

lichtsammelnder Chromophor in den DNA-Reparaturenzymen DNA-Photolyase vor^[13–14] und dient der Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit bei schwacher Lichteinstrahlung.

In CraCRY, einem Cryptochrom aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, wird die Empfindlichkeit gegenüber Blaulicht durch die Fähigkeit des Proteins, F_o als Antennenchromophor zu binden, verbessert.^[15] Das 5-Deazaflavin F₄₂₀ wird beispielsweise bei der Methanogenese, d.h. der anaeroben Produktion von Methan aus CO₂ oder einfachen Kohlenstoffverbindungen, benötigt.^[16] Der F₄₂₀-Kern, 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin-5'-phosphat, wurde auch in Archaeen und in Gram-positiven Eubakterien gefunden, beispielsweise in *Streptomyces*^[11] und Mykobakterien.^[17]

Durch biochemisches Screening wurden kürzlich 5-Deazaflavin-Derivate als Inhibitoren der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2 (TDP2) nachgewiesen,^[18–19] einem DNA-reparierenden Enzym für irreversible Topoisomerase-II-vermittelte Spaltungskomplexe. Aufgrund der Stabilität des vollständig reduzierten 5-Deazaflavins gegenüber der Oxidation durch Sauerstoff gelten diese auch als potenziell nützliche Photokatalysatoren für die direkte, Nikotinamid-unabhängige Regeneration von Flavoenzymen.^[20]

Erst kürzlich wurde für verschiedene derivatisierte 5-Deazaflavine ein mit Natrium und Lithium vergleichbares Reduktionspotential gemessen, was diese als Photokatalysatoren interessant macht.^[21–22] Durch Derivatisierung der Position R¹ (siehe Abbildung 1) mit Br oder Cl wurde die Triplett-Ausbeute maximiert, wodurch die über eine einfach reduzierte 5-Deazaflavin-Spezies verlaufende, lichtinduzierte Dehalogenierung von Arenen erfolgreich gestaltet werden konnte.^[22]

Zwei bemerkenswerte Beispiele dafür, wie die Reaktivität eines Proteins durch einfaches Ersetzen des nativen Flavin-Kofaktors durch das entsprechende 5-Deazaflavin verändert werden kann, sind zum einen die kürzlich nachgewiesene Umwandlung einer Dehalogenase in eine Nitrogenase^[23] und zum anderen die deutliche Verbesserung der Kontrolle des Photoschalt-Verhaltens von LOV2, der Blaulicht-Photorezeptordomäne von phot1. Die letztgenannten Arbeiten wurden in unserem Labor durchgeführt^[24] und später von Gärtner und dessen Mitarbeitern auf das verwandte YtvA-Protein aus *Bacillus subtilis* ausgedehnt,^[25] welches an der photoinduzierten Stressreaktion beteiligt ist. In LOV-Domänen ist FMN in seinem vollständig oxidierten Zustand gebunden, der bei etwa 445 nm absorbiert.^[26–27] Die Absorption von Blaulicht löst den Photozyklus der LOV-Domäne aus, indem zunächst das Flavin in seinen Triplettzustand angeregt wird.^[28] Anschließend erfolgt die Adduktbildung zwischen dem C4a-Atom des Flavins und einem benachbarten Cysteinrest zum Signalzustand der Domäne.^[29–31] Dieser Adduktzustand des Proteins absorbiert bei 390 nm. Seine Lebensdauer kann einige Sekunden in den LOV-Proteinen phot1 und phot2 aus *Arabidopsis thaliana*^[32–33] und bis zu mehr als 10.000 Sekunden in VIVID aus *Neurospora crassa* betragen.^[34] Die Rückkehr zum Grundzustand ist thermisch aktiviert. Der Austausch des FMN-Kofaktors durch 5-Deaza-FMN führt zu einem ähnlichen

Photozyklus. Dieser wird bei einer geringeren Wellenlänge initiiert, da das 5-Deazaflavin bei 405 nm absorbiert. Der erzeugte Signalzustand persistiert jedoch im Vergleich zum FMN-haltigen Wildtyp-Protein mit einer Lebensdauer von mehreren Tagen wesentlich länger.^[24–25] Alternativ kann die Rückkehr in den Grundzustand mit UV-A-Licht (340 nm) erzwungen werden. Auch wenn dieser Übergang aufgrund der sich überschneidenden Absorptionen von 5-Deaza-FMN und dem Photoaddukt nicht vollständig möglich ist, ist der Umschaltzyklus sehr robust. Bei mehrmaliger Wiederholung des Zyklus zeigte sich nur ein vernachlässigbarer Effizienzverlust.

