

Synthese von Azurin-Poly(*N*-Isopropylacrylamid)-Konjugaten durch zielgerichtete Mutagenese und deren temperaturabhängiges Verhalten im Elektronentransferprozess**

Nadine Rosenberger, Armido Studer,* Nobuyuki Takatani, Hiroshi Nakajima und Yoshihito Watanabe*

Peptid-Polymer- und Protein-Polymer-Konjugate erlangen zunehmend Bedeutung in der aktuellen Forschung.^[1] Die Aktivitäten und Strukturen dieser Biohybridmaterialien lassen sich je nach Funktion des Polymers gezielt modifizieren. Sofern ein „intelligentes“ Polymer zur Konjugation genutzt wird, kann das entsprechende Biohybrid auf externe Reize wie Licht, pH- oder Temperaturänderungen reagieren.^[2] Das temperaturempfindliche Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM)^[3] war bereits bei der Herstellung derartiger Biohybridmaterialien erfolgreich.^[4] Unterhalb 32 °C liegt PNIPAM in einem wasserlöslichen, hydratisierten Zustand mit gestreckter Polymerkette vor. Oberhalb der unteren Entmischungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) aggregieren die Polymerketten, und das Polymer geht in einen hydrophoben, wasserunlöslichen Zustand über. Dieser Phasenübergang kann genutzt werden, um biologische Prozesse von PNIPAM-Biomolekül-Konjugaten durch Temperaturänderungen zu beeinflussen.^[2,4,5]

Unterschiedliche Ansätze zur Anbindung von Polymeren an Proteine wurden gewählt:^[1] 1) Reaktionen von Proteinen mit Polymeren, die reaktive Endgruppen tragen, 2) Reaktionen von Polymerisationsinitiatoren mit Proteinen und anschließende Polymerisation und 3) Cofaktor-Rekonstitution unter Verwendung von Cofaktor-Polymer-Konjugaten.^[6] Falls mehr als eine reaktive Position am Protein für das aktivierte Polymer oder den Initiator zugänglich ist, so ist eine nicht-spezifische mehrfache Modifizierung des Proteins nach (1)

oder (2) möglich. Dieses Problem kann umgangen werden, indem man eine definierte reaktive Stelle zur selektiven Anbindung des Polymers oder Initiators mithilfe einer Punktmutation einführt.^[1f,2,7]

Wir präsentieren hier ein neues Konzept zur Herstellung von Protein-Polymer-Konjugaten. Dabei verwenden wir Azurin, ein gut untersuchtes Kupferprotein, das am bakteriellen Elektronentransfer beteiligt ist.^[8] Elektrochemische Untersuchungen belegen, dass ein effizienter Elektronenaustausch zwischen Azurin und einer Elektrode möglich ist. Infolgedessen kann Azurin potenziell als Komponente in Funktionseinheiten nach biologischem Vorbild („biodevices“) dienen.^[9]

Canter und Mitarbeiter zeigten, dass His117, welches als Ligand an das aktive Kupferzentrum im Azurin aus *Pseudomonas aeruginosa* bindet, durch externe Imidazolderivate ersetzt werden kann;^[10] die Aktivität der mit Imidazol rekonstituierten Mutanten blieb dabei erhalten. Die Ergebnisse dieser Studien veranlassten uns, Imidazol-terminiertes PNIPAM durch Nitroxid-vermittelte Polymerisation zu synthetisieren und in der Rekonstitution der His117Gly-Mutante einzusetzen.^[11,12] Auf diese Weise wird die PNIPAM-Kette am aktiven Zentrum von Azurin eingeführt (Abbildung 1). In Kombination mit Cytochrom *c* sollte sich das Polymer zwischen Azurin und seinem Redoxpartner (Cytochrom *c*) positionieren und somit die Protein-Protein-Wechselwirkung in Abhängigkeit von der Temperatur beeinflussen können.

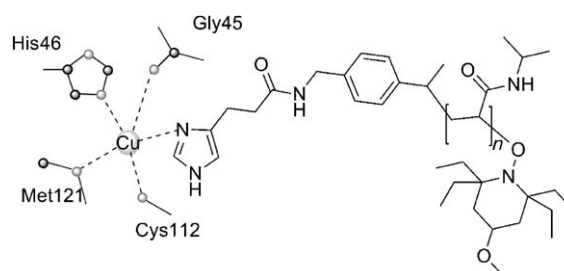


Abbildung 1. Das aktive Zentrum des rekonstituierten Azurin-PNIPAM-Konjugats.

