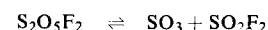


Bei tiefen Temperaturen entsteht vorwiegend Disulfurylfluorid  $\text{S}_2\text{O}_5\text{F}_2$  [27], das Anhydrid der Fluorsulfonsäure, und erst oberhalb  $350^\circ\text{C}$  bildet sich Sulfurylfluorid durch Zersetzung von  $\text{S}_2\text{O}_5\text{F}_2$ :



Die Zersetzung von Fluorsulfonaten in  $\text{SO}_3$  und Metallfluorid tritt dann ein, wenn die Fluoridbildung durch ein besonders stabiles Kristallgitter begünstigt ist.

[27] E. Hayek u. W. Koller, Mh. Chem. 82, 940 (1951).

Eingegangen am 1. April 1965 [A 460]

## Fortschritte in Chemie und Molekularbiologie der Flavine und Flavocoenzyme [1]

VON PRIV.-DOZ. DR. P. HEMMERICH

INSTITUT FÜR ANORGANISCHE CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT BASEL (SCHWEIZ)

PROF. DR. C. VEEGER

BIOCHEMISCHES LABORATORIUM DER LANDWIRTSCHAFTSHOCHSCHULE WAGENINGEN  
(NIEDERLANDE)

UND DR. H. C. S. WOOD

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF STRATHCLYDE, GLASGOW (GROSSBRITANNIEN)

*Es wird versucht, aus neueren chemischen und biochemischen Daten eine Basis für das Verständnis Flavin-(Vitamin-B<sub>2</sub>-)abhängiger Oxydation aufzuzeigen. Diese Übersicht möchte folgendes herausstellen: Die chemischen Eigenschaften der Flavine müssen nach Redoxstufen (Chinonstufe, Radikalstufe, Hydrochinonstufe) differenziert werden, denn bei der Reduktion ändern sich Planarität, Energieinhalt der Tautomerformen, Metall-Affinität usw. drastisch. – Die Methylgruppe an C-8 der Flavochinone ist reaktionsfähig. – Die Elektronentransfer-Eigenschaften des Flavin-Systems hängen oft von der Kopplung an sekundäre Redox-Systeme im Apoprotein ab. Diese Wechselwirkung stabilisiert die halbreduzierte Stufe des Flavins thermodynamisch. – Synthesen in der Dihydrostufe machen zahlreiche neue Flavin-Typen, u. a. stabilisierte freie Radikale, zugänglich. – Das Flavinradikal reagiert nur langsam mit O<sub>2</sub>, solange es nicht disproportionieren kann, d. h. die schnelle Flavin-Autoxydation verläuft über die Dihydrostufe. – Der Flavinkern gewinnt erst durch Aufnahme eines und nur eines Elektrons Affinität zu Schwermetallionen. – Redox-Aktivität und Kontakt mit dem Flavocoenzym sind für die in Flavoproteinen vorkommenden Metalle Fe und Mo sichergestellt. Die Eigenschaften der Metall-Koordinationssphäre werden in erster Linie durch schwefelhaltige Gruppen des Apoproteins bestimmt.*

### I. Einleitung

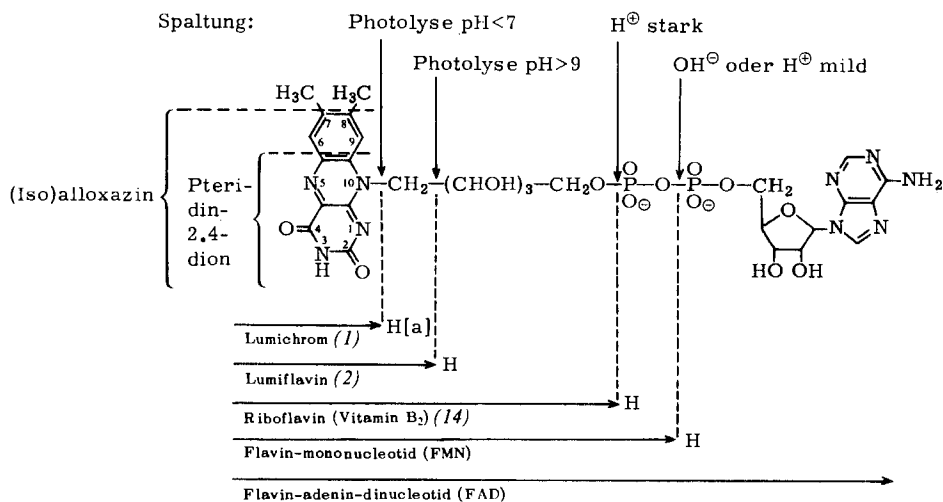
#### 1. Definition und Nomenklatur der Flavine

Flavin ist die Trivialbezeichnung für die chromophore, redox-aktive prosthetische Gruppe einer in Tier- und Pflanzenreich weit verbreiteten Klasse von Atmungs-Enzymen, der Flavoproteine. Die Flavin-Gruppe ist Teil einer nichtproteiden niedermolekularen Enzym-Untereinheit, des Flavocoenzyms, welches von Enzym

zu Enzym sehr verschieden fest am „Apoprotein“ haftet (vgl. Abschnitt VI,1). Die beiden Flavocoenzyme werden zu Unrecht als Flavin-Nucleotide bezeichnet („FMN“ = Flavin-mono-nucleotid, „FAD“ = Flavin-adenin-dinucleotid, Schema 1), denn das Flavin ist in den Flavocoenzymen nicht glykosidisch gebunden. Die saure Hydrolyse läßt daher den Polyhydroxy-Substituenten am Flavin-Kern intakt und führt zum Riboflavin. Dieses älteste bekannte Flavin-Derivat (Warburg und Christian 1932) [3] ging zunächst als Lactoflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) in die Literatur ein.

[1] Vollständige Erfassung der Literatur wird nicht angestrebt; der Leser sei auf andere Darstellungen dieses Forschungsbereichs verwiesen, z. B. P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York-London, Bd. II, 1960, S. 360, Bd. VII, 1963; V. Massey u. C. Veeger, Annu. Rev. Biochem. 32, 553 (1963).

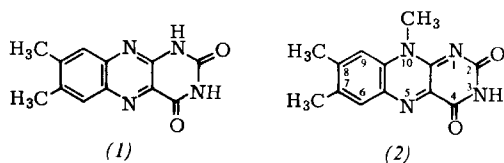
[2] P. Hemmerich in: Mechanismen enzymatischer Reaktionen. 14. Mosbacher Colloquium der Ges. f. Physiologische Chemie, Springer-Verlag, Heidelberg 1964, S. 183; C. Veeger, ibid. S. 157.  
[3] O. Warburg u. W. Christian, Naturwissenschaften 20, 688 (1932).



Schema 1. Zur Nomenklatur der Flavine. [a]: H an N-1.

Riboflavin und FMN sind in verdünnter Lösung sehr lichtempfindlich, im Gegensatz zu FAD (vgl. Abschnitt II,2). Flavin ist ein Redoxsystem, welches durch Lichtabsorption befähigt wird, die eigene Hydroxy-Seitenkette zu dehydrieren. Dieser irreversible Prozeß (Photolyse) kann verhindert werden durch Zugabe exogener Elektronendonatoren, z. B. tertiärer Amine, welche vom lichtaktivierten Flavin (Triplettzustand) leichter angegriffen (dehydriert) werden, so daß nur eine (mit O<sub>2</sub> reversible) Photoreduktion eintritt.

Die Photolyse ist im Sauren bis Neutralen ein Spezialfall der für alle Flavine charakteristischen N-10-Dealkylierung (vgl. Abschnitt II,2). Das Produkt dieser Reaktion, Lumichrom (1), hat keine Flavin-Eigenschaften. Im Alkalischen jedoch führt die Photolyse nicht zur Dealkylierung; die Seitenkette wird nur bis zu einer Methylgruppe abgebaut. Der so erhältliche einfachste



Flavinkörper, Lumiflavin (2), unterscheidet sich in erster Näherung in seinen Spektren sowie den Säuren-Basen- und Redox-Eigenschaften nicht vom nativen Coenzym. Lumiflavin wurde als erstes Flavin synthetisiert (Kuhn und Weygand, 1934) [4].

Aufgrund dieser Synthese aus Alloxan wurde den Flavinen die systematische, aber wenig informative Bezeichnung Isoalloxazine [5] gegeben. Wir verlassen diese Nomenklatur zugunsten von „Benzopteridin“: Dies ist motiviert durch die Biosynthese (vgl. Abschnitt III,2), welche über Pteridine verläuft, und stellt zugleich den Zusammenhang mit Folsäure und Purinen her. Als „Flavine“ verstehen wir im folgenden

[4] R. Kuhn u. F. Weygand, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1409 (1934).

[5] R. Kuhn u. H. Cook, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 761 (1937), haben als erste Bedenken gegen die Nomenklatur „Isoalloxazin“ geltend gemacht. Die Bezeichnung „Flavin“ gibt zwar zur Verwechslung mit Flavin und Flavan Anlaß; diese Verbindungsklassen sind jedoch derart verschieden, daß hieraus kaum schwere Mißverständnisse resultieren können.

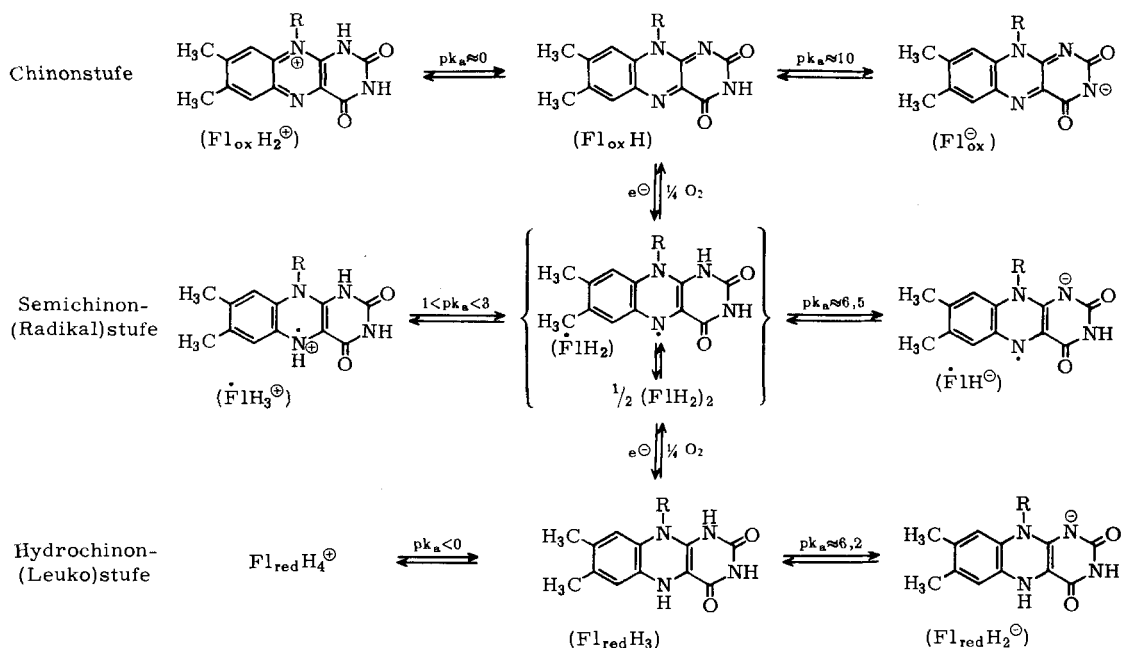
10-alkylierte 2,4-Dione mit dem Benzopteridingerüst, z. B. Lumiflavin (2). Wir bemühen uns damit zugleich, in der Nomenklatur die richtigen Tautomerformen wiederzugeben (vgl. Abschnitt IV, 4).

Lumichrom (1), das Produkt der Flavin-N-10-Dealkylierung, ist der Prototyp einer eigenen Verbindungsklasse („Alloxazine“). Prinzipiell lassen sich Flavine nicht aus Lumichrom durch Alkylierung zurückerhalten. Die von Stern und Holiday [6] gefundene 10-Alkylierung von Alloxazinen läßt sich nur bei Temperaturen ausführen, unter welchen schon die gegenläufige Reaktion einsetzt. Die Methylierung schreitet daher nur bis zu einem stationären Zustand voran, in welchem neben Lumichrom einige Prozent Lumiflavin vorhanden sind.

Die Oxydoreduktion des Flavins ist thermodynamisch reversibel, gleich ob ein oder zwei Elektronen pro Flavin-Molekül transferiert werden. Flavin erfüllt damit die Kriterien eines „chinoiden“ Redox-Systems. Die chemischen Eigenschaften der unter aeroben Bedingungen stabilen Form des Flavins werden oft als repräsentativ für das Gesamtsystem angesehen. Die Chemie der reduzierten, autoxydablen Flavin-Redox-Stufen ist aber davon völlig verschieden. Das Studium des Gesamtsystems erfordert daher zunächst die Differenzierung der Flavin-Oxydationsstufen (Schema 2, Tabelle 1).

Weiterhin ist jede der drei Redox-Stufen des Flavins – für sich genommen – amphoter, obwohl die „isoelektrischen Intervalle“ sich über weite pH-Bereiche erstrecken. Insgesamt sind daher mindestens neun monomolekulare Flavin-Spezies zu unterscheiden, nämlich in jeder Redox-Stufe je ein Kation, Neutralkörper und Anion. Wir benutzen im folgenden die in Schema 2 gegebenen Abkürzungen, also insbesondere „Flavochinon“ für die an der Luft stabile, „Flavosemichinon“ für die radikalische und „Flavohydrochinon“ für die vollständig reduzierte Form. Das Synonym „Leukoflavin“ wird bewußt vermieden, da Flavohydrochinon nur in sehr verdünnter Lösung farblos, unter Umständen aber sogar tiefer farbig erscheint als Flavochinon (vgl. Abschnitt IV, 5).

[6] K. G. Stern u. E. R. Holiday, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1442 (1934).



Schema 2. Das Flavin-Redoxsystem. Strukturen der je nach pH und Redox-Zustand vorkommenden Flavin-Spezies.

Tabelle 1. Absorptionsdaten der Flavin-Spezies aus Abbildung 2.