Radikalische 5-Deazaflavin-Derivate wurden bisher noch nicht ausreichend mittels magnetischer Resonanzspektroskopie untersucht. Hersh und Mitarbeiter berichteten 1977 über ein mit der *Continuous-wave*-Elektronenspinresonanz (*cw*-EPR) detektiertes Signal eines 5-Deaza-FAD-Radikals, welches an eine aus Schweinenieren extrahierte D-Aminosäureoxidase gebunden war.^[35] Aufgrund der geringen spektralen Auflösung und des nur mäßigen Signal-Rausch-Verhältnisses wurde keine Spektrensimulation durchgeführt. Durch das Fehlen unabhängiger Daten anderer EPR-Methoden, wie der Elektron-Kern-Doppelresonanz (engl.: *electron-nuclear double resonance*, ENDOR),^[36] der Elektronenspin-echo-Einhüllendenmodulation (engl.: *electron-spin echo envelope modulation*, ESEEM),^[37] und der Hyperfein-Sublevel-Korrelationsspektroskopie (engl.: *hyperfine sublevel correlation*, HYSCORE),^[37] mit denen Hyperfeinwechselwirkungen^[38] direkt nachgewiesen werden können, wäre eine Simulation ohnehin wenig aussagekräftig.

Einer der oben erwähnten Photokatalysatoren wurde mittels *cw*-EPR untersucht, wodurch das Radikal eines 5-Deazaflavinderivats nachgewiesen werden konnte. Die Modifikationen bestanden in der Phenylierung des C5, Methoxy-Gruppen an den Positionen R¹ und R², sowie Methylierungen von N3 und N10.^[21] Es konnten drei signifikante Hyperfeinkopplungen aufgelöst werden, die N10 und den 2'- und 6'-Protonen im am C5 gebundenen Phenylring zugeordnet wurden. Da demnach Protonen des Phenylsubstituenten eine große Hyperfeinkopplung aufweisen, deuten diese Ergebnisse auf eine effiziente Delokalisierung des ungepaarten Elektronenspins über den 5-Deazaalloxazin-Kern hinaus hin, was für die Stabilisierung der radikalischen Spezies essentiell sein könnte.

Aufgrund fehlender Daten vom unsubstituierten 5-Deazaflavin-Radikal und motiviert durch eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung zu den katalytischen Fähigkeiten von C5-derivatisierten 5-Deazaflavinen^[21] wird hier die photo-CIDNP-NMR-Spektroskopie eingesetzt, um das 5-Deaza-FMN-Radikal zu untersuchen. Beim photo-CIDNP-Verfahren handelt es sich um eine NMR-Technik, die zur Untersuchung von kurzlebigen Radikalen, die in zyklischen Photoreaktionen auftreten, verwendet wird.^[39–40] Mit dieser Methode lassen sich auch Radikale nachweisen, die mittels EPR schwer oder gar nicht detektierbar sind.^[39,42–45] Die Hyperpolarisationserzeugung in Lösung beruht darauf, dass die Multiplizität eines durch photoinduzierten Elektronentransfer erzeugten Radikalpaars von der Multiplizität des Vorgängerzustands abhängt. Dabei kann es sich um einen

(angeregten) Singulettzustand (Spinquantenzahl $S=0$) oder, wenn der Elektronenübertragung ein „*Intersystem Crossing*“ vorausgeht, um einen Triplettzustand ($S=1$) handeln. Im letzteren Fall wird ein Triplett-Radikalpaar erzeugt. Unmittelbar nach der Erzeugung des Radikalpaares treten zwei Phänomene gleichzeitig auf:^[40–41,46] (i) Die Multiplizität des Radikalpaares oszilliert zwischen dem Singulett- und dem Triplettzustand mit einer Frequenz, die von der Dipol-Dipol-Wechselwirkung und der Austauschwechselwirkung zwischen den Radikalen des Radikalpaares und darüber hinaus auch von Unterschieden in den g -Werten und Hyperfeinkopplungen der Radikale abhängt. (ii) In isotroper Umgebung können die Radikale diffundieren, wobei eine Rekombination nach einem erneuten Aufeinandertreffen möglich ist. Da jedoch nur Singulett-Radikalpaare bei einem solchen Zusammentreffen direkt zu diamagnetischen Produkten rekombinieren können, neigen Triplett-Radikalpaare dazu, auseinander zu diffundieren und schließlich sogenannte (diamagnetische) „Fluchtprodukte“ zu bilden. Beide Prozesse führen zu einem so genannten „*Spin Sorting*“, da in jedem Reaktionsprodukt eine bestimmte Kernspinkonfiguration angereichert wird, was zu hyperpolarisierten NMR-Resonanzen der diamagnetischen Produkte führt.^[40,47] Die Analyse dieser hyperpolarisierten Resonanzen liefert Informationen über den Vorläuferzustand (Singulett oder Triplett) und die Hyperfeinstruktur der an dem betrachteten photochemischen Prozess beteiligten Radikale.^[48] Bei der zeitaufgelösten Variante des photo-CIDNP-Verfahrens, *tr*-photo-CIDNP (engl.: *time-resolved photo-CIDNP*), sind die Signalamplituden proportional zur isotropen Hyperfeinkopplungskonstante des jeweiligen Kerns.^[39]