Mithilfe von kinetischen Messungen zeigen wir hier, dass PNIPAM, gebunden am aktiven Zentrum von Azurin, den Elektronentransfer (ET) von Cytochrom *c* zum Azurin-PNIPAM-Konjugat in Abhängigkeit von der Temperatur regulieren kann. Mit kurzketzigem PNIPAM lässt sich der ET

[*] N. Rosenberger, Prof. Dr. A. Studer
Organisch-Chemisches Institut
Westfälische Wilhelms-Universität
Corrensstraße 40, 48149 Münster (Deutschland)
Fax: (+49) 251-83-36523
E-Mail: studer@uni-muenster.de

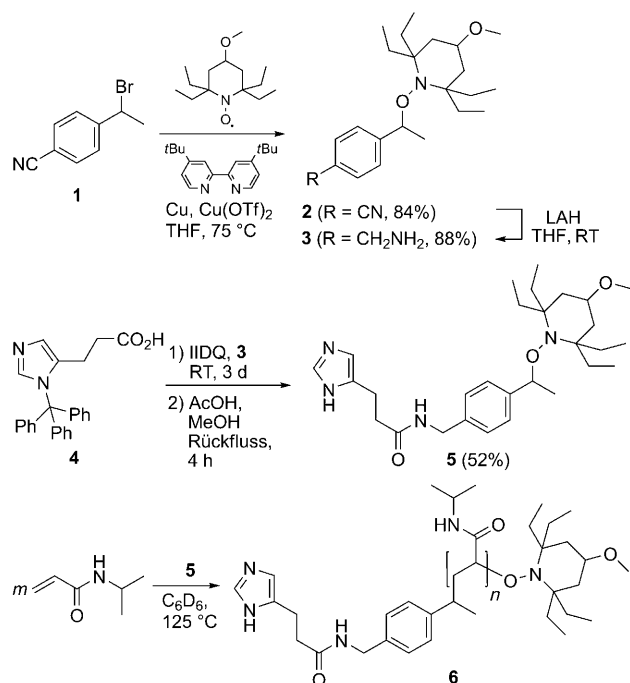
Dr. N. Takatani, Dr. H. Nakajima, Prof. Dr. Y. Watanabe
Department of Chemistry, Graduate School of Science
Nagoya University, Chikusa-ku, 464-8602 (Japan)
E-Mail: yoshi@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp

[**] Wir danken der DFG und der JSPS für die Finanzierung (International Research Training Group Münster/Nagoya). Dr. Kunishige Kataoka von der Kanazawa Universität wird gedankt für eine Spende des Expressionssystems von Azurin-1 und viele Ratschläge bezüglich der Kultivierung. Wir danken Prof. Dr. S. Yamago und Y. Ukai (Universität Kyoto) für die GPC-Messungen von PNIPAM und S. Ozawa (Universität Nagoya) für die Rekonstitution von Azurin-PNIPAM(34200).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200804440> zu finden.

jedoch nicht steuern. Dies liefert Einblicke, wie PNIPAM die Wechselwirkung zwischen Azurin und Cytochrom c beeinflusst.

Die Synthese von Imidazol-terminiertem PNIPAM ist in Schema 1 beschrieben. Die radikalische Bromierung (Br_2 , $h\nu$, CCl_4) von 4-Ethylbenzonitril lieferte **1**, das nach einem be-



Schema 1. Synthese der Imidazol-PNIPAM-Konjugate **6** mit $M_n = 3800\text{--}34\,200\text{ g mol}^{-1}$. IIDQ = Isobutyl-1,2-dihydro-2-isobutoxy-1-quinolincarboxylat.