Verb.	$\lambda_{\text{max}}$ [m $\mu$ ]
$\text{Fl}_{\text{ox}} \text{H}_2^{\oplus}$	390, 264, 222 [a]
$\text{Fl}_{\text{ox}} \text{H}$	446, 370, 270, 230 [b]
$\text{Fl}_{\text{ox}}^{\ominus}$	444, 350, 270, 230 [c]
$\text{Fl}_{\text{H}_3}^{\oplus}$	488, 358, 258 [a]
$\text{Fl}_{\text{H}_2}$	622, 590 (S.) [d], 570 [b]
$\text{Fl}_{\text{H}}^{\ominus}$	612? [g]
$\text{Fl}_{\text{red}} \text{H}_4^{\oplus}$	316, 250 [a]
$\text{Fl}_{\text{red}} \text{H}_3$	$\approx 400$ (S.), $\approx 280$ (S.), 250 [e]
$\text{Fl}_{\text{red}} \text{H}_2^{\ominus}$	$\approx 350$ (S.), 288, 256 [f]
$\frac{1}{2} (\text{Fl}_{\text{H}_2})_2$	$> 800$ [b]

[a] in 6 N HCl; [b] in Phosphat-Puffer bei pH = 7,0; [c] in 2 N NaOH; [d] in  $\text{CHCl}_3$ ; [e] in Sulfat-Puffer bei pH = 2,0; [f] in Borat-Puffer bei pH = 9,0; [g] in  $\text{CHCl}_3$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$  M an Triäthylamin. (S.) = Schulter.

In konzentrierter wäßriger Lösung kommen Flavin-Assoziat (vgl. Abschnitt IV,8) vor, deren Prototyp das „Flavochinhydron“  $(\text{Fl}_{\text{H}_2})_2$  ist. In solchen Assoziaten können auch „Zwischenvalenzen“ auftreten. Es liegen jedoch bisher keine Anzeichen vor, daß solche „Sandwich“-Komplexe biochemisch von Belang sind.

## 2. Funktion des Flavins in Flavoproteinen

Bei den Flavoproteinen gibt es zwei Hauptgruppen: Die eine enthält Eisen (manchmal zusätzlich Molybdän) als essentiellen Cofaktor, die andere ist metallunabhängig.

Die „teleologische“ Frage, wozu das Eisen nötig sei, läßt sich noch nicht mit Sicherheit beantworten. In keinem Fall hat sich jedoch das Metall oder das Flavin aus Eisenflavoproteinen ohne irreversible Deaktivierung abtrennen lassen. Ferner ist sichergestellt, daß Flavin und Eisen zum gleichen aktiven Zentrum gehören und miteinander in direktem Kontakt stehen (vgl. Abschnitt VI,5). Daher erlangt die Frage nach der Flavin-Metall-Wechselwirkung zentrale Bedeutung.

Flavoproteine beider Gruppen [7] können – ebenso wie das freie Coenzym [7a] – mit ihren Substraten in einem Zweielektronenschritt reagieren, welcher offenbar metallunabhängig ist. Da hierbei in manchen Fällen Protonen mit dem Milieu gar nicht oder nur langsam ausgetauscht werden [7], kann man formal von einem „Hydrid-Transfer“ sprechen. Die aufgenommenen Elektronen können vom Flavin nun gleichzeitig, d. h. als „Hydrid-Äquivalent“, oder aber nacheinander, d. h. in Form von zwei Radikal-Elektronen und einem Proton, weitergegeben werden. Vorbedingung des letzten Falls ist eine Stabilisierungsmöglichkeit für die halbrodierte Stufe des Flavins. Die Komplexbildung mit Schwermetall bietet eine solche Möglichkeit (vgl. Abschnitt V, 2), ebenso jede Kopplung mit einem sekundären Redoxsystem von geeignetem Potential, also z. B.  $2\text{RSH} \rightleftharpoons (\text{RS})_2$  (vgl. Abschnitt VI, 4), oder auch die Kopplung mit einer zweiten Flavin-Molekel.

Eine Übersicht der Substrate [Dihydropyridin-nucleotide, Succinat, Dihydroliponamid, Acyl-CoA, Aldehyde (Glucose), Azomethine (Purine), Aminosäuren] zeigt, daß Flavoproteine offenbar nur aktive X–H-Bindungen angreifen können, im Gegensatz zu den pyridin-nucleotid-abhängigen Enzymen. Wesentlich ist weiter, daß sich Flavohydrochinon extrem rasch mit  $\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umsetzt. Diese Reaktion verläuft höchstwahrscheinlich nicht über Radikal-Zwischenstufen, sondern in einem Zwei-Elektronenschritt direkt zum  $\text{H}_2\text{O}_2$  (vgl. Abschnitt IV, 6).

[7] Ph. Strittmatter, J. biol. Chemistry 237, 3250 (1962); O. Gawron, A. J. Glaid, J. Francisco u. T. P. Fondy, Nature (London) 197, 1270 (1963): Die Inaktivität des auf Flavoprotein übertragenen Wasserstoffs ist auffallend, da es sich um eine Stickstoff-Acceptorfunktion (N–5) handeln muß. Es ist zu fragen, ob diese Inaktivität des H-Atoms an N–5 durch das Enzymprotein bedingt oder aber eine Eigenschaft des freien reduzierten Coenzym ist. Modellstudien hierzu werden vorbereitet.

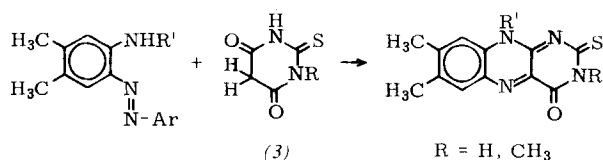
[7a] C. H. Suelter u. D. E. Metzler, Biochim. biophysica Acta 44, 23 (1960).

Flavoproteine nehmen daher eine Schlüsselstellung im Stoffwechsel aller atmenden Organismen ein. Die Vielfalt der Erscheinungen im Bereich der Flavoproteine hat bis in die jüngste Zeit noch wenig Ordnungsprinzipien erkennen lassen. Es ist das Ziel dieses Aufsatzes, eine Brücke zwischen Chemie und Biologie der Flavingruppe zu schlagen.

## II. Synthese und Abbau des Flavin-Kerns

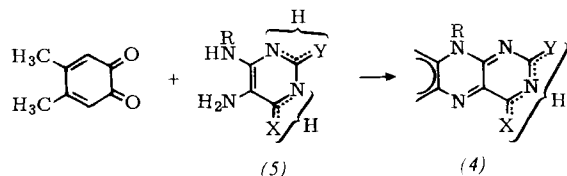
### 1. Fortschritte der Flavinsynthese

Die „klassische“ Flavin-Synthese [4] aus aromatischen o-Diaminen und Alloxan nach *Kuhn* und *Weygand* ist in ihrer Anwendbarkeit äußerst beschränkt, da selbst einfachste funktionelle Derivate des Alloxans kaum zugänglich sind. Überdies wirken Alloxan-Derivate leicht als unspezifische Oxydantien auf Phenylendiamine, weshalb die Ausbeuten nur selten befriedigend sind. Ähnlich wenig variationsfähig ist das heute technisch verwertete Verfahren von *Tishler* und Mitarbeitern [8], bei dem eine Azogruppe durch ein Carbanion gespalten wird. 2-Thiobarbitursäure (3) ist das einzige funktionelle Derivat der Barbitursäure, welches noch auf diese Weise mit annehmbarer Ausbeute umgesetzt werden kann [9].



Das S-Methyl-Derivat von (3) reagiert bereits nicht mehr. Daher waren bis 1956 trotz mancher Versuche [10] noch keine an C-2 oder C-4 funktionell variierten Flavine bekannt. Dies war um so auffällender, da die natürlichen Purine inzwischen als Flavin-„Precursors“ erkannt waren [11]. Faßt man natürliches Flavin als „xanthin-analog“ auf, so war die Frage nach Synthese und Eigenschaften „(iso)guanin-analoger“ [(4) : X, Y = O, NH] sowie streng einwertig an C-4 substituierter Flavine [z. B. (4a)] von Interesse.

Bei den beiden genannten Flavin-Synthesen werden die N-Atome 5 und 10 des Flavinkerns von der homoaromatischen Komponente eingebracht. Den umgekehrten Weg, welcher auch der natürliche ist (vgl. Abschnitt III), beschrieben *Cresswell* und Mitarbeiter [12], welche erstmals 4-Alkylamino-5-amino-pyrimidine (5) zugänglich machten und mit o-Xylochinon umsetzten.



[8] *M. Tishler, K. Pfister, R. D. Babson, K. Ladenburg u. A. J. Fleming, J. Amer. chem. Soc. 69, 1487 (1947).*

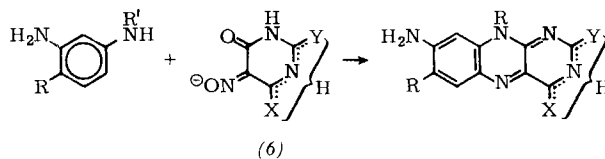
[9] *P. Hemmerich, S. Fallab u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 39, 1242 (1956).*

[10] siehe *G. H. Hitchings: Chemistry and Biology of Pteridines*. (Ciba-Foundation Symposium), Churchill, London 1954, S. 121.

[11] *W. S. McNutt, J. Amer. chem. Soc. 83, 2303 (1961).*

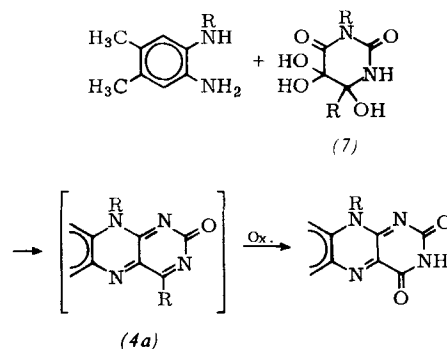
[12] *R. M. Cresswell, Th. Neilson u. H. C. S. Wood, J. chem. Soc. (London) 1961, 476.*

Diese Synthese leidet aber an der Empfindlichkeit beider Startkomponenten und deren Neigung zur Selbstkondensation sowie daran, daß die Äquivalenz der Carbonyl-Funktionen bei asymmetrisch substituierten Chino- nen die Entstehung einheitlicher Produkte verhindert. Diese Schwierigkeiten werden bei der Kondensation von 5-Nitrosopyrimidonon (6) mit aromatischen m-Diaminen umgangen [13].



Die zweite Donorfunktion im Benzolkern, die leider Voraussetzung für die Synthese ist, muß nachträglich entfernt werden. Beim analogen Umsatz von 4-Alkylamino-5-nitrosopyrimidinen mit Phenolen müßte jedoch eine zweite Donorfunktion nicht unbedingt nötig sein, da die o-Stellung eines Phenolats für den Angriff durch Nitrosyl hinreichend aktiviert ist. Unseres Wissens ist diese Reaktion jedoch bisher nicht studiert worden.

Eine Variante der Synthese von *Kuhn* und *Weygand* ist der Ersatz von Alloxan durch „Isodialursäuren“ (7), welche „Des-oxo“-Flavine mit Wasserstoff oder Alkyl an C-4 (4a) liefern sollten. Es konnten dabei jedoch nur 2,4-Dioxo-Produkte, d. h. „normale“ Flavine, erhalten werden [14].



Dies war ein erster Hinweis auf die Instabilität streng einwertiger Reste an C-2 und C-4 des Flavin-Kerns. Die de-novo-Synthese solcher Flavine wurde nicht weiter verfolgt, da diese inzwischen auf andern Wegen zugänglich wurden (vgl. Abschnitt IV).

### 2. Der Flavin-Abbau

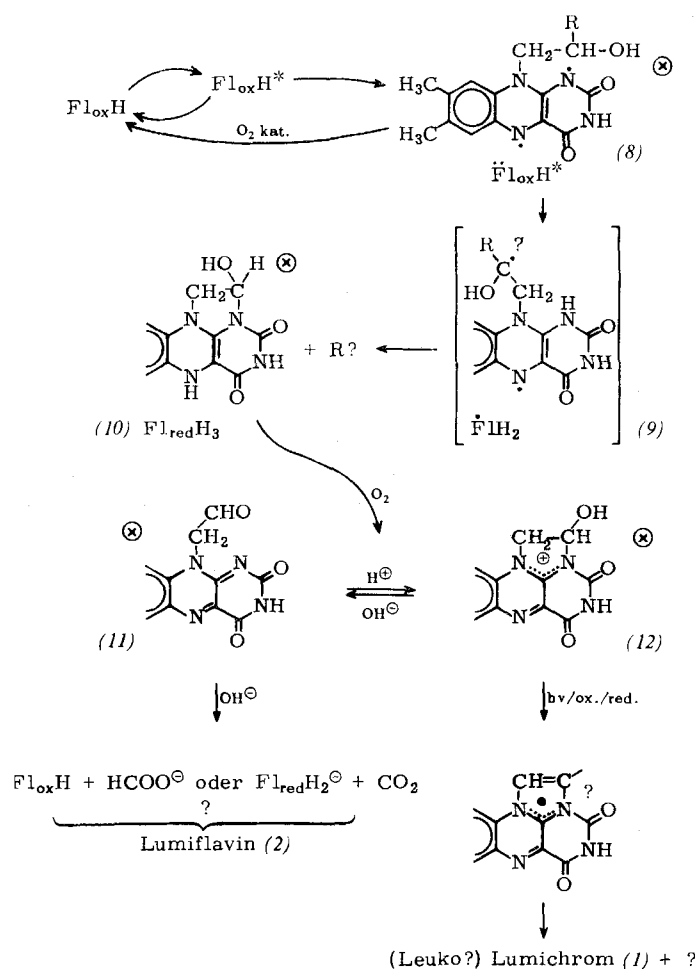
Wie eingangs erwähnt, ist es angebracht, zwischen Flavin-Photolyse und Flavin-Dealkylierung zu unterscheiden. Die jahrzehntelang mit der Riboflavin-Photolyse verknüpften Streitfragen sind kürzlich durch die Arbeitsgruppen um *Moore* und *Spence* [15], *Metzler* [16] und *Holmström* [17] weitgehend geklärt worden (Schemata 3).