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden ^1H -NMR-Experimente mit wässrigen Lösungen von 5-Deaza-FMN (0.2 mM) bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Zuordnung der ^1H -Resonanzen des redoxaktiven Teils vom 5-Deaza-FMN gelang mithilfe von NOESY-Daten (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Die Signale bei etwa 2.25 und 2.4 ppm stammen von den Methylprotonen $\text{H7}\alpha$ bzw. $\text{H8}\alpha$. Im aromatischen Bereich finden sich Resonanzen von H6 , H9 und H5 bei etwa 7.6, 7.7 bzw. 8.6 ppm. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der ^1H -Kerne über einen weiten Bereich von $1 < \text{pH} < 12.5$ ist in Abbildung S2 dargestellt.

Die *tr*-photo-CIDNP- ^1H -NMR-Experimente wurden mit wässrigen 5-Deaza-FMN-Lösungen (0.2 mM) durchgeführt, denen ein 25-facher Überschuss an L-Tryptophan zugesetzt wurde. Die Lichtanregung (420 nm) erfolgte durch Einkopplung eines Nd:YAG/OPO-Lasersystems (Laserpulsdauer: 7 ns; Pulsenergie: 20 mJ; Wiederholrate: 0.2 Hz) in eine optische Quarzglasfaser, die mithilfe eines coaxialen Einsatzes in das NMR-Röhrchen eingeführt wurde. Durch die Zerstörung der thermischen Polarisation mithilfe einer vor dem Laserpuls applizierten Vorsättigungspulssequenz konnten die photo-CIDNP-Differenzspektren direkt aufgezeichnet werden.^[49]

Bei Lichtanregung werden hyperpolarisierte ^1H -Resonanzen sowohl vom 5-Deaza-FMN als auch vom Tryptophan beobachtet. Positive und negative Signale entsprechen emissiven bzw. verstärkt absorptiven Übergängen. Die Signalamplituden und Linienbreiten sind mit denen vergleichbar, die bei der Photoreaktion von FMN und Tryptophan unter entsprechenden experimentellen Bedingungen gemessen wurden.^[44] Die Hyperpolarisation der ^1H -Kernspins im redoxaktiven aromatischen Teil des 5-Deaza-FMNs ist für die Identifizierung der beteiligten Radikale relevant: $\text{H8}\alpha$ und H9 zeigen absorptive Polarisation; emissiv polarisierte Resonanzen werden für H5 , H6 und $\text{H7}\alpha$ beobachtet, siehe Abbildung 2. Die Beobachtung der Hyperpolarisation in Lösungen von 5-Deaza-FMN und Tryptophan liefert einen eindeutigen Beweis für das Auftreten von Radikalspezies dieser Bestandteile, die im Verlauf eines photochemischen Prozesses gebildet werden.

Die Vorzeichen der polarisierten NMR-Resonanzen können mithilfe der Kaptein-Regel interpretiert werden.^[50] Die Nettopolarisation Γ_i ergibt sich aus dem Produkt von vier Vorzeichen und resultiert entweder in einem absorptiven („+“) oder emissiven („–“) Signal:

$$\Gamma_i = \mu \times \varepsilon \times \text{sgn}(\Delta g) \times \text{sgn}(A_{\text{iso},i}). \quad (1)$$

Für einen Triplett-Vorläufer des Radikalpaares ist der Parameter μ „+“; für einen Singulett-Vorläufer hingegen „–“. Abhängig davon, ob das Rekombinations- oder Fluchtprodukt beobachtet wird, ist der Parameter ε „+“ bzw. „–“. Zudem sind weitere Parameter des Radikalpaares relevant: zum einen das Vorzeichen der Differenz der isotropen g -Faktoren der beiden Radikale, $\Delta g = g_{\text{iso},1} - g_{\text{iso},2}$, und zum anderen das Vorzeichen der isotropen Hyperfeinkopplungskonstante $A_{\text{iso},i}$, die die Wechselwirkung des Protonenspins i mit dem ungepaarten Elektronenspin des jeweiligen Radikals beschreibt.

Um zu überprüfen, ob die Kaptein-Regel für die untersuchten Radikalspezies von 5-Deaza-FMN und Tryptophan, die ein Radikalpaar bilden, gilt, wurden die oben genannten

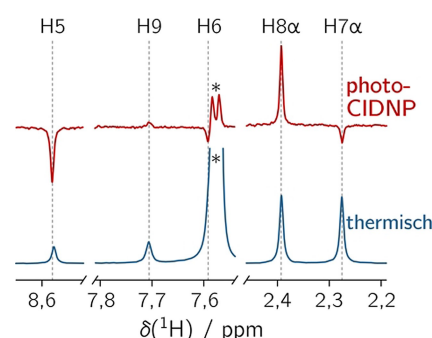


Abbildung 2. Thermisch polarisiertes (blau) und photo-CIDNP- ^1H -Spektrum (rot) von 5-Deaza-FMN bei pH 6.6. Es sind nur ^1H -Resonanzen des aromatischen Teils vom 5-Deaza-FMN, mit Ausnahme der H4 -Resonanz von L-Tryptophan (mit einem Sternchen gekennzeichnet), abgebildet. Für das photo-CIDNP-Experiment wurde die Probe mit Laserimpulsen bei 420 nm belichtet. Alle Resonanzen wurden mithilfe des HDO-Signals bei 4.7 ppm kalibriert.