kannten Verfahren in das Alkoxyamin **2** überführt wurde.^[5] Die Reduktion von **2** mit Lithiumaluminiumhydrid (LAH) und die anschließende Kupplung mit der Propionsäure **4**,^[13] die einen tritylierten Imidazolsubstituenten trägt, ergaben nach Entschützen den Initiator **5**. Die Nitroxid-vermittelte Polymerisation wurde in C_6D_6 mit 0.5–2 Mol-% **5** bei 125 °C in Druckröhrchen ausgeführt. Der Umsatz wurde ^1H -NMR-spektroskopisch bestimmt, und mithilfe von Massenspektrometrie und Gelpermeationschromatographie (GPC) wurden mittlere Molekulargewichte von $3800\text{--}34\,200\text{ g mol}^{-1}$ und Polydispersitäten PDI von 1.14–1.39 ermittelt (siehe die Hintergrundinformationen).^[14,15] Die ^1H -NMR-spektroskopisch gemessenen LCSTs der Imidazol-PNIPAM-Konjugate **6** lagen bei 32 °C (Imid-PNIPAM 3800 g mol^{-1} : 30.5 °C; Imid-PNIPAM 9800 g mol^{-1} : 31.6 °C; Imid-PNIPAM $34\,200\text{ g mol}^{-1}$: 32.6 °C; siehe die Hintergrundinformationen).^[16]

Zur Mutagenese von His117 (Basencode CAC) in Gly (Basencode GGC) setzten wir die Polymerasekettenreaktion und Primer mit der nötigen Mutation ein. Azurin-His117Gly-Apoprotein wurde analog zu dem Protokoll von Canters et al. für die Expression des Wildtyps (WT) exprimiert und gereinigt.^[17] Die Reinheit des Apoproteins ließ sich mit SDS-PAGE und UV/Vis-Spektroskopie überprüfen (siehe die Hintergrundinformationen).

Die Rekonstitution von Azurin mit den PNIPAM-Konjugaten **6** (3800 und 9800 g mol^{-1}) erfolgte nach einer modifizierten Literaturvorschrift.^[18] Dabei wurde eine stöchiometrische Menge $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ zu einer Lösung der Apoproteinmutante in 20 mM MES-NaOH (pH 6.0) gegeben, was die Absorption bei 420 nm durch die Bildung von Typ-2-Kupferazurin verstärkte. Ein dreifacher Überschuss des PNIPAM-Konjugats **6** und NaCl (0.2 M) wurden zugegeben, und die Lösung wurde bei 4 °C solange gerührt, bis die Bildung des blauen Typ-1-Kupferkomplexes abgeschlossen war. Nach Entsalzen und Fällung von freiem **6** folgte die Analyse der resultierenden Azurin-PNIPAM-Konjugate. Für länger-kettiges PNIPAM ($34\,200\text{ g mol}^{-1}$) musste das Rekonstitutionsprotokoll leicht modifiziert werden; in diesem Fall war ein 20-facher Überschuss an PNIPAM erforderlich. Das rekonstituierte Holoprotein fiel oberhalb 40 °C aus und konnte so leicht vom nichtrekonstituierten Apoprotein abgetrennt werden (ca. 43% wurden rekonstituiert, siehe die Hintergrundinformationen). Weil Azurin-PNIPAM($34\,200$) oberhalb der LCST unlöslich war, konnte es für die geplanten ET-Messungen jedoch nicht eingesetzt werden.

UV/Vis-Spektren von Azurin-PNIPAM (3800 g mol^{-1}) und Azurin-PNIPAM (9800 g mol^{-1}) wurden bei 25 und 35 °C aufgenommen und mit Spektren für WT-Azurin und die mit 4-Methylimidazol rekonstituierte Azurinmutante verglichen (Abbildung 2). Das Verhältnis der Absorptionen bei 280 und 620 nm stellt ein Maß für die erfolgreiche Rekonstitution dar. Dieses Verhältnis war nahezu identisch für die Mutanten und WT-Azurin, was eindeutig die erfolgreiche Rekonstitution des Typ-1-Kupferzentrums belegt. Die Azurin-PNIPAM-Konjugate zeigten zudem keine Veränderungen im UV/Vis-Spektrum oberhalb der LCST des Polymers. Deshalb schließen wir die Verdrängung des Imidazol-PNIPAM-Liganden (Ligandenaustausch mit Wasser) der Mutante bei höherer Temperatur aus.