[13] *P. Hemmerich, B. Prijs u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 42, 1604 (1959).*

[14] *P. Bamberg, P. Hemmerich u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 43, 395 (1960).*

[15] *W. M. Moore, J. T. Spence, F. A. Raymond u. S. D. Colson, J. Amer. chem. Soc. 85, 3367 (1963).*

[16] *E. C. Smith u. D. E. Metzler, J. Amer. chem. Soc. 85, 3285 (1963).*



Schema 3. Flavin-Abbau. Die Kurzbezeichnungen kennzeichnen nur den Redox-Zustand des Kerns, nicht aber den der Seitenkette. Die mit  $\otimes$  bezeichneten Stufen sind nachgewiesen.

Die Photolyse tritt nur bei solchen Flavinen auf, welche in 2'-Stellung eine HCOH-Gruppierung aufweisen. Die CH-Gruppe in 2'-Stellung (nachgewiesen durch den Deuterium-Effekt, vgl. [15]) reagiert mit dem Flavochinon-Triplet (8) [17], wobei nur ein Elektron mit dem Proton auf den Flavinkern übergeht, welcher danach als Flavosemichinon (9) nachzuweisen ist (Blitzphotolyse, vgl. [18]). Wie sich das zweite ungepaarte Elektron in der Seitenkette primär stabilisiert, ist noch ungeklärt. In Abwesenheit von  $O_2$  erscheint als nächstes Produkt [\*] ein Flavohydrochinon (10), dessen Oxydation nicht thermodynamisch reversibel ist (nachgewiesen durch Polarographie, vgl. [15]) und zum Formylumiflavin (11) führt (= Perjodat-Abbauprodukt des Riboflavins, vgl. [16]). Die thermodynamische Irreversibilität erklärt sich aus dem Gleichgewicht (11)  $\rightleftharpoons$  (12), welches in der reduzierten Form nach rechts verschoben ist. Ähnliche 1-alkylierte Flavine wurden inzwischen in Form von Flavochinonium-perchloraten (vgl. Abschnitt IV) rein erhalten. Mit  $OH^-$  reagiert (11) spontan zu Lumiflavin (2). Ob diese Reaktion rein hydrolytischen Charakter hat (Typ Haloform-Reaktion), d. h. unter quantitativer Freisetzung von Formiat verläuft, ist noch nicht bekannt. Wegen seiner Aldehydfunktion ist (11) in neutraler Lösung noch photolabiler als Riboflavin. Die Formylmethyl-Seitenkette wird durch Luft, aber auch durch Peressigsäure, vollständig eliminiert: Flavin-10-essigsäure konnte intermediär nicht erhalten werden [19]. Ebenso kann (11) aber

[17] Zusammenfassung: B. Holmström, Ark. Kemi 22, 329 (1964).

[18] B. Holmström, Bull. Soc. chim. belges 71, 869 (1962).

[\*] Das „zweite“, bei der Photolyse auftretende Flavin erhielt die Bezeichnung „Deuteroflavin“, welche zur Verwechslung mit „Deuterioflavin“ Anlaß gibt und daher gestrichen werden sollte.

auch reaktiv dealkyliert werden, z. B. mit Zink und Säure, sofern genügend  $O_2$  vorhanden ist, um die Reduktion dauernd auf der Flavosemichinonstufe zu halten [19]. Allgemein gilt: Im schwach Sauren bis Neutralen kann jeder 10-ständige Substituent am Flavosemichinon  $FlH_2$  eliminiert werden [20]. Während die Photolyse eine Disproportionierung am Flavochinon-Triplet (8) ist (die Seitenkette wird dehydriert, der Kern reduziert), ist die Dealkylierung demnach ein (thermischer) Zerfall des Flavosemichinons, welcher vermutlich nach einem Fragmentierungsmechanismus [21] abläuft. Welche Fragmente dabei aus dem 10-ständigen Substituenten entstehen, muß noch quantitativ an Modellflavinen geklärt werden.

Die Photoreduktion jedoch, d. h. die reversible photokatalysierte „Substrat“-Dehydrierung durch Flavin, ist von der Art der Seitenkette ganz unabhängig [17], kann aber stark durch Agentien beeinflusst werden, welche den Energie-Inhalt oder die Lebensdauer des Flavochinon-Triplets ändern können, also z. B. paramagnetische Lösungsgenossen ( $O_2$ , Schwermetallionen) und Ladungstransfer-Komplexbildner (vgl. Abschnitt IV, 8).

### III. Die Flavin-Biosynthese

#### 1. Synthese von Riboflavin aus „Precursor“-Pteridin

Die wesentlichen Züge des Biosynthese-Weges sind in den letzten Jahren geklärt worden, insbesondere dank der Studien von McNutt [11, 22], Masuda [23] und Plaut [24]. In diesem Aufsatz soll die Biosynthese nur so weit diskutiert werden, wie sie zum Verständnis der Flavinchemie als Ganzem beiträgt (Schema 4).

Die Stickstoff-Atome des natürlichen Riboflavins (14) leiten sich von Purin-Nucleotiden (15) her [25–27], während der Dimethylbenzol-Teilkern aus  $C_2$ -Fragmenten aufgebaut wird (Diacetyl oder Acetoin), die ihren Ursprung im Pyruvat haben. Ein wesentlicher Fortschritt war die Isolierung eines aktiven Zwischenprodukts der Flavin-Biosynthese aus *Eremothecium ashbyii* [28, 29], welches sich als ein Pteridin erwies, nämlich 6,7-Dimethyl-8-D-ribityl-lumazin (16).

Überraschenderweise bedarf die enzymatische Überführung des Pteridins (16) in Riboflavin keiner weiteren Kohlenstoff-Quelle. Die Verbindung (16) wirkt demnach sowohl als Donor wie als Acceptor eines  $C_4$ -Fragmentes.

[19] F. Müller u. P. Hemmerich, unveröffentlicht; D. E. Metzler, persönliche Mitteilung.

[20] P. Hemmerich, B. Prijs u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 43, 372 (1960).

[21] Vgl. z. B. C. A. Grob, Experientia 13, 126 (1957).

[22] W. S. McNutt, J. biol. Chemistry 210, 511 (1954); 219, 365 (1956).

[23] T. Masuda, Chem. pharmac. Bull. (Tokyo), 4, 71, 375 (1956); 5, 28 (1957).

[24] Zusammenfassung: G. W. E. Plaut, Annu. Rev. Biochem. 30, 409 (1961).

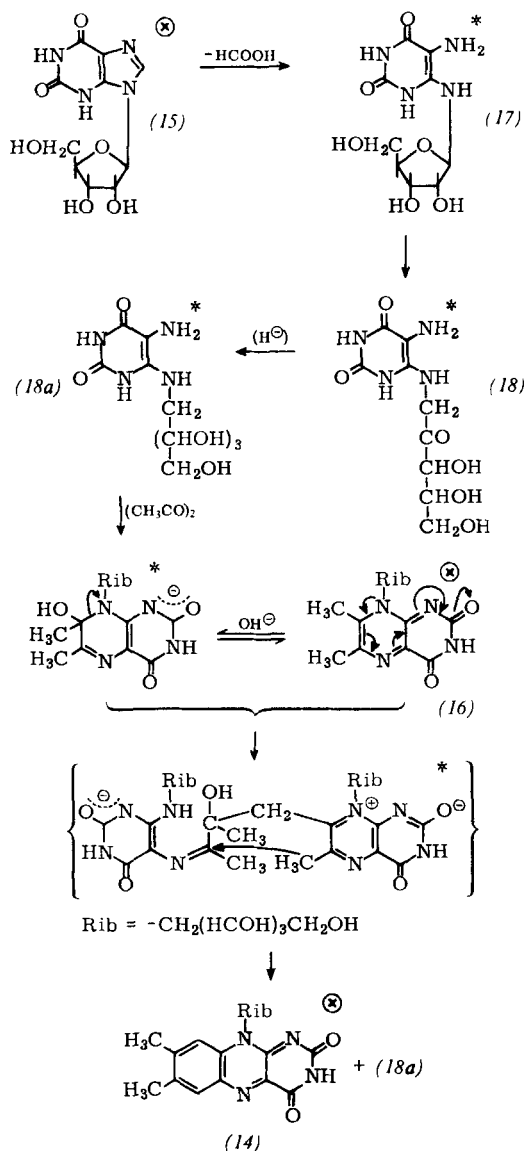
[25] A. J. Birch u. C. J. Moye, J. chem. Soc. (London) 1957, 412.

[26] G. W. E. Plaut, J. biol. Chemistry 211, 111 (1954).

[27] T. W. Goodwin u. D. H. Treble, Biochem. J. 70, 14P (1958).

[28] T. Masuda, T. Kishi, M. Asai u. S. Kuwada, Chem. pharmac. Bull. (Tokyo) 7, 361 (1959).

[29] G. F. Maley u. G. W. E. Plaut, J. biol. Chemistry 234, 641 (1959).



Schema 4. Biosynthese des Riboflavins (14).  $\otimes$ : Nachgewiesene Stufen; \*: Zwischenstufen vorgeschlagen auf Grund von Modellreaktionen.

Am Modell [30] wurde gezeigt, daß „chinoide“ („gekreuzt konjugierte“, vgl. [31]) 8-Alkylpteridone, also z. B. (16), leicht  $\text{OH}^\ominus$  an C-7 anlagern, unter dem Einfluß chelierender Metallionen schon im Neutralen (vgl. Abschnitt V.1), weshalb der Pyrazin-Ringschluß in solchen Pteridinen leicht reversibel ist. Andererseits gehen hyperkonjugierte  $\text{CH}_3$ -Gruppen stark elektrodefizienter Heteroaromaten besonders leicht aldolartige Kondensationen ein, sodaß der Weg von (16) zum Riboflavin kaum zusätzliche Aktivierungsenergie erfordert. Rowan und Wood [32] konnten Riboflavin (14) durch nicht-enzymatischen Umsatz von (16) in wässrigem Phosphatpuffer bei pH=7,3 mit 56-proz. Ausbeute erhalten.

## 2. Biosynthese des „Precursor“-Pteridins (16)

Studien zur Biosynthese von Pteridinen machen folgende Reaktionen wahrscheinlich, welche die Überführung der Ribosyl-Gruppe des „Precursor“-Purins in die für das Flavin benötigte Ribityl-Gruppe betreffen:

- [30] T. Rowan, H. C. S. Wood u. P. Hemmerich, Proc. chem. Soc. (London) 1961, 260.
- [31] W. Pfeleiderer u. G. Nübel, Chem. Ber. 93, 1406 (1960).
- [32] T. Rowan u. H. C. S. Wood, Proc. chem. Soc. (London) 1963, 21.

1. Öffnung des Imidazolrings im Purin (15),
2. Amadori-Umlagerung des 5-Amino-4-ribosylamino-pyrimidins (17),
3. Reduktion des Ketozuckers (18).

Ad 1. ist bekannt, daß Purine nach Blockierung des Elektronenpaares an N-7 leicht alkalisch an C-8 hydrolysiert werden können. Eine solche Blockierung kann in vitro durch Alkylgruppen eintreten [33,34], enzymatisch ist sie auch durch Koordination von Metallionen oder H-Bindungen an N-7 denkbar. Ad 2. kann ein Mechanismus angenommen werden, wie ihn Micheel und Dijong [35] für die Amadori-Umlagerung einfacher Glykosylamine unter Bildung eines intermediären gem-Diamins postulieren. Ad 3. konnten Neilson und Wood [36] zeigen, daß die Reduktion einer Pyrimidylamino-pentulose des Typs (18) sogar in vitro stereospezifisch abläuft, was auf eine spezifische Konformation von Pyrimidylrest und Seitenkette zurückgeführt wird.

## 3. Substratspezifität in der Flavocoenzym-Biosynthese

Die Suche nach Flavin-Antimetaboliten hat bis heute wenig Erfolge gezeitigt. Sofern mit Riboflavin-Analogen überhaupt biologische Wirkungen erzielt werden konnten, wie sie McCormick und Mitarbeiter [38–40] fanden, waren diese auf eine Hemmung der Flavocoenzym-Synthese, also nicht der Flavocoenzym-Funktion, zurückzuführen. Verständlich ist die absolute Spezifität der Ribityl-Seitenkette sowohl für die Flavin-Synthetase [37], welche Reaktion (16)  $\rightarrow$  (14) besorgt, als auch für die Flavo-Kinase [38], welche Riboflavin mit ATP in das 5'-Phosphat überführt. Hingegen ist erstaunlich, daß auch geringste Abwandlungen der Substrat-Kerne die Reaktion mit Flavin-Synthetase und Flavo-Kinase ausschließen, obwohl doch insbesondere die Kinase-Reaktion den heteroaromatischen Kern nicht betrifft. Dies läßt darauf schließen, daß allem Anschein zum Trotz der Flavin-Kern an der Kinase-Reaktion nicht nur sterisch, sondern auch funktionell beteiligt ist. Jedenfalls aber folgt daraus, daß die eigentliche Hemmung der flavinabhängigen Atmung nur mit zuvor phosphorylierten FMN-Analogen getestet werden kann. Ein Flavoenzym, welches reversibel in FMN und Apoprotein zerlegbar ist [39], die NADPH-Cytochrom-c-Oxydoreduktase aus Hefe, wurde bereits untersucht.

Die weitere Biosynthese von FAD aus FMN ist dann nicht sehr substratspezifisch [40]. Auch die Synthese

- [33] J. A. Haines, C. B. Reese u. Lord Todd, J. chem. Soc. (London) 1962, 5281.
- [34] L. B. Townsend u. R. K. Robins, J. Amer. chem. Soc. 85, 242 (1963).
- [35] F. Micheel u. J. Dijong, Liebigs Ann. Chem. 658, 120 (1962).
- [36] T. Neilson u. H. C. S. Wood, J. chem. Soc. (London) 1962, 44.
- [37] C. H. Winestock, T. Aogaichi u. G. W. E. Plaut, J. biol. Chemistry 238, 2866 (1963).
- [38] D. B. McCormick, C. Arsenis u. P. Hemmerich, J. biol. Chemistry 238, 3095 (1963).
- [39] C. Arsenis u. D. E. McCormick, Biochim. biophysica Acta 92, 440 (1964).
- [40] D. B. McCormick, B. M. Chassy u. J. M. C. Tsibris, Biochim. biophysica Acta 89, 447 (1964).

von anderen Flavin-purin-dinucleotiden war daher enzymatisch möglich. Weitere Studien in dieser Richtung könnten die Rolle des ADP-Restes im FAD klären helfen.