Parameter wie folgt bestimmt. (i) Da unsere experimentellen Bedingungen die Zeitauflösung auf 2.5 μ s begrenzen, kann die gemessene photo-CIDNP-Polarisation nur auf Rekombinationsprodukte zurückgeführt werden. In diesem Fall ist der Parameter ε positiv. (ii) Die Nettopolarisationen I_i der aromatischen Protonen H8 α und H9 des 5-Deaza-FMN sind positiv, während die Protonen H5, H6 und H7 α negative Nettopolarisationen aufweisen. (iii) In Ermangelung experimenteller Daten wurden die Werte für A_{iso} und g_{iso} der relevanten 5-Deaza-FMN-Radikale mithilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT) berechnet. Hierbei wurden das anionische 5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$ -Radikal und das neutrale, an N1 protonierte 5-Deaza-FMN-Radikal, nachfolgend mit 5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$ bezeichnet, berücksichtigt. Für alle Protonen i des aromatischen Teils des 5-Deaza-FMNs wurde festgestellt, dass $A_{\text{iso},i}$ das gleiche Vorzeichen wie die Polarisierung I_i der jeweiligen CIDNP-Resonanz hat, d.h. $I_i = \text{sgn}(A_{\text{iso},i})$. Folglich ist $\mu \times \text{sgn}(\Delta g) = "+"$. (iv) Für 5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$ und 5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$ wurden g_{iso} -Werte von 2.002752 bzw. 2.002799 unter Verwendung eines polarisierbaren Kontinuum-Modells zur Simulation der Wassersolvatation der Radikale berechnet. Eine weitere Verfeinerung durch Positionierung von H $_2$ O- oder D $_2$ O-Molekülen um den aromatischen Teil der 5-Deaza-FMN-Struktur veränderte diese Ergebnisse nicht wesentlich. Abbildung S3 zeigt die optimierten Strukturen, die für die DFT-Rechnungen verwendet wurden. Alle g_{iso} -Werte und die A_{iso} -Werte der relevanten 1 H-Kerne sind in Tabelle S1 aufgeführt. (v) Für das neutrale Tryptophanylradikal (Trp $^{\bullet}$) wurden g_{iso} -Werte um 2.0026 berichtet,^[51] während für das Tryptophanyl-Kationradikal (TrpH $^{\bullet+}$), das bei einem pH-Wert von 6.6 zu erwarten ist, unseres Wissens keine experimentellen Daten vorliegen. Arbeiten, die auf DFT-Berechnungen basieren, sagen einen Wert von 2.00280 für TrpH $^{\bullet+}$ voraus,^[52] was nahezu identisch ist mit den DFT-berechneten g_{iso} -Werten der beiden 5-Deaza-FMN-Radikalspezies, 5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$ und 5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$. Aus diesem Grund kann $\text{sgn}(\Delta g)$ des 5-Deaza-FMN-Radikals und TrpH $^{\bullet+}$ nicht mit Sicherheit bestimmt werden, da bereits eine kleine Änderung an der zur Simulation verwendeten Geometrie einen positiven oder negativen Wert für diesen Parameter ergeben kann. Auf der Grundlage dieser Daten bleibt der Parameter μ und damit die Multiplizität des Radikalpaarvorläufers zunächst unbestimmt. (vi) Um dieses Problem zu lösen, wurden zusätzliche Hyperpolarisationsexperimente mit einer Mischung aus 5-Deaza-FMN und L-Tyrosin (Tyr) anstelle von Tryptophan unter ähnlichen experimentellen Bedingungen durchgeführt, siehe Abbildung S4. Unabhängig von ihrem Protonierungszustand sind die g_{iso} -Werte von Tyrosin-Radikalen im Allgemeinen größer (≈ 2.0045) als die der beiden betrachteten 5-Deaza-FMN-Radikale,^[53–54] was zu $\text{sgn}(\Delta g) = "-"$ führt. Im Vergleich zu den in Abbildung 2 gezeigten photo-CIDNP-Polarisationen sind alle 1 H-Resonanzen von 5-Deaza-FMN in der Photoreaktion mit Tyrosin invertiert, womit $I_i = -\text{sgn}(A_{\text{iso},i})$ folgt. Dies erfordert $\mu \times \text{sgn}(\Delta g) = "-"$, und folglich $\mu = "+"$. Das nachgewiesene 5-Deaza-FMN-Radikal wird also durch Photoreduktion des Triplettzustands von 5-Deaza-FMN erzeugt. (vii) Da $\mu = "+"$ ist, muss $\text{sgn}(\Delta g) = "+"$ sein, um die erhaltene