Wir untersuchten die rekonstituierten Mutanten auch mithilfe von EPR-Spektroskopie. Die Spektren für WT-Azurin und die Azurin-PNIPAM(9800)-Mutante stimmten sehr gut überein (Abbildung 3). Die Koordinationsgeometrie um das Kupferzentrum der rekonstituierten Mutante muss nahezu identisch mit derjenigen des Wildtyps sein, da die Werte für A_{\parallel} ($58 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$), g_{\parallel} (2.248) und g_{\perp} (2.055) ähnlich sind.^[10a,18] Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Azurin-PNIPAM(3800) erhalten (siehe die Hintergrundinformationen).

Weiterhin konnten wir mit CD-Spektroskopie an Azurin-WT und Azurin-PNIPAM(9800) zeigen, dass das Azurin-PNIPAM-Konjugat bei 25 und 35 °C die Proteinkonformation von WT-Azurin beibehält (siehe die Hintergrundinformationen).

Schließlich wurden ET-Prozesse zwischen reduziertem Cytochrom c und WT-Azurin sowie den rekonstituierten Mutanten bei 25 und 35 °C untersucht. Anstelle des natürlichen Redoxpartners von Azurin, Cytochrom c aus *Pseudomonas aeruginosa*, verwendeten wir Cytochrom c_{552} aus *Thermus thermophilus* HB8 als Elektronendonator, weil dessen Konformation unter den gewählten Reaktionsbedingungen sehr stabil ist. Ferner sollte die hydrophobe Tasche, die an der Oberfläche nahe des Häm-Cofaktors lokalisiert ist, hydro-

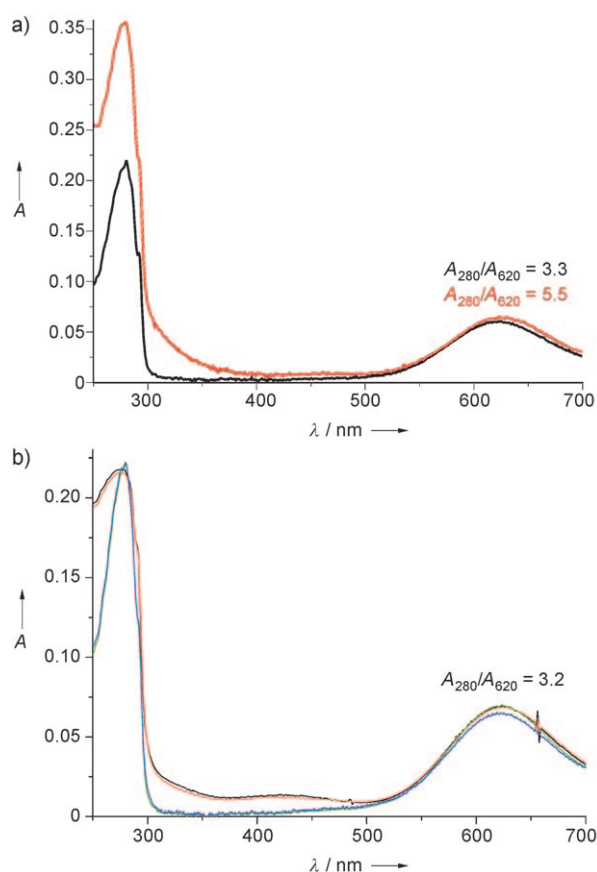


Abbildung 2. a) UV/Vis-Spektren von WT-Azurin (schwarze Linie) und einer mit 4-Methylimidazol rekonstituierten Mutante (rote Linie). b) UV/Vis-Spektren der Azurinmutante, rekonstituiert mit PNIPAM-(3800), bei 25°C (schwarze Linie) und 35°C (rote Linie); UV/Vis-Spektren der Azurinmutante, rekonstituiert mit PNIPAM(9800), bei 25°C (grüne Linie) und 35°C (blaue Linie).