#### IV. Strukturchemie des Flavinkerns

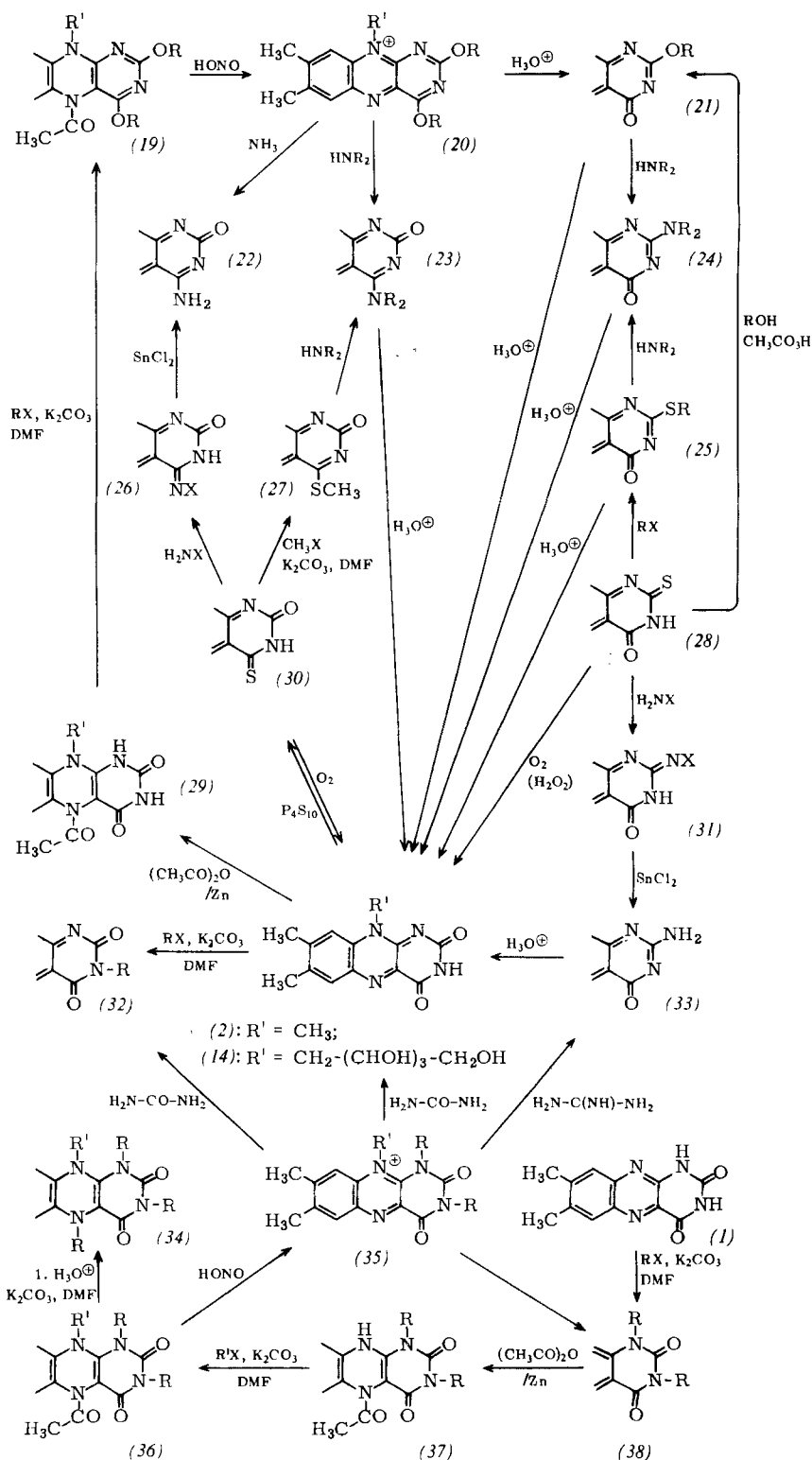
##### 1. Nucleophile Substitution

Der nucleophile Angriff am Flavochinon führt nicht zur Substitution: Bei Reaktionen an den Carbonylgruppen unter solvolytischen Bedingungen wird der stark elektrodefiziente Pyrimidin-Ring geöffnet. Die

Solvolyse ist stets von Reaktionen an der Methylgruppe an C-8 (vgl. Abschnitt IV,2) begleitet. Unter nicht-solvolytischen Bedingungen herrscht diese letzte Reaktion vor. Vor allem Reaktionen mit P-Halogeniden in tertiären Aminen sind daher am Flavochinon nicht möglich.

Die Einführung von Schwefel mit  $P_4S_{10}$  ist scheinbar eine Ausnahme, bei welcher jedoch zunächst eine Reduktion stattfindet [41]: Ganz allgemein wird Flavochinon durch Sulfid (Thiolat) reduziert, wenn auch

[41] P. Hemmerich u. H. Erlenmeyer, *Helv. chim. Acta* 40, 187 (1957).



Schema 5. Substitutionsreaktionen am Flavinkern.

meist sehr langsam [42]. Das entstandene Flavohydrochinon kann dann normal mit  $P_4S_{10}$  umgesetzt werden, wobei der Schwefel selektiv an C-4 eintreten kann (vgl. Schema 5), wie auch im analogen Fall in der Purin- und Pteridin-Reihe [43].

Nucleophile Substitutionen sind aber beim Flavochinon möglich, wenn die 2- (oder 4-)Stellung zuvor „aktiviert“ wurde. Dazu bieten sich zwei Wege an:

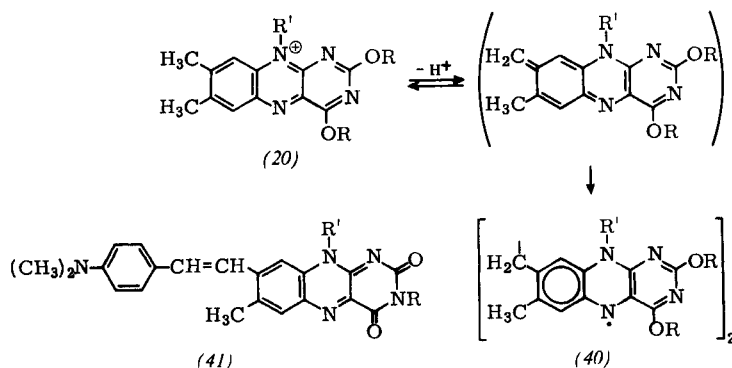
1. Die (indirekte) Alkylierung des Carbonyl-Sauerstoffs unter intermediärer Bildung von „aktiven“ Flaviniminolestern, welche in Abschnitt IV,3 behandelt wird.
2. Der nucleophile Ersatz des „aktiven“ Schwefels in 2-Thio- (28) (vgl. Abschnitt II,1) und 4-Thioflavinen (30) [44] (s. oben). Die Thioflavine haben eher Thiochinon- als Thioamid-Charakter und lassen sich daher schon bei Raumtemperatur mit Carbonyl-Reagentien umsetzen, wodurch Oxime, Hydrazone und Azine des Flavochinons [(26), (31),  $X = OH, NH_2$  bzw.  $N=CHAr$ ] erhalten werden können. Diese tiefvioletten bis blauen Derivate lassen sich meist nur in Form ihrer orangegelben bis braunroten Salze isolieren: Die freien Basen disproportionieren in Lösung allmählich, besonders unter Lichteinfluß, wobei  $=NOH$  oder  $=NNH_2$  dehydriert und der Flavinkern reduziert wird. In Gegenwart von  $O_2$  führt die Reaktion schließlich zu den unsubstituierten Flavochinonen zurück. Ähnlich empfindlich sind die Thioflavine (30) und (28), welche schon bei Raumtemperatur langsam autoxydativ entschweifelt werden.

Die Thioflavine (28) und (30) lassen sich ferner sehr milde S-methylieren (vgl. Abschnitt IV,3). Die entstehenden „Flaviminol-thioester (25) und (27) reagieren nun auch mit schwächeren Nucleophilen, d. h. primären und sekundären Aminen [vgl. Schema 5, (19), (24)], kaum jedoch mit  $NH_3$  [(33)], zu dessen Einführung aber der Weg über die Hydrazone [(26), (31);  $X=NH_2$ ] und Reduktion mit  $SnCl_2$  beschritten werden kann.

Alle nicht oxydablen einwertigen Substituenten an C-2 oder C-4 des Flavochinons lassen sich leicht hydrolytisch entfernen, 4-ständige Substituenten oft schon in neutraler wäßriger Lösung (vgl. Abschnitt IV,3), z. B. in (27) und (20).

## 2. Reaktionen an der Methylgruppe an C-8 des Flavinkerns

Ähnlich wie Vitamin K und Ubichinon [45] verfügt Flavochinon über eine Methylgruppe, deren Reaktionsfähigkeit bisher kaum erkannt wurde. Inzwischen kennen wir aber Flavochinone, nämlich Salze des Typs (20), welche sogar schon



bei  $pH=7$  und Raumtemperatur irreversibel zu den Diradikalen (40) dimerisieren, bevor noch die sehr empfindlichen Iminolester-Funktionen Zeit zur Hydrolyse haben [46]. Es handelt sich um eine (irreversible) Disproportionierung, bei welcher der Substituent oxydiert und der Kern reduziert wird (wie bei der Photolyse).

Die Diradikale (40) reagieren mit überschüssigem Flavochinon oder  $O_2$  zu „Diflavochinonen“. Die gleiche Reaktion tritt bei unsubstituierten Flavochinonen, also z. B. beim Riboflavin, unter stark basischen, nicht-solvolytischen Bedingungen ein ( $HCON(CH_3)_2/(CH_3)_3COK$  oder  $CH_3OH/BaO$ ) oder mit schwächeren Basen ( $K_2CO_3$ ) in der Wärme [47]. Analog kann die Methylgruppe an C-8 eines Flavochinons mit Aldehyden unter Bildung von  $Fl_{ox}-CH=CH-R$  [48], z. B. (41), reagieren. Die  $CH_3$ -Gruppe an C-8 erscheint mindestens ebenso reaktionsfähig wie die  $CH_3$ -Gruppe in Nitrotoluolen und ist daher als funktionelle Gruppe des Flavochinons einzustufen.

## 3. Elektrophile Substitution, Flavin-Iminolester

Die basenkatalysierte Alkylierung des Flavochinons ist nur unter nicht-solvolytischen Bedingungen möglich und nur mit solchen Basen, deren Stärke nicht ausreicht, die „irreversible Dimerisierung“ in Gang zu bringen (vgl. Abschnitt IV,2), also z. B. mit  $K_2CO_3$  in Dimethylformamid bei Raumtemperatur [49]. Sie tritt ausschließlich an N-3 ein (32). Die gleiche Reaktion am Flavohydrochinon – dessen N-5 zunächst durch Acetylierung geschützt werden muß [(29)] – führt jedoch nicht zum erwarteten N-1.N-3-Dialkylderivat (36), sondern zu einem (leicht trennbaren) Gemisch aus dem N-3.O- und dem O.O-Dialkylderivat (19) [20]. N-1 wird also nicht alkyliert, was sicher zuerst auf die Behinderung durch die Alkylgruppe an N-10 zurückzuführen ist; andererseits jedoch sind solche sterisch behinderten N-1-Alkylflavohydrochinone wie (36) über das Lumichrom (1) [20] zugänglich, das normal zur Verbindung (38) N-1.N-3-dialkyliert wird (s. Schema 5). Nachträglich kann das N-10-Alkyl am N-5-Acetyldihydro-Derivat (37) eingeführt werden. Demnach sollte für das Ausbleiben der Substitution am N-1 des Flavohydrochinons (29) zusätzlich eine höhere Elektronendichte am Sauerstoff der 2.4-Dioxo-Gruppen verantwortlich sein. In Übereinstimmung damit sind Flavin-Iminolester in der Hydrochinon-Stufe (19) nur schwer zu hydrolysieren; die Acetylgruppe an N-5 kann selektiv entfernt werden [50]. Setzt man zugleich ein Radikalfänger-Oxydant zu, z. B. HONO, so erhält man aus (19) direkt Dialkylflavochinonium-Salze (35) und (20), aus welchem sich durch Partialhydrolyse der Flavo-

[42] Ph. Ellinger u. W. Koschura, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1411 (1933).

[43] A. G. Beaman, J. chem. Soc. 76, 5633 (1954).

[44] F. Müller, P. Hemmerich u. H. Erlenmeyer, Experientia 18, (1962); P. Hemmerich u. F. Müller, unveröffentlicht.

[45] E. Lederer, Experientia 20, 473 (1964).

[46] K. Dudley, P. Hemmerich u. F. Müller, unveröffentlicht.

[47] P. Hemmerich, B. Prijs u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 42, 2164 (1959).

[48] P. Hemmerich, Helv. chim. Acta 43, 1942 (1960).

[49] P. Hemmerich, Helv. chim. Acta 47, 464 (1964).

[49a] Y. Ogura, S. Nakamura u. T. Nakamura, Acta chem. scand. 17, S 184 (1963).

[50] Bei N.N-Dialkylisomeren fallen die freien Flavohydrochinone, z. B. (42), in tiefgelben, relativ luftbeständigen Kristallen an, vgl. [51].

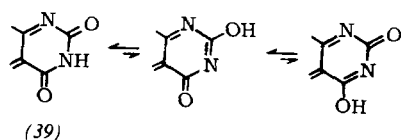


chinon-2-iminolester (21) bilden kann [46,51]. Auch dieser ist noch sehr energiereich, ebenso wie die analogen Thioester (25) (vgl. Abschnitt IV,1). Beispielsweise wird aus dem Thioester (27) bei pH = 2–3 und 20 °C CH<sub>3</sub>SH quantitativ in 30 Minuten eliminiert. Solche Ester unterscheiden sich in ihren Spektren nicht drastisch vom normalen Flavochinon, wohl aber in der Basizität [51].

Bildung und Verseifung der Ester (21) lassen erkennen, daß der Energie-Inhalt der Iminol-Tautomerform bei der Oxydation des Flavohydrochinons zum Flavochinon stark ansteigt (vgl. Abschnitt IV, 4).