Beziehung $I_i = +\text{sgn}(A_{\text{iso},i})$ für die Photoreaktion von 5-Deaza-FMN mit Tryptophan zu erfüllen. Daraus schließen wir, dass die g_{iso} -Werte beider 5-Deaza-FMN-Radikale größer sein müssen als die von Trp $^{\bullet}$ und auch von TrpH $^{\bullet+}$. Demnach ist entweder der mittels DFT vorhergesagte g_{iso} -Wert von TrpH $^{\bullet+}$ (2.00280)^[52] zu groß oder die entsprechenden Werte für 5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$ (2.002752) und 5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$ (2.002799) sind etwas zu klein.

Um die experimentellen relativen A_{iso} -Werte zu extrahieren und den Protonierungszustand des erzeugten 5-Deaza-FMN-Radikals zu charakterisieren, wurden die berechneten A_{iso} -Werte mit den relativen CIDNP-Intensitäten korreliert.^[39] Bei pH 6.6, siehe Abbildung 3, wird eine außergewöhnlich gute Korrelation für die Radikalspezies 5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$ ($R^2 = 0.9899$) und 5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$ ($R^2 = 0.9937$) gefunden. Dies ist ein eindeutiger Beleg für eine einfach reduzierte 5-Deaza-FMN-Spezies, die im Zuge der photoinduzierten Redoxreaktion mit Tryptophan entsteht. Da beide Korrelationen nahe bei 1 liegen, erweist sich die Unterscheidung zwischen protoniertem neutralem (5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$) und anionischem (5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$) Radikal anhand der gemessenen 1 H-Intensitäten als schwierig. Für den pK_s des 5-Deazalumiflavin-Radikals wurde ein Wert von 6 bestimmt,^[4] was auf ein anionisches Radikal bei einem pH-Wert von 6.6 schließen lässt, auch wenn diese Daten nicht direkt auf das 5-Deaza-FMN-Radikal übertragbar sind.

Die so erhaltenen Hyperfeinkopplungskonstanten des 5-Deaza-FMN-Radikals können mit bereits veröffentlichten Daten für neutrale und anionische FMN-Radikale verglichen werden.^[44,55] Die Protonierung von N5 lässt eine eindeutige Unterscheidung der beiden FMN-Radikale durch photo-CIDNP-Messungen zu. Der Vergleich der 1 H-Hyperfeinkopplungskonstanten zeigt, dass das 5-Deaza-FMN-Radikal eher dem anionischen FMN-Radikal ähnelt. Durch die Protonierung von N1 wird die Hyperfeinstruktur des 5-

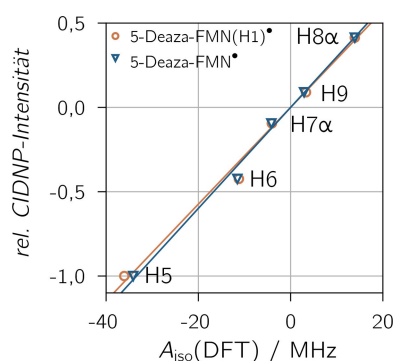


Abbildung 3. Korrelation der relativen 1 H-photo-CIDNP-Intensitäten von 5-Deaza-FMN und der berechneten isotropen Hyperfeinkopplungskonstanten der protonierten und anionischen 5-Deaza-FMN-Radikalspezies (siehe Abbildung S3 für die verwendeten Strukturen). Die CIDNP-Intensitäten wurden aus dem Experiment in Abbildung 2 extrahiert, indem Lorentz- und Gaußfunktionen an die CIDNP-Signale angepasst wurden. Für die lineare Regression wurde eine Ursprungsgerade verwendet. Die Anpassungen ergaben Steigungen von 0.0287 MHz $^{-1}$ und 0.0299 MHz $^{-1}$ sowie R^2 -Werte von 0.9899 und 0.9937 für 5-Deaza-FMN(H1) $^{\bullet}$ bzw. 5-Deaza-FMN $^{\bullet-}$.

Deaza-FMN-Radikals kaum beeinflusst. Der Vergleich der linearen Anpassungen der CIDNP-Experimente bei verschiedenen pH-Werten (siehe Tabelle S2 und Abbildung S6) zeigt, dass das protonierte Radikal 5-Deaza-FMN(H1) \cdot bei pH 1.5 die höchste Korrelation aufweist. Dies stimmt mit dem bekannten pK_s von 6 des Lumiflavin-Analogons und seinem Triplettzustand überein. Bei allen höheren pH-Werten ist jedoch die Korrelation der gemessenen ^1H -CIDNP-Intensitäten mit den A_{iso} -Werten des Radikals 5-Deaza-FMN \cdot^- am höchsten.