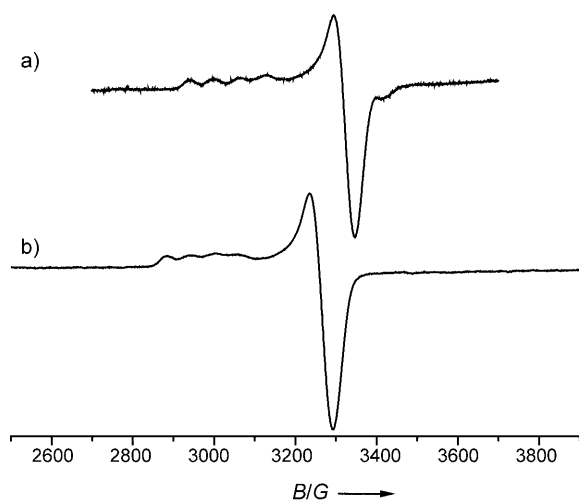


Abbildung 3. EPR-Spektren einer rekonstituierten Mutante (a) und von WT-Azurin bei 80 K.

phobe Wechselwirkungen mit dem Redoxpartner Azurin eingehen und so den ET zulassen. Die kinetischen Messungen

wurden in einer UV-Zelle unter Luftausschluss ausgeführt, um die Oxidation von reduziertem Cytochrom c_{552} zu verhindern (siehe die Hintergrundinformationen). Dabei wurde die rekonstituierte Azurinmutante der oxidierten Form zu einer Lösung von reduziertem Cytochrom c_{552} gegeben und die Abnahme der Soret-Bande bei 416 nm mit der Zeit bei gegebener Temperatur verfolgt (Abbildung 4).

Für WT-Azurin wurde bei 25°C eine Geschwindigkeitskonstante $k = 9.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gemessen, die sehr gut mit dem Literaturwert übereinstimmt,^[19] ein ähnlicher k -Wert wurde bei 35°C ermittelt ($1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Der ET der Azurin-PNIPAM(3800)-Mutante war bei 25°C um eine Größenordnung langsamer ($1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als mit WT-Azurin. Die

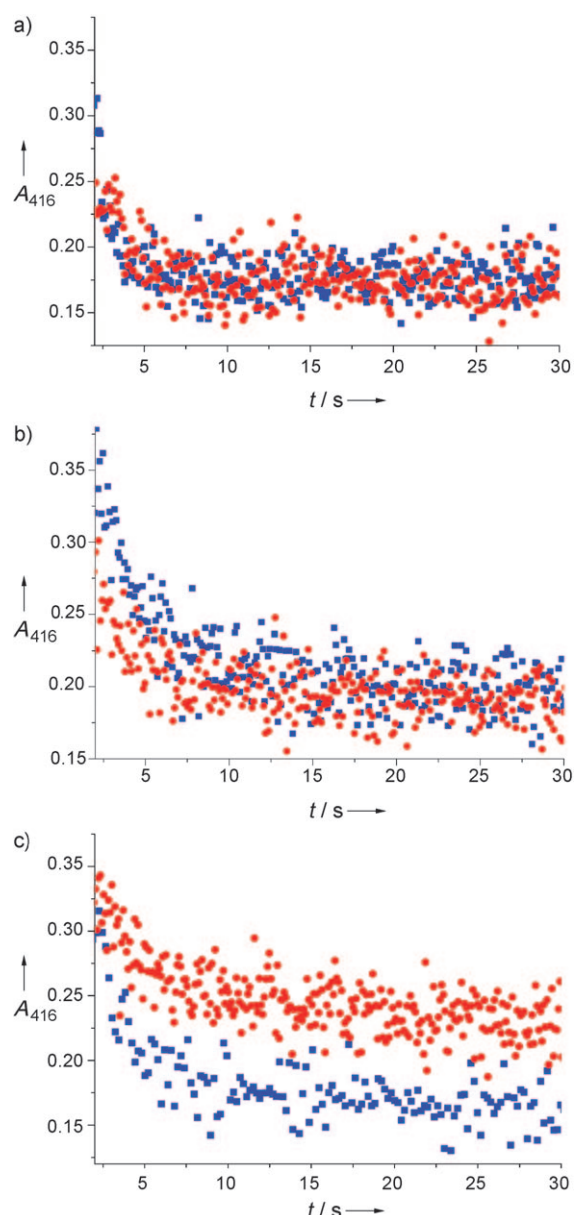


Abbildung 4. Elektronentransferprozesse von reduziertem Cytochrom c_{552} zu oxidiertem WT-Azurin (a), zur Azurin-PNIPAM(3800)-Mutante (b) und zur Azurin-PNIPAM(9800)-Mutante (c) bei 25°C (blaue Punkte) und 35°C (rote Punkte).