#### 4. Carboximid-Iminol-Tautomerie

Die Lage der Tautomeren-Gleichgewichte in den verschiedenen Flavin-Redoxstufen wurde durch Vergleich der sichtbaren, der UV- und IR-Spektren sowie der pK<sub>a</sub>-Werte von O- und N-alkylierten Flavinderivaten untersucht [51]. Übereinstimmend mit dem hohen Energie-Inhalt der Flavochinon-Iminolester (21) (vgl. Abschnitt IV,3) liegt Flavin in der Chinonstufe praktisch vollständig in der Carboximidform (39) vor.



Auch das Flavohydrochinon nimmt vorwiegend die Carboximid-Form an; die Eigenschaften der Flavohydrochinon-Iminolester (19) lassen jedoch eine merkliche Beteiligung der Iminolformen am Gleichgewicht möglich erscheinen.

Auch Thioflavine wie (30) und (28) liegen in der C(S)NH-Form vor; einzig die „Flavimine“ (22) und (33) haben das mobile Proton nicht an N-3; sie müssen daher als Amino-benzopteridone bezeichnet werden. In der Semichinon-Stufe zeigen jedoch N-1-alkylierte Flavine ein von den O-Alkylisomeren und den unsubstituierten Stammkörpern stark abweichendes Verhalten in Stabilität und Spektren [51–53]: Während die neutralen Flavosemichinone O.O- $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$  und O.N-3- $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$  mit N-3- $\dot{\text{F}}\text{IHR}$  und  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  in sichtbaren und ESR-Spektren gut übereinstimmen, konnte ein N-1.N-3- $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$  bisher nicht gefaßt werden, obwohl die protonierten Formen, also  $\dot{\text{F}}\text{IHR}_2^+$  (Kuhnsche „Rhodoflavine“ [54]), sich in allen Fällen normal verhalten ohne Rücksicht auf die Haftstellen der Alkylreste.

O.O- und O.N-3- $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$  werden durch Alkylierung von CHCl<sub>3</sub>-löslichen F<sub>lox</sub>H oder N-3-F<sub>lox</sub>R, z.B. Tetraacetylriboflavin oder 3-Alkylumiflavin (in CHCl<sub>3</sub>/Triäthylamin überschichtet

[51] K. H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Hemmerich u. F. Müller, *Helv. chim. Acta* 47, 1354 (1964).

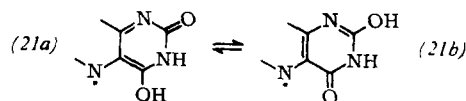
[52] A. Ehrenberg, G. Erikson u. P. Hemmerich in T. E. King, H. S. Mason u. M. Morrison: *Oxidases and Related Redox Systems*. Wiley, New York, im Druck.

[53] P. Hemmerich, F. Müller u. A. Ehrenberg in T. E. King, H. S. Mason u. M. Morrison: *Oxidases and Related Redox Systems*. Wiley, New York, im Druck.

[54] R. Kuhn u. R. Ströbele, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 70, 753 (1937).

mit wäßrigem Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), und partielle Reoxydation mit J<sub>2</sub> erhalten [55]: Tiefgrüne, stark paramagnetische Lösungen, die bei Ersatz des CHCl<sub>3</sub> durch CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O nach blau, bei Säurezusatz nach rot umschlagen. Tiefrotes N-1.N-3- $\dot{\text{F}}\text{IHR}_2^+$  [46] entsteht bei milder saurer Verseifung von (36). Die bei der Neutralisation erhältlich grüne CHCl<sub>3</sub>-Lösung zeigt jedoch keine der optischen Extinktion proportionale Suszeptibilität [51,52]. In wässriger Phase ist die Neutralisation von irreversiblen Folgereaktionen begleitet, die u.a. an N-10 dealkylierte Produkte ergeben [46].

Daher ist ein Gemisch der Mono-Iminol-Formen (21a) und (21b) als wahrscheinlichste Struktur des Flavosemichinons anzusehen. Weitere Studien sind jedoch nötig.



Das Semichinon wäre demnach dem Hydrochinon näher verwandt als dem Chinon, d.h. bei Entnahme eines Elektrons aus dem Radikal entstünde primär ein Flavochinon-Iminol, also eine sehr energiereiche Form des Flavins (der Terminus „energiereich“ bezieht sich in diesem Aufsatz immer auf Hydrolysen-Energie oder prototrope Energie). Dies könnte für die Energiekonservierung bei der biologischen Oxydation von Bedeutung sein.

Bei der Untersuchung aromatischer und heteroaromatischer Systeme interessiert die Verteilung der delokalisierbaren Elektronen. Man verläßt sich dabei oft allzu leicht darauf, daß sich die Verteilung der lokalisierten Elektronen bei Zugabe oder Wegnahme von delokalisierten Elektronen nicht ändere. Auf dieser Annahme basieren fast alle quantenchemischen Studien am Flavin-System.

Wie wir jedoch schon gesehen haben, ändert sich das  $\sigma$ -Bindungssystem des Flavins bei Zugabe eines Elektrons und eines Protons infolge einer Verschiebung, möglicherweise sogar Umkehrung der Energie-Inhalte der prototropen Formen. Einzig Grabe [56] hat dies bisher in MO-Berechnungen berücksichtigt.

#### 5. Stereochemie

Bei Zugabe eines weiteren Elektrons, d. h. beim Übergang vom Semichinon zum Hydrochinon, faltet sich das Flavin-Molekül in der N-5.N-10-Achse (Abb. 1). Dies

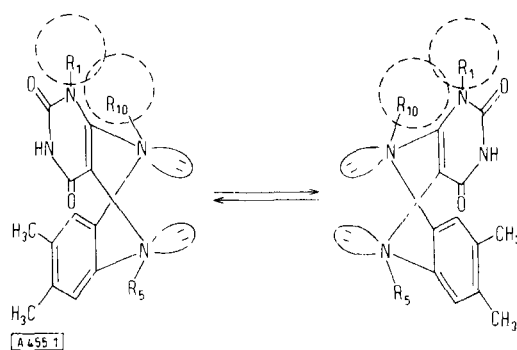


Abb. 1. Stereochemie des Flavohydrochinons: „Schmetterlingsflügel-Konformationen“.

bedeutet, daß die planare Form als angeregter Vibrationszustand beschrieben werden kann. Die Änderung entspricht der „Faltung“ des planaren CH<sub>3</sub>-Radikals beim Übergang in das CH<sub>3</sub>-Carbanion. Für die Faltung des Flavohydrochinons hat man die folgenden Indizien [51]:

[55] P. Hemmerich, unveröffentlicht.

[56] B. Grabe, Dissertation, Universität Uppsala 1960.

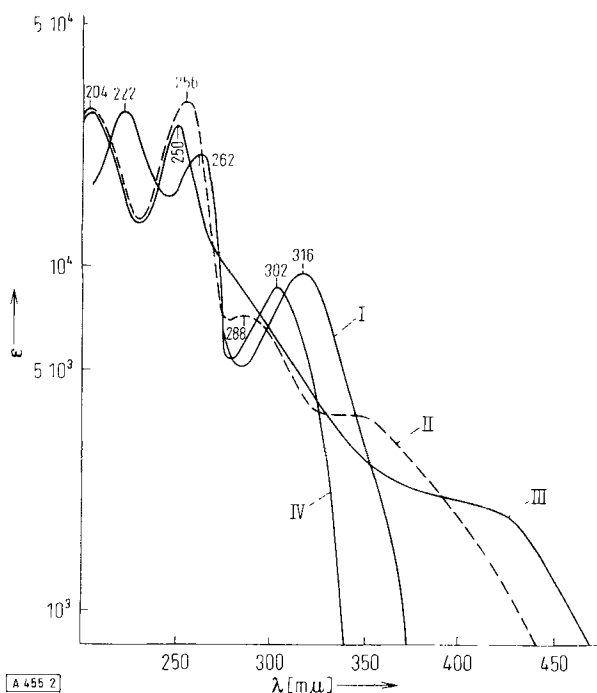


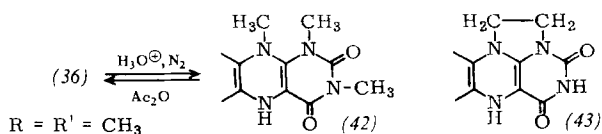
Abb. 2. Elektronenspektren der Flavohydrochinon-Spezies (in  $\text{H}_2\text{O}$ , wenn nicht anders erwähnt), nach [51]. I:  $\text{Fl}_{\text{red}} \text{H}_4^+$ ,  $\text{pH} < 0$ ; II:  $\text{Fl}_{\text{red}} \text{H}_2^+$ ,  $\text{pH} \approx 9$ ; III:  $\text{Fl}_{\text{red}} \text{H}_3$ ,  $\text{pH} \approx 5$ ; IV: (29),  $\text{R}' = \text{CH}_3$ , in  $\text{CH}_3\text{OH}$  (vgl. Schema 2).

1. Das Flavohydrochinon-Spektrum hat eine Schulter bei  $400 \text{ m}\mu$ , welche bei der Protonierung und Deprotonierung ebenso wie bei der Acylierung verschwindet (Abb. 2). Protonierung und Acylierung treten am relativ basischsten Stickstoff-Atom, d.h. an N-5, ein, welches dadurch strenge  $\text{sp}^3$ -Konfiguration annimmt. Die langwellige Endabsorption ist daher ein Maß für die Delokalisation (den p-Charakter) der nichtbindenden Elektronen an N-5, welche im planaren Zustand maximal ist. — Die Schulter bei  $400 \text{ m}\mu$  hat die für einen  $(n, \pi^*)$ -Übergang zu hohe, für einen  $(\pi, \pi^*)$ -Übergang relativ schwache Extinktion von  $\approx 2000 (\text{Mol}\cdot\text{cm})^{-1}$ , d.h. die Orbitalkonfiguration an N-5 ist weder streng planar noch streng tetraedrisch.

2. Führt man N-1-Alkylsubstituenten wie in (42) ein, so tritt eine stark hypsochrome Verschiebung auf, obwohl die direkte elektronische Beeinflussung eines N-heteroaromatischen Systems beim Ersatz von  $\text{>NH}$  durch  $\text{>NR}$  sich höchstens bathochrom auswirken sollte.

Die Alkylsubstitution muß sich demnach sterisch in einer noch stärkeren Begünstigung des gefalteten, nicht coplanaren Zustandes auswirken. Dies entspricht genau der sterischen Behinderung, die bei der Substitution an N-1 und N-10 zu erwarten ist.

Ersetzt man die beiden Methylgruppen an N-1 und N-10 in (42) durch eine  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ Brücke (43), so verschwindet der Effekt wieder [51].



Eine Einebnung des Flavohydrochinons kann auch aus der Bildung von Sandwich-Komplexen resultieren (z. B. in  $\text{FADH}_2$ , vgl. Abschnitt IV, 8).

Nach den grundlegenden potentiometrischen Arbeiten von Michaelis und Mitarbeitern [57] hat Beinert [58] als erster das Problem der Kennzeichnung einzelner Flavin-spezies in Angriff genommen. Er ordnete dem freien

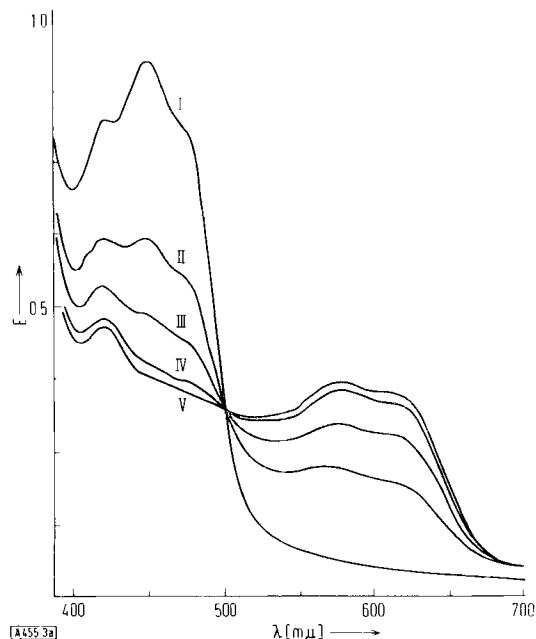


Abb. 3a. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei der Reduktion des metallfreien Flavoproteins [60] aus *Azotobacter vinelandii* mit  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  bei  $\text{pH} = 7,0$  in Phosphatpuffer. Das kinetisch stabile blaue Semichinon wird vom  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ -Überschuß unter diesen Bedingungen nicht weiter reduziert. Zwischen Kurve V (Sättigung) und Kurve I liegen etwa 30 Minuten. Die ESR-Absorption erreicht in derselben Zeit ebenfalls ein stabiles Maximum. — Wir danken Prof. H. Beinert, Madison, für die Erlaubnis zur Vorpublikation dieser Ergebnisse.

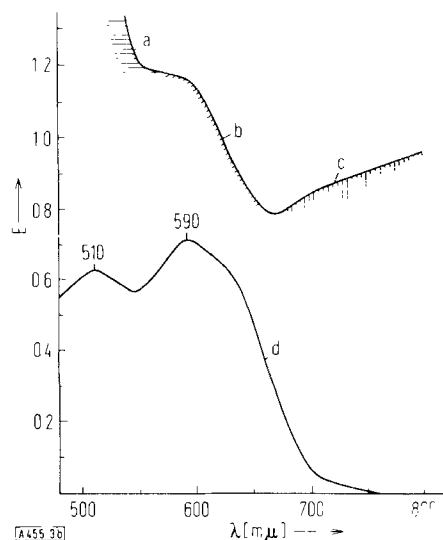


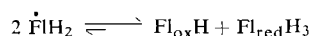
Abb. 3b. Spektrum des halb reduzierten FMN (Gemisch aus FMN,  $(\text{FMNH})_2$  und  $\text{FMNH}$ ) sowie eines nicht dimerisierenden Modells des Typs  $\text{FIR}_2$  in wäßriger Lösung,  $\text{pH} \approx 5$ , nach [51].

a = FMN (Flavochinon)-Anteil  
b =  $\text{FMNH}$  (Flavosemichinon)-Anteil  
c =  $(\text{FMNH})_2$  (Flavochinhydrone)-Anteil  
d = (44).

[57] L. Michaelis u. G. Schwarzenbach, J. biol. Chemistry 123, 538 (1938).