Die Ähnlichkeit der beiden Protonierungsstufen des Radikals wird durch ihre einfach besetzten Molekülorbitale (engl.: *singly occupied molecular orbitals*, SOMOs) veranschaulicht, siehe Abbildung 4. Negative und positive Vorzeichen der Wellenfunktionen sind in blau bzw. rot eingefärbt. Eine kleine SOMO-Amplitude wird sowohl für H7 α als auch für H9 beobachtet, was zu kleinen Hyperfeinkopplungen in 5-Deaza-FMN(H1) \cdot und 5-Deaza-FMN \cdot^- führt. Im Vergleich dazu weisen H6 und H8 α eine höhere Amplitude auf. Die größte Amplitude liegt bei H5 vor, was mit der starken Hyperfeinkopplung (A_{iso}) für dieses Proton korreliert: DFT-Berechnungen liefern -34.13 MHz und -35.99 MHz für 5-Deaza-FMN \cdot^- bzw. 5-Deaza-FMN(H1) \cdot . Für alle weiteren Kerne sind die berechneten A_{iso} -Werte für beide radikalische Spezies in ihrer Größe vergleichbar, was die Unterscheidung des Protonierungszustands des Radikals auf der Grundlage von ^1H -photo-CIDNP erschwert. Die Radikale unterscheiden sich jedoch deutlich in der SOMO-Amplitude an N1 und N3. Während das anionische Radikal eine signifikante SOMO-Amplitude für beide Atome aufweist, ist die SOMO-Amplitude an diesen Positionen im protonierten Radikal sehr klein. Auf der Grundlage dieser Berechnungen könnten photo-CIDNP-Experimente mit ^{15}N - sowie ^{13}C -angereicherten 5-Deazaflavinen hilfreich sein, um

eine Aussage über den Protonierungszustand des Radikals zu ermöglichen.

In Bezug auf die Mulliken-Spinpopulationen von 5-Deaza-FMN \cdot^- und 5-Deaza-FMN(H1) \cdot treten für ^1H -Kerne nur geringe Abweichungen auf (siehe Tabelle S5 und Abbildung S7). Ein Vergleich der Spindichteverteilung mit dem neutralen und dem anionischen FMN-Radikal, FMN(H5) \cdot bzw. FMN \cdot^- , zeigt wiederum eine größere Übereinstimmung der beiden 5-Deaza-FMN-Radikale mit dem anionischen FMN-Radikal.

Ein direkter Vergleich der elektronischen Strukturen des in dieser Studie vorgestellten 5-Deaza-FMN-Radikals und des C5-phenylierten 5-Deazaflavin-Derivats^[21] mithilfe von Hyperfeinstrukturdaten wird dadurch erschwert, dass die Protonenkopplungen von H6 und H9 im *cw*-EPR-Spektrum des letzteren nicht aufgelöst sind. Die beiden berichteten Kopplungen wurden zwei Protonen im Phenylring zugeordnet, der an C5 des 5-Deazaflavin-Derivats gebunden ist. Sie haben eine vergleichbare Größe zu den Hyperfeinkopplungen von H6 und H9 im 5-Deaza-FMN-Radikal (siehe Abbildung 3), was darauf hindeutet, dass ein Teil der elektronischen Spindichte im Derivat vom Isoalloxazingerüst auf den Phenylsubstituenten verlagert ist. Ob eine solche Delokalisierung für die Effizienz von 5-Deazaflavinen in der Photokatalyse wesentlich ist, erfordert weitere Untersuchungen, bei denen die Anwendung der photo-CIDNP NMR -Methode besonders hilfreich sein könnte.

Zusammenfassung

Seit der ersten Veröffentlichung über die katalytische Rolle von F_0 ^[56] wurden 5-Deazaflavine ausschließlich als Zwei-Elektronen-Überträger beschrieben. Bezüglich ihrer Redoxreaktivität wurden sie eher Nicotinamiden als Flavinen zugeordnet.^[12,57] Mit dem hier vorgestellten eindeutigen Nachweis eines 5-Deaza-FMN-Radikals durch photo-CIDNP-Experimente wird das Reaktionsspektrum von 5-Deaza-FMN auf Ein-Elektronentransferreaktionen erweitert. Dies wirft letztlich ein neues Licht auf die katalytische Rolle von 5-Deazaflavinen in biologischen Redoxprozessen.

Hintergrundinformationen

Die Autoren haben zusätzliche Referenzen in den Hintergrundinformationen angegeben.^[58–67]

Danksagung

Wir danken Dr. Lars Kuhn für hilfreiche Diskussionen und technische Unterstützung. SW dankt der Landesstiftung Baden-Württemberg und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung von NMR-Geräten, die im MagRes-Zentrum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg betrieben werden. SW und MF danken für finanzielle Unterstützung durch die DFG (Projektnummer 459493567).

