fluoreszierende Komplex **16H10-(E)-1** (Tabelle 1).

Tabelle 1. Vergleich ausgewählter thermodynamischer und spektroskopischer Daten von **1** und seinen Komplexen mit den Antikörpern **19G2** und **16H10** in einer wässrigen Pufferlösung (10 mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl (pH 7.4) mit 5% DMF als Cosolvans) bei 20–21 °C.^[5, 12]

	(E)-1	19G2-1	16H10-1
Dissoziationskonstanten:			
K_d ((E)-1) [μM]	–	0.16	0.31
K_d ((Z)-1) [μM]	–	1.7	2.3
UV-Absorption:			
λ_{\max} [nm]	320	325	320
$10^{-4} \epsilon_{\max}$ [cm ⁻¹ M ⁻¹]	3.32	3.15	2.82
Fluoreszenz:			
λ_{\max} [nm]	388	410	380
Quantenausbeute Φ_F	0.02	0.78	0.28
Fluoreszenzlebensdauer τ_F [ns]	0.071	22.9, 7.6, 1.1, 0.086	0.864, 0.375
intrinsische Lebensdauer ^[a] τ [ns]	3.6	31	4.3
photostationärer Zustand: ^[b]	E/Z	< 1	32.3
			2.2

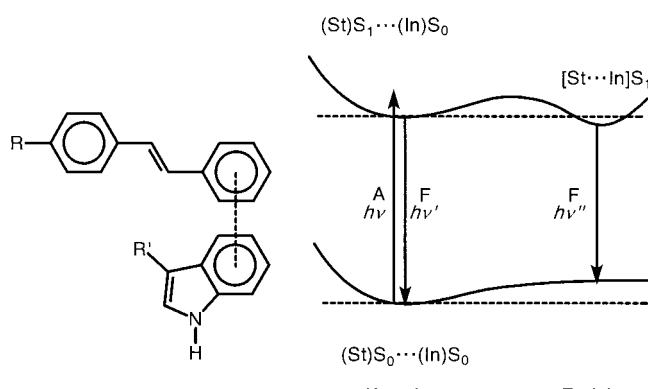
[a] $\tau = \tau_F / \Phi_F$; [b] $\lambda \geq 300$ nm.

Die Dissoziationskonstanten der Komplexe **mAb-(E)-1** liegen in der gewählten Pufferlösung bei Raumtemperatur im Mittel bei 0.37 μM, die der entsprechenden Komplexe **mAb-(Z)-1** bei 2.16 μM, wobei mit einer Ausnahme (E)-1 stets etwas fester gebunden ist als (Z)-1; ein signifikanter Unterschied zwischen **19G2-1** und **16H10-1** besteht nicht. Die Röntgenstrukturuntersuchung von **19G2-(E)-1** bei 4 °C ergab, dass das nicht kovalent gebundene Hapten ein ebenes (E)-Stilben ist, dessen Längsachse in Richtung auf das Zentrum des monoklonalen Antikörpers weist. Der zur Glutarsäurekette distale Phenylrest steht dabei parallel zum Benzolring des Indolrestes von Tryptophan 103 aus der H-Kette des Antikörpers. Der π, π -Wechselwirkung der beiden Benzolringe kommt damit eine entscheidende Bedeutung zu.^[13]

Das UV- und das Fluoreszenzanregungs-Spektrum von **19G2-(E)-1** zeigen bei Raumtemperatur gegenüber freiem (E)-1 eine Rotverschiebung (Tabelle 1) und eine veränderte Schwingungsfeinstruktur. Analoge Effekte werden bei der Fluoreszenzbande gefunden. Wesentlich drastischer ist jedoch

die Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F von 2% für (E)-1 auf 78% für **19G2-(E)-1**. Beim Abkühlen wird die Fluoreszenzbande des Komplexes **19G2-(E)-1** hypsochrom verschoben und stärker strukturiert, wobei die wesentliche Veränderung im Temperaturintervall zwischen –13 und –33 °C eintritt. Die blaue Fluoreszenz nimmt dabei in ihrer Intensität ab und ist bei –60 °C völlig verschwunden; beim Erwärmen kehrt sie zurück. Dieser Befund ist überraschend und steht im Gegensatz zu dem Verhalten von freiem (E)-Stilben; wie Schema 1 veranschaulicht, begünstigt ein Abkühlen die Fluoreszenz, weil die Aktivierungsschwelle des Isomersierungsweges weniger leicht überwunden werden kann. Die photostationären Zustände von Stilben und dem Stilbenderivat **1** sind bei langwelliger Bestrahlung ($\lambda \geq 300$ nm) durch *E/Z*-Verhältnisse kleiner eins gekennzeichnet,^[14] bei **19G2-(E)-1** tritt schon bei Raumtemperatur die *E* → *Z*-Photoisomerisierung^[15] kaum in Erscheinung (Tabelle 1). Das im Antikörper komplexierte Stilben **1** verändert also sein photophysikalischs und photochemisches Verhalten grundlegend. Näheren Aufschluss darüber gibt die im Picoskundenbereich zeitaufgelöste Emissionsspektroskopie. Die Fluoreszenz von (E)-1 fällt in der Pufferlösung bei Raumtemperatur monoexponentiell mit einer mittleren Lebensdauer τ_F ab, die mit 71 ps gut dem Wert von unsubstituiertem (E)-Stilben entspricht (Schema 1). Die Abklingfunktion von **19G2-(E)-1** setzt sich dagegen aus vier Komponenten zusammen, wobei die langlebige Komponente mit $\tau_F = 22\,900$ ps weitaus am wichtigsten ist. Die prinzipiell sehr problematische Anpassung der Abklingkurve mit vier Exponentialfunktionen wird durch vier Emissionsspektren gestützt, die sich auf die unterschiedlichen Zeitfenster beziehen: Die intensitätsschwachen Emissionen mit Maxima zwischen 380 und 400 nm entsprechen weitgehend der von freiem (E)-1 und gehen vermutlich auf Komplexe mit etwas unterschiedlicher Umgebung des Stilben-Chromophors zurück. Die langlebige Komponente mit intensiver und bathochrom verschobener Emission ($\lambda_{\max} = 420$ nm) stammt dagegen von einem Exciplex, der sich im Nanosekundenbereich auf- und abbaut. Maßgeblich dafür scheint die π, π -Wechselwirkung zwischen dem Stilben- und dem Indol-Baustein (St ··· In) zu sein (Schema 2).

Der Exciplex entspricht im Grundzustand einem Zerfalls-
term, d.h., auf der Energiehyperfläche des Grundzustandes



Schema 2. Exciplex-Bildung und Deaktivierung durch Fluoreszenz.

erfolgt eine spontane Dissoziation. Inwieweit Grundzustandskomplexe und Exciplexe sich in ihren geometrischen Parametern oder aktivierten Schwingungsmoden unterscheiden, ist spekulativ.^[5] Entscheidend ist die temperaturabhängige Dynamik des Systems, die unterhalb von ca. -30°C eine Reorganisation zum Exciplex nicht mehr zulässt.

Es bleibt noch den Unterschied zwischen den purpurn (violett) fluoreszierenden Systemen, wie **16H10-(E)-1**, und den blau fluoreszierenden Antikörpern, wie **19G2-(E)-1**, zu klären. Die in Tabelle 1 aufgelisteten Daten lassen vor allem ein Unterscheidungsmerkmal erkennen: **16H10-(E)-1** ist nicht in der Lage, einen langlebigen Exciplex zu bilden, die intrinsische Strahlungslebensdauer ist gegenüber der von freiem **(E)-1** kaum verändert. Die gegenüber **19G2-(E)-1** herabgesetzte Quantenausbeute Φ_{F} entspricht einer Erhöhung des **(Z)**-Anteils im photostationären Zustand.