[58] H. Beinert, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

monomeren Radikal  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  die Bande im Bereich 600 m $\mu$ , dem dimeren Flavochinhydron  $(\text{F}\text{H}_2)_2$  die diffuse Absorption im nahen Infrarot zu (Abb. 3a und 3b): Diese Zuordnung wurde an Modellsystemen getestet [50] und erweitert (vgl. Tabelle 1). Das Problem wird kompliziert durch die ungünstige Lage des Disproportionierungsgleichgewichtes

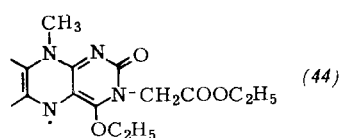


welche im freien halbreduzierten System nur sehr geringe Radikalkonzentrationen zuläßt. Äußerst komplex ist die pH-Abhängigkeit dieses Gleichgewichts [49]. In stark saurer Lösung liegt das System vollständig komproportioniert vor [49a], die Radikalkationen  $\dot{\text{F}}\text{H}_3^+$  (Schema 2) sind daher leicht zu beobachten. Da  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  der weitaus am stärksten basische Flavin-Neutralkörper ist, disproportioniert das System aber bei Neutralisation fast vollständig, solange nicht die Dissoziation  $\text{F}_{\text{ox}}\text{H}_2^+ \rightarrow \text{F}_{\text{ox}}\text{H}$  blockiert ist [z. B. durch Alkylierung in  $\text{F}_{\text{ox}}\text{R}_2^+$  (20)]. Bei physiologischem pH-Wert sind noch fünf der neun in Schema 2 wiedergegebenen Flavin-Spezies zu berücksichtigen, nämlich  $\text{F}_{\text{ox}}\text{H}$ ,  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$ ,  $\dot{\text{F}}\text{H}^+$ ,  $\text{F}_{\text{red}}\text{H}_3$  und  $\text{F}_{\text{red}}\text{H}_2^+$ , da – wie oft übersehen wird – die saure Dissoziation der beiden reduzierten Stufen in diesen pH-Bereich fällt [57]. Die pH-Abhängigkeit der Disproportionierung gehorcht im physiologischen pH-Bereich der Gleichung (a) [49], in der H die Wasserstoff-

$$K(\text{H}) \equiv \frac{[\dot{\text{F}}_{\text{total}}]^2}{[\text{F}_{\text{ox, total}}][\text{F}_{\text{red, total}}]} = \text{Const} \cdot \frac{(1 + \dot{k}/\text{H})^2}{(1 + k_{\text{red}}/\text{H})} \quad (\text{a})$$

ionen-Aktivität und  $\dot{k}$ ,  $k_{\text{red}}$  die sauren Dissoziationskonstanten von  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  bzw.  $\text{F}_{\text{red}}\text{H}_3$  darstellen. Daraus folgt, da  $\text{F}_{\text{red}}\text{H}_3$  etwas saurer ist als  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$ , daß  $K(\text{H})$  gerade im physiologischen pH-Bereich ein Minimum der Radikalkonzentration durchläuft, d. h.  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  ist thermodynamisch und – da die Disproportionierung als Ladungstransfer-Reaktion äußerst rasch abläuft – auch kinetisch instabil. Experimentell wurde dieses Minimum zur gleichen Zeit auch von Ehrenberg [59] ESR-spektroskopisch nachgewiesen. Mit der Bindung des Flavins an das Protein ist natürlich eine erhebliche kinetische Stabilisierung des Radikals verknüpft, sofern das „aktive Zentrum“ neben dem Flavin keine zweite Redox-Funktion enthält, was jedoch sehr oft der Fall ist (vgl. Abschnitt VI).

Ein solches kinetisch extrem stabilisiertes Flavosemichinon wurde kürzlich in einem Flavoprotein aus *Azotobacter vinelandii* gefunden [60]. Abbildung 3a zeigt die sukzessive Änderung des Spektrums bei der Reduktion dieses Flavoproteins mit  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , welche bei pH = 7 zu einem tiefblauen Radikal führt. Damit verglichen wird



[59] A. Ehrenberg, Ark. Kemi 19, 97 (1962).

[60] Y. I. Shethna, H. Beinert u. P. Hemmerich, unveröffentlicht.

das Spektrum eines der ebenfalls tiefblauen Modellradikale O.N-3- $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$  (44) (Abb. 3b, vgl. Abschnitt IV,3) [51]. Beide Radikale, Naturprodukt und Modell, zeigen Proportionalität zwischen ESR-Signalintensität und optischer Extinktion. Beide Radikale können auch nicht zum Chinhydron dimerisieren, das natürliche aus kinetischen Gründen, das synthetische aus thermodynamischen (vgl. Abschnitt IV,8). Damit ist die Beinertsche Zuordnung der Spektren [58] sichergestellt. Beide Radikale reagieren nur langsam mit  $\text{O}_2$  und  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , ein Zeichen, daß diese Agentien schneller mit dem disproportionierten Flavin-System und vermutlich im Elektronenpaar-Transfer reagieren. Die Autokatalyse der Flavohydrochinon-Autoxydation [61] und die bei der Reduktion von Flavoproteinen mannigfach erhältlichen roten Zwischenstufen [62] können daher nicht dem  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  zugeschrieben werden, zumal wenn das einzig erhebliche Kriterium der quantitativen Korrelation von sichtbaren und ESR-Spektren nicht erfüllt ist.

Neben kinetischen müssen jedoch auch thermodynamische Mechanismen zur Stabilisierung der Einelektronenstufe diskutiert werden, z. B. die Metallkomplexbildung (vgl. Abschnitt V,2).

## 7. Spindichte in Flavosemichinonen

Auf Grund des zuvor Gesagten ist das  $\sigma$ -Bindungssystem der vorkommenden Radikalspezies soweit umrissen, daß Rückschlüsse auf die Delokalisation des ungepaarten Elektrons aus der ESR-Hyperfeinstruktur möglich werden. Ehrenberg und Mitarbeiter [52,63] haben durch Einführung von  $^{15}\text{N}$  in Position 1, 3 und 5 sowie von Deuterium an C-6, C-9 und C-10 $\alpha$  eindeutig zeigen können, daß sich in allen Radikalspezies ( $\dot{\text{F}}\text{H}_3^+$ ,  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  und  $\dot{\text{F}}\text{H}^+$ ) das ungepaarte Elektron (oder „hole“) ganz vorwiegend im Phenylendiamin-Teil und nicht im Pyrimidon-Teil des tricyclischen Systems aufhält. Gute Angriffspunkte für radikalische Reaktionen in der Flavinebene bieten daher nur die Positionen 5, 8 $\alpha$  und 10 $\alpha$ . Dies ist im Zusammenhang mit dem flavinkatalysierten Einelektronen-Transfer von wesentlicher Bedeutung (vgl. Abschnitt V,VI). Zusätzlich erhebt sich die Frage, unter welchen Bedingungen Elektronen vertikal zur Flavinebene transferiert werden können (vgl. Abschnitt IV, 8).

## 8. Sandwich-Komplexe

Weber zeigte [64], daß bei Anregung der Adenin-Frequenz im FAD Flavin-Fluoreszenz auftritt, woraus er auf Sandwich-Anordnung der beiden heteroaromatischen Komponenten im FAD schloß. Weitere Studien der Arbeitsgruppen von Harbury [65] und Szent-György

[61] Q. H. Gibson u. J. W. Hastings, Biochem. J. 83, 368 (1962).

[62] Vgl. z. B. K. Yagi u. T. Ozawa, Proc. VI int. Congr. Biochem. New York 1964, IV-200.

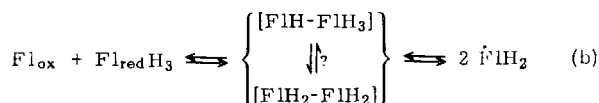
[63] L. F. G. Eriksson u. A. Ehrenberg, Acta chem. scand. 18, 1437 (1964).

[64] G. Weber, Biochem. J. 47, 114 (1950).

[65] H. A. Harbury, K. F. LaNoue, P. A. Loache u. R. M. Amick, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1708 (1959); H. A. Harbury u. K. A. Foley, ibid. 44, 662 (1958).

[66] haben ähnliche Möglichkeiten der „Ladungstransfer“-Wechselwirkung zwischen Flavin und Apoprotein-Funktionen aufgezeigt. Wesentlich ist, daß die Stabilität eines solchen Komplexes nicht zuerst auf dem Energiegewinn beruht, den der Ladungstransfer selbst einbringt. Vielmehr ist für das Zustandekommen eines stabilen Komplexes in verdünnter Lösung die sterisch günstige Fixierung eines Donor-Acceptor-Paares Voraussetzung, welche erst durch die spezifische Tertiärstruktur des aktiven Zentrums oder z. B. durch die kovalente Verknüpfung im FAD gewährleistet wird, oder aber nur in sehr konzentrierter Lösung auftreten kann.

Ladungstransfer-Wechselwirkungen sind um so stärker, je ähnlicher die Skelette von Donor und Acceptor gebaut sind („Selbst-Ladungstransfer“ in Chinhydronen). Die relativ stabilsten Assoziate findet man daher zwischen neutralen oder ungleich geladenen Flavinspezies verschiedener Redoxstufen, wie zuerst *Kuhn* und *Ströbele* [54] an Festkörpern, später *Massey* und Mitarbeiter in (konzentrierten) Lösungen gezeigt haben [67]. Ein solcher Komplex (Gleichung (b)) kann auf zweierlei Art



dissoziieren und könnte daher zunächst als „Radikal-Dimeres“ oder als Ladungstransfer-Komplex aufgefaßt werden. Da das Assoziat diamagnetisch ist, müssen diese beiden Formen tautomer sein. Wie in Abschnitt IV, 4 diskutiert, ergibt  $\dot{\text{Fl}}\text{H}_2$  aber kein stabiles „Dimeres“, so daß  $(\text{FlH}_2)_2 \equiv [\text{FlH}^+ \cdots \text{FlH}_3]$ , d. h. es liegt ein reiner Ladungstransferkomplex vor. Der Vergleich mit  $\dot{\text{Fl}}\text{H}_2$  ist erlaubt, da H-Brücken nicht zur Stabilität solcher Komplexe beitragen [67a].

## V. Die Metallkoordinationschemie des Flavin-Systems

### 1. Metallchelate des Flavochinons („Ladungstransferchelate“)

Die Struktur-Analogie des Flavochinons (50), (53) und des Hydroxychinolins („Oxin“) (45) erweckt den Anschein, es müsse sich beim Flavochinon um einen starken Metallkomplexbildner handeln. Es zeigte sich jedoch, daß die Komplex-Stabilitätsmessungen von *Albert* [68] sowie von *Freiser* und Mitarbeitern [69] nicht auf oxinat-analoge Chelatstrukturen (52) bezogen werden durften [70]. Im Gegensatz zum Pteridin-4-on (46a) (vgl. Schema 6), welches Chelate der Struktur

[66] J. Jsenberg u. A. Szent-György, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 519 (1959).

[67] V. Massey u. G. Palmer, J. biol. Chemistry 237, 2347 (1962); Q. H. Gibson, V. Massey u. N. M. Atherton, Biochem. J. 85, 369 (1962).

[67a] Vgl. z.B. H. A. Staab: Einführung in die theoretische organische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim 1959. S. 696.

[68] A. Albert, Biochem. J. 47, XXVII (1950).

[69] T. R. Harkins u. H. Freiser, J. physic. Chem. 63, 309 (1959).

[70] P. Hemmerich u. S. Fallab, Helv. chim. Acta 41, 499 (1958).

(46b) bildet, reicht beim Riboflavin die Metallaffinität nicht zur Unterdrückung der Metallion-Hydrolyse aus. Auch ist eine Koordinationsbeteiligung der Ribitylseitenkette nicht auszuschließen [70].

Das Ausbleiben einer Wechselwirkung zwischen Flavochinon und zweiwertigen d-Metallionen in verdünnter Lösung wurde inzwischen auch von *Metzler* und *Baarda* [71] sowie von *Radda* und *Calvin* [72] bestätigt. Auch die Verteilung von Lumiflavin zwischen Wasser und Chloroform ist unabhängig von der d-Metallionen-Konzentration bei konstanter Ionenstärke [55].

Um eine mögliche Koordinationsbehinderung durch den anellierten Benzolkern auszuschließen, wurde das dem Flavochinon analog gebaute „Pterochinon“ (47) [73] zum Vergleich herangezogen. Auch dieses Molekül reagiert nicht oxin-analog, d. h. unter Freisetzung von  $\text{H}^+$  mit d-Metallionen, sondern bildet unter Anlagerung von  $\text{OH}^-$  ein „covalent hydratisiertes“ Chelat [(48),  $\text{R} = \text{H}$  oder  $\text{CH}_3$ ], welches sich nicht unzersetzt entwässern läßt.

Überraschend war demgegenüber die spezifische Affinität des  $\text{Ag}^+$  zum Flavochinon [74]:  $\text{Ag}^+$  bildet sehr stabile „oxinat-analoge“ Flavochinon-Chelate. Das Spektrum der Komplexe  $\text{AgFlR}$  (51) und  $\text{AgFl}$  (52) entspricht dem des isoelektronischen Flavosemichinon-Kations  $\dot{\text{Fl}}\text{H}_3^+$ . Wie  $\text{Ag}^+$  bildet auch  $\text{Cu}^+$  (Gl. (c) und Abb. 4) einen valenzmesomeren Komplex.

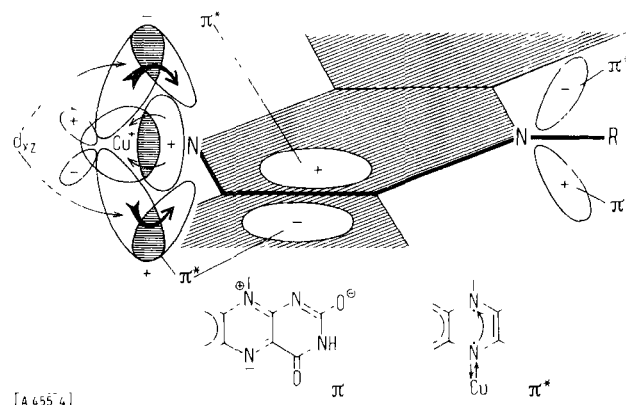
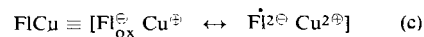


Abb. 4. Molekular-Orbital-Skizze des Metall-Ligand-Ladungstrfers im Flavochinon-Cu(I)-Chelat. Schräg schraffiert: Ebene des Flavin-Kerns. Horizontal schraffiert: Überlappungsbereiche der Metall- und Ligand-Orbitale an N-5 des Flavins, nach [2].