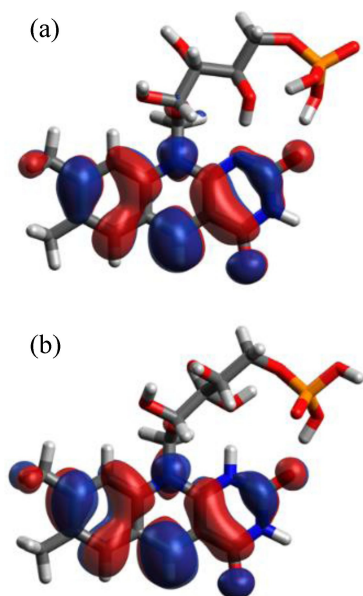


Abbildung 4. SOMO des 5-Deaza-FMN \cdot^- -Radikals (a) und des 5-Deaza-FMN(H1) \cdot -Radikals (b). Negative und positive Amplituden der Grenzorbitale sind blau bzw. rot dargestellt.

WE 2376/12-1 und FI824/13-1). Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

Stichwörter: 5-Deazaflavin-Radikal · Hyperfeinkopplung · Photo-CIDNP · Photokatalyse · Spinkorreliertes Radikalpaar

- [1] P. Hemmerich, V. Massey, H. Fenner, *FEBS Lett.* **1977**, *84*, 5–21.
- [2] H.-J. Duchstein, H. Fenner, P. Hemmerich, W.-R. Knappe, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 167–181.
- [3] M. Goldberg, I. Pecht, H. E. A. Kramer, R. Traber, P. Hemmerich, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *673*, 570–593.
- [4] P. F. Heelis, B. J. Parsons, G. O. Phillips, A. J. Swallow, *Int. J. Radiat. Biol.* **1989**, *55*, 557–562.
- [5] V. Massey, P. Hemmerich, *Biochemistry* **1978**, *17*, 9–17.
- [6] M. Bliese, A. Launikonis, J. W. Loder, A. W.-H. Mau, W. H. F. Sasse, *Aust. J. Chem.* **1983**, *36*, 1873–1883.
- [7] C. T. Walsh, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 1–19.
- [8] M. V. Shah, J. Antoney, S. W. Kang, A. C. Warden, C. J. Hartley, H. Nazem-Bokaei, C. J. Jackson, C. Scott, *Catalysts* **2019**, *9*, 868.
- [9] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 216–221.
- [10] F. Yoneda, K. Tanaka, *Med. Res. Rev.* **1987**, *7*, 477–506.
- [11] C. Greening, F. H. Ahmed, A. E. Mohamed, B. M. Lee, G. Pandey, A. C. Warden, C. Scott, J. G. Oakeshott, M. C. Taylor, C. J. Jackson, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 451–493.
- [12] A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 6242–6269.
- [13] A. P. M. Eker, J. K. C. Hessels, J. van de Velde, *Biochemistry* **1988**, *27*, 1758–1765.
- [14] A. P. M. Eker, P. Kooiman, J. K. C. Hessels, A. Yasui, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8009–8015.
- [15] S. Franz, E. Ignatz, S. Wenzel, H. Zielosko, E. P. G. N. Putu, M. Maestre-Reyna, M.-D. Tsai, J. Yamamoto, M. Mittag, L.-O. Essen, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 8010–8022.
- [16] D. E. Graham, R. H. White, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 133–147.
- [17] T. Jirapanjawan, B. Ney, M. C. Taylor, A. C. Warden, S. Afroz, R. J. Russell, B. M. Lee, C. J. Jackson, J. G. Oakeshott, G. Pandey, C. Greening, *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 6810–6818.
- [18] A. Raoof, P. Depledge, N. M. Hamilton, N. S. Hamilton, J. R. Hitchin, G. V. Hopkins, A. M. Jordan, L. A. Maguire, A. E. McGonagle, D. P. Mould, M. Rushbrooke, H. F. Small, K. M. Smith, G. J. Thomson, F. Turlais, I. D. Waddell, B. Waszkowycz, A. J. Watson, D. J. Ogilvie, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6352–6370.
- [19] C. Marchand, M. Abdelmalak, J. Kankanala, S.-Y. Huang, E. Kiselev, K. Fesen, K. Kurahashi, H. Sasanuma, S. Takeda, H. Aihara, Z. Wang, Y. Pommier, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1925–1933.
- [20] M. M. C. H. van Schie, S. H. H. Younes, M. C. R. Rauch, M. Pesic, C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Mol. Catal.* **2018**, *452*, 277–283.
- [21] A. Graml, T. Nevesely, R. J. Kutta, R. Cibulka, B. König, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3174.
- [22] T. Pavlovska, D. K. Lesný, E. Svobodová, I. Hoskocová, N. Archipowa, R. J. Kutta, R. Cibulka, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202200768.
- [23] Q. Su, P. A. Boucher, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10862–10866.
- [24] S. Hecht, G. Richter, A. Bacher, M. Joshi, W. Römisch, G. Greiner, R. Frank, S. Weber, W. Eisenreich, M. Fischer, in *Flavins and Flavoproteins 2005. Proceedings of the 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins* (Eds.: T. Nishino, R. Miura, M. Tanokura, K. Fukui), ARChitect Inc., Hayama (Japan), **2005**, pp. 569–574.
- [25] M. R. Silva-Junior, M. Mansurova, W. Gärtner, W. Thiel, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1648–1661.
- [26] A. Losi, K. H. Gardner, A. Möglich, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10659–10709.
- [27] A. Losi, W. Gärtner, *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 141–158.
- [28] T. E. Swartz, S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs, R. A. Bogomolni, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36493–36500.
- [29] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, W. R. Briggs, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9401–9410.
- [30] M. Salomon, W. Eisenreich, H. Dürr, E. Schleicher, E. Knieb, V. Massey, W. Rüdiger, F. Müller, A. Bacher, G. Richter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12357–12361.
- [31] S. Crosson, K. Moffat, *Plant Cell* **2002**, *14*, 1067–1075.
- [32] M. Kasahara, T. E. Swartz, M. A. Olney, A. Onodera, N. Mochizuki, H. Fukuzawa, E. Asamizu, S. Tabata, H. Kanegae, M. Takano, J. M. Christie, A. Nagatani, W. R. Briggs, *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 762–773.
- [33] H. Katsura, K. Zikihara, K. Okajima, S. Yoshihara, S. Tokutomi, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 526–530.
- [34] C. Schwerdtfeger, H. Linden, *EMBO J.* **2003**, *22*, 4846–4855.
- [35] L. B. Hersch, M. S. Jorns, J. Peterson, M. Currie, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 865–867.
- [36] J. R. Harmer, *eMagRes* **2016**, *5*, 1493–1514.
- [37] S. van Doorslaer, *eMagRes* **2017**, *6*, 51–70.
- [38] M. Bennati, *eMagRes* **2017**, *6*, 271–282.
- [39] O. B. Morozova, K. L. Ivanov, A. S. Kiryutin, R. Z. Sagdeev, T. Köchling, H.-M. Vieth, A. V. Yurkovskaya, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 6619–6627.
- [40] L. T. Kuhn, *Top. Curr. Chem.* **2013**, *338*, 229–300.
- [41] Y. Okuno, S. Cavagnero, *eMagRes* **2017**, *6*, 283–314.
- [42] G. L. Closs, R. J. Miller, O. D. Redwine, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 196–202.
- [43] A. S. Kiryutin, O. B. Morozova, L. T. Kuhn, A. V. Yurkovskaya, P. J. Hore, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11221–11227.
- [44] N. Pompe, J. Chen, B. Illarionov, S. Panter, M. Fischer, A. Bacher, S. Weber, *J. Chem. Phys.* **2019**, *151*, 235103.
- [45] J. Wörner, J. Chen, A. Bacher, S. Weber, *Magn. Reson.* **2021**, *2*, 281–290.
- [46] M. Goetz, *Top. Curr. Chem.* **2013**, *338*, 1–32.
- [47] M. Goetz, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy, Vol. 66* (Ed.: G. A. Webb), Academic Press, New York, **2009**, pp. 77–147.
- [48] O. B. Morozova, K. L. Ivanov, *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 197–215.
- [49] M. Goetz, K. H. Mok, P. J. Hore, *J. Magn. Reson.* **2005**, *177*, 236–246.
- [50] R. Kaptein, *Chem. Commun.* **1971**, 732–733.
- [51] G. Bleifuss, M. Kolberg, S. Pötsch, W. Hofbauer, R. Bittl, W. Lubitz, A. Gräslund, G. Lassmann, F. Lendzian, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15362–15368.