solvatisierte PNIPAM-Kette übt also einen kleinen, aber messbaren Effekt auf die Aktivität des Proteins aus. Bei 35 °C wurde eine etwas höhere Geschwindigkeitskonstante erhalten ($3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Wahrscheinlich war die PNIPAM-Einheit zu kurz, um ein temperaturabhängiges Verhalten zu induzieren.^[20] Tatsächlich konnte die ET-Geschwindigkeitskonstante für die Azurin-PNIPAM(9800)-Mutante in Abhängigkeit der Temperatur verändert werden. Bei 25 °C erhielten wir einen k -Wert von $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ähnlich dem Wert, der für die Mutante mit kürzerer PNIPAM-Kette erhalten wurde), bei 35 °C betrug die Geschwindigkeitskonstante jedoch nur noch ein Viertel dieses Werts ($6.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[21]

Wir glauben, dass die Strukturänderungen der PNIPAM-Einheit (für Polymere mit M_n um 10000 g mol^{-1}) bei der Temperaturerhöhung von 25 auf 35 °C die Proteinerkennung von Cytochrom c_{552} mit Azurin beeinflussen. Hydrophobe Wechselwirkungen am aktiven Zentrum von Azurin, wo das Polymer unserer Mutanten sitzt, sind bekanntermaßen wichtig für die Wechselwirkung zwischen Cytochrom c und Azurin in den Wildtyp-Enzymen. Die kollabierte PNIPAM-Kette könnte teilweise die Wechselwirkungsstelle am Azurin blockieren, was die Zugänglichkeit dieser Stelle für Cytochrom c_{552} deutlich einschränken würde, während hydratisiertes PNIPAM Raum für die Wechselwirkung mit Cytochrom c_{552} lassen sollte, auch wenn der vollständige Kontakt zwischen den Proteinen eingeschränkt ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse, die für PNIPAM(3800) und PNIPAM(9800) erhalten wurden, zeigen, inwieweit der Polymerrest die Stelle der hydrophoben Protein-Protein-Wechselwirkung bedeckt.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass Polymer-Azurin-Hybride durch His117Gly-Mutation und anschließende Rekonstitution mit Imidazol-terminierten Polymeren hergestellt werden können. Das Polymer agiert als Ligand für das Kupferion des aktiven Zentrums. Dies ist der erste Bericht über die Synthese eines Polymer-Protein-Biohybrids unter Anwendung der Polymer-Liganden-Rekonstitution in einem Metalloprotein. Wichtig ist, dass mithilfe dieses Ansatzes das Polymer ortsspezifisch an das Protein angebunden werden kann. Weiterhin ist das Polymer am aktiven Zentrum des Metalloproteins lokalisiert, sodass es die Enzymaktivität beeinflussen kann. Struktur und Aktivität blieben durch die Proteinrekonstitution erhalten. Für Biohybridmaterialien mit einer längeren PNIPAM-Kette konnte die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Temperatur verändert werden. Die Geschwindigkeitskonstante des ET wurde bei höherer Temperatur um den Faktor vier verringert. Bei Protein-Polymer-Hybriden mit kürzeren PNIPAM-Ketten wurde kein temperaturabhängiges Verhalten beobachtet.

Eingegangen am 9. September 2008,
veränderte Fassung am 4. November 2008
Online veröffentlicht am 6. Februar 2009