Infolge des Ladungstrfers nimmt der Flavochinon-Ligand in seiner Elektronenverteilung semichinoiden Charakter an. Beim  $\text{FlCu}$  konnte die Chelatstruktur, d. h. die Zweizähigkeit des Liganden, durch Verfolgung der Reaktion (d)



direkt bewiesen werden [75]: Die gefundene quadratische Abhängigkeit von der  $\text{CH}_3\text{CN}$ -Konzentration zeigt, daß  $\text{FlH}$  zwei  $\text{CH}_3\text{CN}$  aus der  $\text{Cu}(\text{I})$ -Koordinationsphäre verdrängt. „Isoflavine“ (57a) reagieren

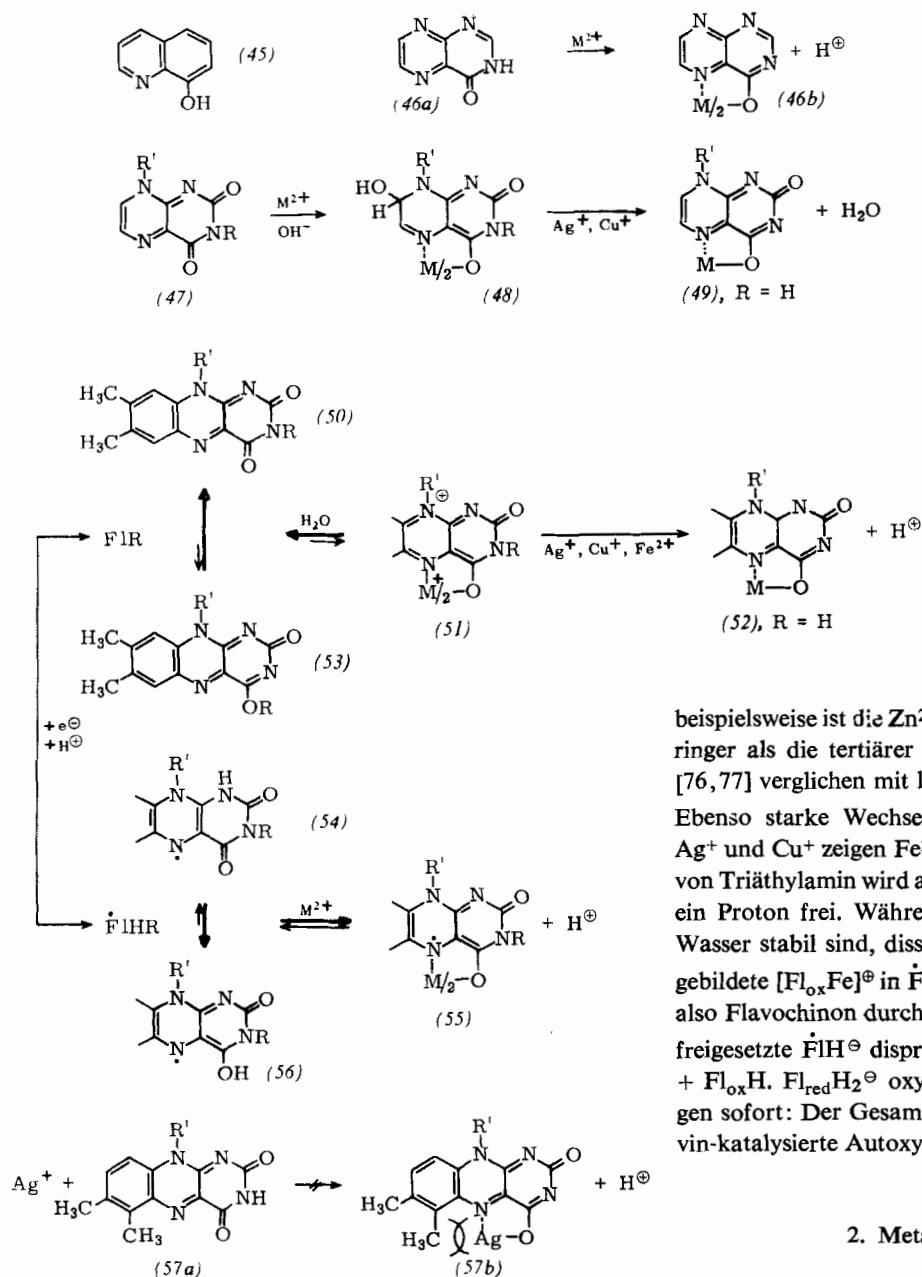
[71] D. E. Metzler u. J. F. Baarda, Biochim. biophysica Acta 50, 463 (1961).

[72] G. K. Radda u. M. Calvin, Biochemistry 3, 384 (1964).

[73] P. Hemmerich in W. Pfeiderer u. E. C. Taylor: Pteridin-Chemistry. Pergamon Press, Oxford 1964, S. 143.

[74] P. Bamberg u. P. Hemmerich, Helv. chim. Acta 44, 1001 (1961).

[75] P. Hemmerich u. C. Sigwart, Experientia 19, 488 (1963).



Schema 6. Metallchelatformung des Flavins und verwandter Systeme.

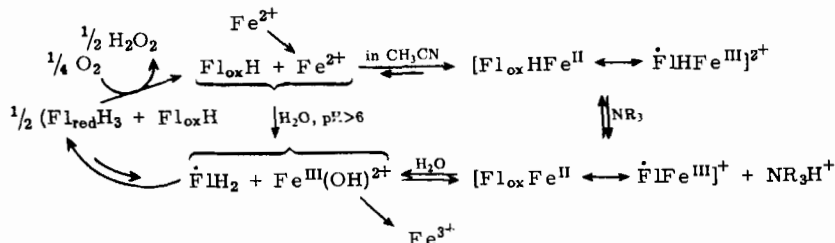
nicht mit  $Ag^+$  oder  $Cu^+$ , wie auf Grund der Komplexstruktur (57b) zu erwarten war, weil die Koordination durch die  $CH_3$ -Gruppe an C-6 behindert ist [74]. Eingehenderes Studium zeigt, daß alle Metallionen nach

beispielsweise ist die  $Zn^{2+}$ -Affinität des Flavochinons geringer als die tertiärer Amine, also  $\log K_{FlZn}^{Zn} \approx 2,0$  [76, 77] verglichen mit  $\log K_{FlAg}^{Ag} = 8,0$  [74].

Ebenso starke Wechselwirkung mit Flavochinon wie  $Ag^+$  und  $Cu^+$  zeigen  $Fe^{2+}$  und  $MoO_3^{+}$ , d. h. bei Zugabe von Triäthylamin wird aus  $FlRM^{n+}$  (51), sofern  $R = H$ , ein Proton frei. Während aber  $FlAg$  und  $FlCu$  gegen Wasser stabil sind, dissoziiert das aus  $Fl_{ox}H$  und  $Fe^{2+}$  gebildete  $[Fl_{ox}Fe]^{+}$  in  $\dot{F}lH^{\ominus} + FeOH^{2+}$ . Insgesamt wird also Flavochinon durch  $Fe^{2+}$  ab  $pH \approx 6$  reduziert. Das freigesetzte  $\dot{F}lH^{\ominus}$  disproportioniert sofort zu  $Fl_{red}H_2^{\ominus} + Fl_{ox}H$ .  $Fl_{red}H_2^{\ominus}$  oxydiert unter aeroben Bedingungen sofort: Der Gesamtvorgang stellt sich dann als flavin-katalysierte Autoxydation des  $Fe^{2+}$  dar (Schema 7).

## 2. Metallchelate des Flavosemichinons

Aus Abschnitt V,1 geht hervor, daß Flavin-Ladungstransferchelate prinzipiell an zwei Dissoziationsgleichgewichten verschiedener Oxydationsstufe partizipieren können. Wir vermuteten nun, daß im Gegensatz zum Flavochinon  $FlH$  das Flavosemichinon  $\dot{F}lH_2$  generelle Metall-Affinität zeigen müsse, denn – wie in Abschnitt



Schema 7. Flavinkatalysierte Autoxydation des  $Fe^{2+}$ .

Maßgabe ihres Ionisationspotentials einerseits und ihrer Hydratationsenergie andererseits unter schärferen Bedingungen, d. h. in wasserfreiem Milieu, mit Flavochinon Chelate bilden [55]. Bei Zugabe einer Base, z. B. Triäthylamin, zerfallen diese schwachen Flavinchelate;

[76]  $K_{AB}^B$  bedeutet die Stabilitätskonstante bezogen auf die Dissoziation  $AB \rightleftharpoons A+B$ ; vgl.: J. Bjerrum, G. Schwarzenbach u. G. Sillén: Stability Constants. Chem. Soc. Publ. No. 6, London 1957.  
[77] J. Bjerrum u. S. Refn, 6. Nordiska Kemistmöte, Lund, 1947, S. 227, zitiert nach [76] S. 51.

IV,6 diskutiert – ist in  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$  die N-Haftstelle stärker basisch als in  $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}$  und die O-Haftstelle nimmt leichter die zur Metallchelatformung benötigte Hydroxy-Form an [vgl. (54), (56)]. Bei der pH-Titration halbreduzierter Flavins [49] findet man nun, daß das Disproportionierungsmaximum bei  $\text{pH} = 7-8$ , gekennzeichnet durch Farbumschlag von olivbraun nach hellgelb, in Gegenwart von beliebigen, nicht oxydierenden d-Metallionen aufgehoben wird, wobei eine Verfärbung nach karminrot unter Freisetzung zusätzlicher Protonen auftritt (Gl. (e)).

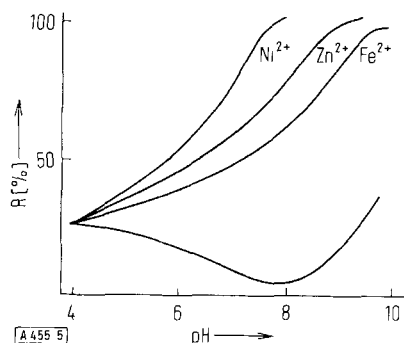
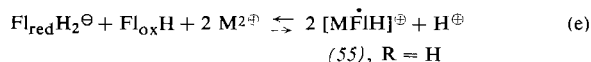


Abb. 5. Schematische Darstellung der pH-Abhängigkeit der Flavosemichinon-Disproportionierung.  $\text{R}$  = Radikal. Untere Kurve: Disproportionierung in Abwesenheit von Metallionen.

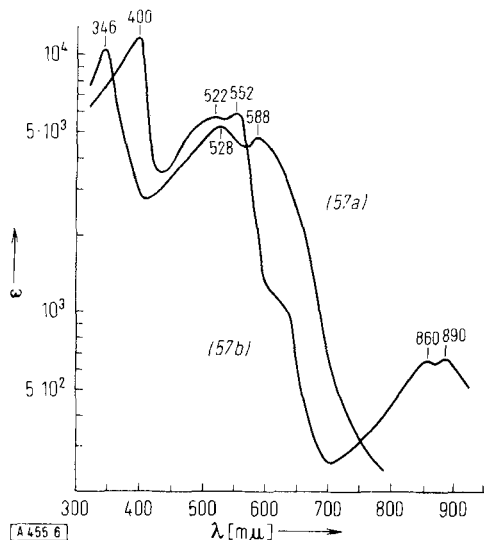
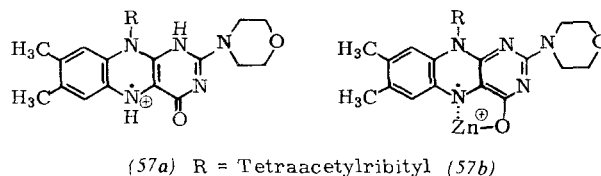


Abb. 6. Spektrum eines zu 100 % ausgebildeten Flavin-Radikalchelats  $\dot{\text{F}}\text{IRZn}^{\oplus}$  (57b), verglichen mit dem Spektrum des isoelektronischen  $\dot{\text{F}}\text{IRH}_2^{\oplus}$  (57a) in  $\text{CHCl}_3$ , nach [80]. Hierzu wird  $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}$  in  $\text{CHCl}_3$  durch Schütteln mit wäßrigem  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  zum  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{RH}_2$  reduziert. Durch Mischung mit einem gleichen Volumen unbehandelter Lösung in Thunberg-Küvetten erhält man einen Reduktionsgrad von 50 %. Man setzt dann entweder einen Tropfen absolute  $\text{HCOOH}$  zu oder 1 Äquivalent  $\text{Zn}$ -Acetat in  $\text{CH}_3\text{CN}$  und 1 Tropfen Triäthylamin. Bei Luftzutritt bildet sich in beiden Fällen sofort und quantitativ  $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}$  zurück.

Abbildung 5 zeigt schematisch die pH-Abhängigkeit der Disproportionierung in Gegenwart und in Abwesenheit von d-Metallionen. In Abbildung 6 wird das typische Spektrum eines solchen „Radikalchelats“ (57b) mit diamagnetischem Zentralion verglichen mit dem des isoelektronischen Radikal-Kations  $\text{FIRH}_3^{\oplus}$  (57a): Die Lage der Hauptbande ist praktisch gleich, die zweite ist beim  $[\text{Zn}\dot{\text{F}}\text{IH}]^{\oplus}$  bathochrom verschoben, da dieses im



Gegensatz zu  $\dot{\text{F}}\text{IH}_3^{\oplus}$  vollständig in der 4-Iminolform vorliegt. Das sichtbare Spektrum der Chelate  $[\text{M}\dot{\text{F}}\text{IH}]^{\oplus}$  ist von der Natur des Metallions praktisch unabhängig, die Stabilitätskonstanten  $K_{\text{FIHM}}^{\text{M}}$  zeigen den normalen [78] Verlauf  $\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$  [49]. Charakteristisch für Radikalchelate wie (55) und (57b) ist eine weitere schwächere Bande im nahen Infrarot [79]. Im Gegensatz zu der sehr diffusen Ladungstransfer-Bande des Flavohydrochinons ( $\text{FIRH}_2$ ), welche sich von 600 bis über 1100  $\text{m}\mu$  erstreckt ( $\lambda_{\text{max}} \approx 1000 \text{ m}\mu$ ), ist die Radikalchelatabande in diesem Bereich sehr scharf. Die Maxima liegen bei  $825 \pm 5 \text{ m}\mu$  für alle zuletzt genannten zweiwertigen Metallionen. Diese Bande ist unabhängig von der Milieu-Polarität und gehorcht dem Beerschen Gesetz [80]. Im Gegensatz dazu weisen die Ladungstransferchelate in diesem Bereich eine intensivere diffuse Endabsorption auf.