- [52] R. Pogni, C. Teutloff, F. Lenzian, R. Basosi, *Appl. Magn. Reson.* **2007**, *31*, 509–526.
- [53] E. L. Fasanella, W. Gordy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *62*, 299–304.
- [54] R. J. Hulsebosch, J. S. van den Brink, S. A. M. Nieuwenhuis, P. Gast, J. Raap, J. Lugtenburg, A. J. Hoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8685–8694.
- [55] N. Pompe, B. Illarionov, M. Fischer, A. Bacher, S. Weber, *J. Phys. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 5160–5167.
- [56] F. Jacobson, C. Walsh, *Biochemistry* **1984**, *23*, 979–988.
- [57] G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 403–415.
- [58] D. E. O'Brien, L. T. Weinstock, C. C. Cheng, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 99–105.
- [59] F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.
- [60] F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2022**, *12*, e1606.
- [61] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627.
- [62] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829–5835.
- [63] W. Kutzelnigg, U. Fleischer, M. Schindler, *Deuterium and Shift Calculation*, Springer Berlin, Heidelberg, **1990**, pp. 165–262.
- [64] V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- [65] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546–4553.
- [66] T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *112*, 275–279.
- [67] R. Wagner, S. Berger, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *123*, 119–121.

Manuskript erhalten: 3. Juli 2023

Akzeptierte Fassung online: 12. August 2023

Endgültige Fassung online: 15. September 2023