Von den in Schema 1 aufgeführten Konkurrenzprozessen zu Fluoreszenz und Isomerisierung spielt die Photodimerisierung im monoklonalen Antikörper keine Rolle; die elektrocyclische Ringschlussreaktion mit nachfolgender Oxidation durch vorhandenen Luftsauerstoff wird dagegen beobachtet. Das vollständige Ausbleiben der Fluoreszenz bei 60 min UV-Belichtung wird von Simeonov et al. mit der irreversiblen Phenanthrenbildung erklärt.^[5]

Wodurch unterscheiden sich Photophysik und Photochemie von Stilbenchromophoren in Antikörpern von anderen Wirtssystemen mit Stilben-Gästen wie Cyclodextrinen,^[16] Clathraten,^[17] Einschlussverbindungen in Deoxycholsäure^[18] oder Flüssigkristallen?^[19] Sterische Beschränkungen, die Symmetrie der Cavität, die lokale Polarität, die lokale Viskosität und die Energieübertragung zwischen Gast und Wirt führen zu einer Vielfalt von Eigenschaftsänderungen gegenüber Stilben in Lösung. Neu ist das „Feintuning“, das auf der molekularen Dynamik der Antikörper-Stilben-Komplexe beruht. Photochemische Sensoren des hier beschriebenen Typs versprechen interessante Anwendungen, z.B. in der Immunochemie, in histologischen Untersuchungen und in Genom-Studien.

- [1] H. Görner, H. J. Kuhn, *Adv. Photochem.* **1995**, *19*, 1–117, zit. Lit.
- [2] H. Meier, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1425–1446; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1399–1420, zit. Lit.
- [3] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415–436.
- [4] U. Mazzucato, F. Momicchioli, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1679–1719.
- [5] A. Simeonov, M. Matsushita, E. A. Juban, E. H. Z. Thompson, T. Z. Hoffman, A. E. Beuscher IV, M. J. Taylor, P. Wirsching, W. Rettig, J. K. McCusker, R. C. Stevens, D. P. Millar, P. G. Schultz, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Science* **2000**, *290*, 307–313.
- [6] Siehe auch: J. I. Brauman, *Science* **2000**, *290*, 286–287.
- [7] J. Saltiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1036–1037; J. Saltiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6394–6400.
- [8] J. Saltiel, A. Waller, Y. P. Sun, D. F. Sears, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4580–4581, zit. Lit.
- [9] Für die *cis* → *trans*-Isomerisierung existiert außerdem ein untergeordneter adiabatischer Weg.^[1,2]
- [10] Die Quantenausbeute für das Intersystem Crossing $\text{S}_1 \rightarrow \text{T}_1$ liegt bei etwa 10^{-3} .^[1]
- [11] Durch Energieübertragung von Tripletsensibilisatoren lässt sich T_1 populieren und so ebenfalls eine *E/Z*-Isomerisierung einleiten.
- [12] Einzelheiten zur Herstellung und Charakterisierung sind bei *Science Online* unter <http://www.sciencemag.org/feature/data/1052306.shl> zu finden.
- [13] Die kristallographische Analyse bei -173°C ergab für die aktive Region des Antikörpers mit dem komplexierten Stilben **(E)-1** die gleiche Anordnung.
- [14] Die **(Z)**-Konfiguration kann bis zu Werten von 80% und mehr dominieren; das genaue *E/Z*-Verhältnis hängt von der Belichtungswellenlänge ab: $E/Z = (\epsilon(Z)\phi(Z \rightarrow E)) / (\epsilon(E)\phi(E \rightarrow Z))$.
- [15] Die thermische Isomerisierung (vgl. Schema 1) und eine durch den Antikörper katalysierte Isomerisierung können ausgeschlossen werden.
- [16] a) I. Tabuchi, L. C. Yuan, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3574–3575; b) G. L. Duvaneck, E. V. Sitzmann, K. B. Eisenthal, N. J. Turro, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 7166–7170.
- [17] R. Arad-Yellin, B. S. Green, M. Knossow, N. Rysenek, G. Tsoucaris, *J. Inclusion Phenom.* **1985**, *3*, 317; R. Arad-Yellin, S. Brunie, B. S. Green, M. Knossow, G. Tsoucaris, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7529–7537.
- [18] A. Guarino, E. Possagno, R. Bassanelli, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1541–1547.
- [19] H. Meier, T. Lafka, K. Müller, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1995**, *124*, 465–469, zit. Lit.