Stichwörter: Biokonjugate · Cytochrome · Enzyme · Polymere · Punktmutationen

- [1] a) M. A. Gauthier, H.-A. Klok, *Chem. Commun.* **2008**, 2591; b) I. S. Carrico, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1423; c) H. G. Börner, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, 208, 124; d) H. G. Börner, H. Schlaad, *Soft Matter* **2007**, 3, 394; e) K. L. Heredia, H. D. Maynard, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 45; f) P. Thordarson, B. L. Droumaguet, K. Velonia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 73, 243; g) H.-A. Klok, *J. Polym. Sci. Part A* **2005**, 43, 1; h) J. Nicolas, G. Mantovani, D. M. Haddleton, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28, 1083.
- [2] A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Macromol. Symp.* **2004**, 207, 139.
- [3] M. Heskins, J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. Part A* **1968**, 2, 1441; Übersicht: H. G. Schild, *Prog. Polym. Sci.* **1992**, 17, 163.
- [4] PNIPAM-Protein-Konjugate: D. Bontempo, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6508; H. D. Maynard, K. L. Heredia, R. C. Li, D. P. Parra, V. Vázquez-Dorbatt, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 4015; C. Boyer, V. Bulmus, J. Liu, T. P. Davis, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7145; P. De, M. Li, S. R. Gondi, B. S. Sumerlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11288; S. Kulkarni, C. Schilli, B. Grin, A. H. E. Müller, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2736; C. Boyer, J. Liu, V. Bulmus, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, M. H. Stenzel, *Macromolecules* **2008**, 41, 5641.
- [5] K. Molawi, A. Studer, *Chem. Commun.* **2007**, 5173.
- [6] M. J. Boerakker, N. E. Botterhuis, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, E. M. Meijer, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6071, zit. Lit.
- [7] a) P. S. Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chilkoti, G. Chen, J. M. Harris, A. S. Hoffman, *Nature* **1995**, 378, 472; b) T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 517; c) A. Deiters, T. A. Cropp, D. Summerer, M. Mukherji, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5743; d) B. R. Griffith, B. L. Allen, A. C. Rapraeger, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1608; e) K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16955.
- [8] E. Vijgenboom, J. E. Busch, G. W. Canters, *Microbiology* **1997**, 143, 2853.
- [9] a) R. Rinaldi, A. Biasco, G. Maruccio, V. Arima, P. Visconti, R. Cingolani, P. Facci, F. De Rienzo, R. Di Felice, E. Molinari, M. P. Verbeet, G. W. Canters, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, 82, 472; b) G. Maruccio, A. Biasco, P. Visconti, A. Bramanti, P. P. Pompa, F. Calabi, R. Cingolani, R. Rinaldi, S. Corni, R. Di Felice, E. Molinari, M. R. Verbeet, G. W. Canters, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 816.
- [10] a) T. den Blaauwen, M. van de Kamp, G. W. Canters, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5050, zit. Lit.; b) T. E. de Jongh, A.-M. M. van Roon, M. Prudentio, M. Ubbink, G. W. Canters, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 3861, zit. Lit.
- [11] a) C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3661; b) A. Studer, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1159; c) A. Studer, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 267; d) A. Studer, T. Schulte, *Chem. Rec.* **2005**, 5, 27.
- [12] Kontrollierte radikalische Polymerisation für die Synthese von Biokonjugaten: J. Nicolas, G. Mantovani, D. M. Haddleton, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28, 1083.
- [13] G. Lelais, P. Micuch, D. Josien-Lefebvre, F. Rossi, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 65, 2229.
- [14] a) T. Schulte, K. O. Siegenthaler, H. Luftmann, M. Letzel, A. Studer, *Macromolecules* **2005**, 38, 6833; b) S. Kehr, H. Luftmann, *e-Polym.* **2007**, 010.
- [15] Molekulargewichte und PDIs, die mit GPC bestimmt wurden, stimmten gut mit den Daten, die massenspektrometrisch erhalten wurden, überein (siehe die Hintergrundinformationen).
- [16] A. Larsson, D. Kuckling, M. Schönhoff, *Colloids Surf. A* **2001**, 190, 185.
- [17] M. van de Kamp, F. C. Hali, N. Rosato, A. Agro, G. W. Canters, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1990**, 1019, 283.

- [18] T. den Blaauwen, G. W. Canters, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1121.
- [19] P. Rosen, I. Pecht, *Biochemistry* **1976**, *15*, 775.
- [20] Die LCSTs der Protein-Polymer-Konjugate (3800 und 9800 g mol⁻¹) konnten nicht bestimmt werden. Wir nehmen an, dass diese Werte vergleichbar mit der LCST für die Imidazol-terminierten PNIPAMs (ca. 32°C) sind – in Analogie zu einer Publikation, in der die LCST eines Streptavidin-PNIPAM-Konjugats vergleichbar mit der LCST von freiem PNIPAM war: P. Stayton, T. Shimboji, C. Long, A. Chilkoti, G. Chen, J. M. Harris, A. S. Hoffman, *Nature* **1995**, *378*, 472.
- [21] Variation der Enzymaktivität durch „intelligente“ Redoxpolymere: B. Nagel, A. Warsinke, M. Katterle, *Langmuir* **2007**, *23*, 6807.
-