$[\text{Zn}\dot{\text{F}}\text{IH}]^{\oplus}$  zeigt im ESR-Spektrum eine völlig andere Hyperfeinstruktur als das freie  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$ . „Radikalchelate“ paramagnetischer Ionen andererseits geben kein ESR-Signal (infolge Spin-Spin-Kopplung?). Die zuerst pH-metrisch gezeigte Komproportionierung (Abb. 5) läßt sich auch durch die 20-fache Erhöhung der ESR-Signalsintensität beim Zusatz von diamagnetischem  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Cd}^{2+}$  zum gepufferten halbreduzierten Flavinsystem nachweisen [81].

Zusammenfassend kann gesagt werden: Flavosemichinon ist die Flavin-Redoxstufe mit der relativ höchsten Metallaffinität, Flavochinon hingegen hat eine absolute Spezifität für Donor-Metallionen. Die Metallkoordination gibt einen thermodynamisch vernünftigen Mechanismus für die Stabilisierung des Radikals durch Komproportionierung.

Beim Flavohydrochinon wurde erwartungsgemäß keinerlei Metall-Affinität festgestellt [53], da die  $\text{NH}$ -Gruppe in Stellung 5 im  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_3$  praktisch keine basischen oder sauren Eigenschaften hat.

## VI. Biochemische Aspekte

### 1. Coenzym-Bindung im Flavoprotein

Im Bereich der Flavoproteine treten Coenzym-Fixierungen extrem verschiedener Stärke auf: Das „Alte Gelbe Ferment“ ist der Prototyp eines reversibel in Coenzym und Apoprotein dissoziierenden Flavoproteins. Theorell

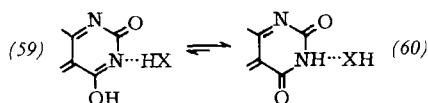
[78] H. Irving u. R. J. P. Williams, Nature (London) 162, 746 (1948); Übersicht: A. E. Martell u. E. Calvin: Die Chemie der Metallchelateverbindungen. Verlag Chemie, Weinheim 1958, S. 168 ff.

[79] A. Ehrenberg u. P. Hemmerich, Acta chem. scand. 18, 1320 (1964).

[80] F. Müller, Dissertation, Universität Basel 1964.

[81] P. Hemmerich, D. V. DerVartanian, C. Veeger u. J. D. W. Van Voorst, Biochim. biophysica Acta 77, 504 (1963).

und Mitarbeiter [82] halten bei diesem Enzym auf Grund biochemischer Daten die Wasserstoffbrücke an N-3 für die wahrscheinlichste Haftstelle des Isoalloxazins. In der Tat ist Position 3 auch nach den hier diskutierten chemischen Indizien die plausibelste Stelle einer gerichteten, reversibel dissoziierbaren Apoprotein-Verknüpfung des Flavinkerns: N-3 ist die einzige Stellung am Kern, deren Eigenschaften in erster Näherung redox-invariant sind. Die Rotverschiebung beim Spektrum des „Alten Gelben Ferments“ ( $\lambda_{\max} = 464 \text{ m}\mu$ ) gegenüber dem des freien Coenzyms (FMN) ( $\lambda_{\max} = 446 \text{ m}\mu$ ) hängt aber damit nicht zusammen (vgl. Abschnitt VI,3). Es erscheint jedoch ausgeschlossen, daß eine H-Brücke an N-3 die Ausbildung der tautomeren Iminol-Form beim Flavochinon begünstigt, vielmehr muß das Gleichgewicht (59)  $\rightleftharpoons$  (60)



auf Grund des in Abschnitt IV,4 Gesagten auch beim enzymatisch gebundenen Flavin als vollständig nach rechts verschoben angenommen werden.

Der bei der Bernsteinsäure-dehydrogenase [83] auftretende entgegengesetzte Extremfall einer bislang unlösbaren Fixierung des Flavocoenzyms an das Apoprotein kann ebenfalls vom chemischen Modell her in seiner Problematik wesentlich eingegrenzt werden: Nach Wang, Wang und Mitarbeitern [84], welche im wesentlichen die gleichen Daten wie Kearney [85] fanden, läßt sich durch enzymatische Proteolyse aus Bernsteinsäure-dehydrogenase ein FAD-Hexapeptid erhalten, aus welchem sich der Adenylsäure-Rest hydrolytisch und der Ribityl-Rest photolytisch entfernen lassen, ohne daß das anhängende Peptid-Fragment abgespalten wird. Weitere (alkalische) Hydrolyse führt zur Aufspaltung des Pyrimidin-Teilkerns im Flavin unter Freisetzung von Harnstoff. Daher kann das Peptid-Fragment weder in 1-, 2-, 3- noch in 10-Stellung am Flavinkern haften. Wang und Wang [84] postulieren daher eine Verknüpfung in Position 4 des Flavinkerns. Die in Abschnitt IV besprochene Chemie 4-substituierter Flavine zeigt aber, daß Substituenten, gleich ob OR, NHR, SR, Aryl oder Alkyl, aus Position 4 des Flavochinons hydrolytisch oder mild oxydativ eliminiert werden können, weshalb Stellung 4 als Anknüpfungspunkt einer fest gebundenen Seitenkette ausgeschlossen werden kann. Eine Substitution in Stellung 5 (N-Quaternisierung) müßte hingegen Spektrum und Redox-Potential des Flavochinons drastisch ändern, so daß nur der homoaromatische Flavin-Teilkern als Verknüpfungsort in Frage kommt: In diesem Zusammenhang ist der funktionelle Charakter der 8-Methyl-Gruppe des Flavochinons zu berücksichtigen (vgl. Abschnitt IV,2), was für die Strukturaufklärung wegweisend sein könnte.

## 2. FMN-FAD-Interkonversion im Flavoprotein

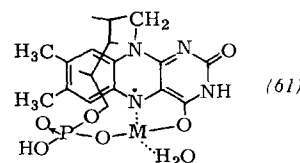
Es steht heute fest, daß beide bisher gefundenen Flavocoenzyme nativ sind. Massey und Swoboda [86] haben zwar geschlossen, daß zumindest mitochondriale Flavoproteine kein FMN enthielten, sondern daß das ge-

[82] Å. Åkeson, A. Ehrenberg u. H. Theorell in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrback: The Enzymes. Academic Press, New York-London 1963, Bd. VII, S. 477.

[83] T. P. Singer u. E. B. Kearney in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrback: The Enzymes. Academic Press, New York-London 1963, Bd. VII, S. 384.

[84] T. Y. Wang, C. L. Tsou u. J. L. Wang, Sci. Sinica 5, 73 (1956); C. L. Tsou, 5. int. Congr. Biochem. Pergamon Press, London 1963, Bd. 5, S. 235.

fundene FMN vielmehr im Laufe der Enzym-Fraktionierung aus FAD entstehe (auf Grund einer Pyrophosphatase-Aktivität der Präparate?). Cremona und Mitarbeiter [87] haben diese Folgerung angegriffen und dem – neben FMN – gefundenen labilen FAD einen nicht-mitochondrialen Ursprung zugeschrieben. Da andererseits in den Elektronen-Transfer-Partikeln (ETP) von Crane und Mitarbeitern [88] kein labiles FAD gefunden wird, muß auch das Postulat von Cremona bezweifelt werden. Fest steht, daß in der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase spezifisch labiles FAD gefunden wird [89]. Das labile FAD entsteht also erst bei der weiteren Fraktionierung von ETP, so daß ein Zusammenhang zwischen FMN-FAD-Interkonversion und Enzymaktivität in diesem Fall nicht ausgeschlossen ist. Da die PO-Gruppen sich an der Metall-Koordination in Flavinchelaten beteiligen können [siehe z. B. (61)],



sollte eine Autokatalyse der FAD-Spaltung durch das Enzym-Eisen immerhin erwogen werden [2], sei es, daß sie im nativen Enzymkomplex oder nur „artifiziiell“ im fraktionierten Enzym aufträte.

## 3. Rote Redox-Zwischenstufen im Flavoprotein

Rotverschiebungen der Flavin-Hauptbande wurden in sehr vielen Fällen bei Flavoproteinen beobachtet, so zuerst von Haas [90] bei der Reduktion des „Alten Gelben Ferments“ mit Dihydropyridin-nucleotid. Grundsätzlich ist es nicht zulässig, in solchen Fällen auf Radikal-Zwischenstufen zu schließen, solange nicht eine quantitative Korrelation der Absorption im Sichtbaren und der ESR-Absorption erstellt wurde.

Wie in Abschnitt IV gezeigt, ist die einzige rote Radikalspezies beim metallfreien Flavin das Kation  $\text{FlH}_3^+$ . Dieses Kation ist im freien Zustande so stark sauer, daß seine Stabilisierung bei  $\text{pH}=7-8$  durch Enzymprotein höchst unwahrscheinlich ist. Eine Stabilisierung gelingt aber in den Flavin-Metallchelaten, welche daher rot sind (vgl. Abschnitt VI). Solche Chelate können jedoch nur bei diamagnetischen Zentralionen von Übergangsmetallen ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) als „Radikale“ angesprochen werden [81]. Dieser Fall ist nur bei den von Gregolin und Singer [91] beschriebenen Zn-Flavoproteinen möglich.

In vielen anderen Fällen ist offenbar der Radikalgehalt roter Zwischenstufen nur eine – möglicherweise artifizielle – Bei-

[85] E. B. Kearney, J. biol. Chemistry 235, 865 (1960).

[86] V. Massey u. B. E. P. Swoboda, Biochem. Z. 338, 474 (1963).

[87] T. Cremona u. E. B. Kearney, Nature (London) 200, 542 (1963).

[88] F. L. Crane, J. L. Glenn u. D. E. Green, Biochim. biophysica Acta 22, 475 (1956).

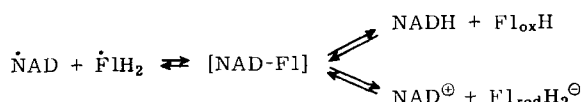
[89] Z. Kaniuga, Biochim. biophysica Acta 73, 550 (1963); Z. Kaniuga u. C. Veeger, ibid. 77, 339 (1963).

[90] E. Haas, Biochem. Z. 290, 291 (1937).

[91] C. Gregolin u. T. P. Singer, Biochim. biophysica Acta 67, 201 (1963).

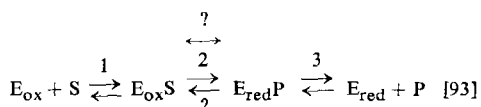
mischung einer geringen Menge freien Flavin-Radikals, welche im Spektrum nicht ins Gewicht fällt. Dies gilt vor allem für kristallisierte Präparate, in welchen ein thermodynamisch instabiler Radikalanteil „eingefroren“ sein kann [62].

Allgemein können jedoch, wie in Abschnitt IV,8 erörtert, Rotverschiebungen beim Flavochinon in Sandwich-Komplexen eintreten. Ein solcher Komplex ist offenbar das (NAD-Fl) im „Alten Gelben Ferment“ [90,92]. Diese Komplexe sind diamagnetisch, können aber unter Umständen leicht in Radikale dissoziieren. Der Valenzzustand der Partner in solchen Komplexen kann, wenn überhaupt, nur mit physikalischen Mitteln festgestellt werden: Grundsätzlich stehen drei Dissoziationswege offen, z. B.



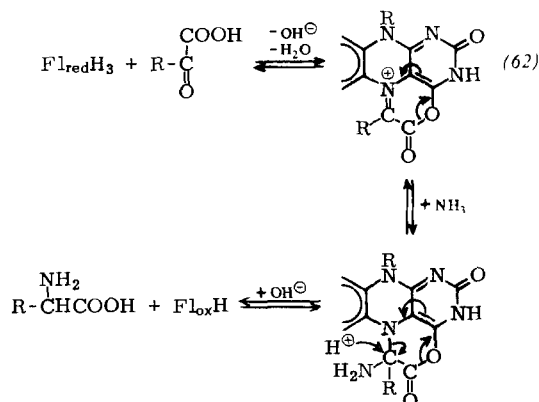
Gleichgewichtslage oder Kinetik der Dissoziationen erlauben keine einwandfreien Rückschlüsse auf die molekulare Struktur dieser Komplexe.

Bei Redox-Katalysen, wie sie Flavoproteine zeigen, bleibt für jede Enzymreaktion die Frage offen, ob Schritt 2 der Reaktionsfolge



überhaupt eine chemische Reaktion und nicht etwa nur eine Änderung der Ladungsverteilung (Mesomerie) bezeichnet. (Dies ist z. B. der Fall für  $\text{S} = \text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{P} = \text{Fe}^{3+}$  (vgl. Abschnitt V).)

Neben Sandwich-Komplexen und Metallchelaten sind aber bei Flavinen auch rote Zwischenstufen denkbar, in welchen die Bindung  $\text{E}_{\text{ox}}$ -Substrat oder  $\text{E}_{\text{red}}$ -Produkt rein covalent formuliert werden kann: So erhält man z. B. [94] einen roten  $\text{E}_{\text{red}}\text{P}$ -Komplex mit  $\alpha$ -Aminosäure-Oxydase ( $\text{P} = \alpha$ -Ketosäure), für den man die Struktur eines cyclischen Flavohydrochinon-azomethinium-Salzes (62) vermuten könnte. Nach dem in Abschnitt IV,5 Gesagten muß es sich hier um ein resonanzstabilisiertes, coplanares Derivat des Flavohydrochi-



nons handeln, für welches eine relativ intensive Absorption um 500 m $\mu$  zu erwarten wäre, und das in  $\text{E}_{\text{ox}} + \text{Substrat}$  ebenso wie in  $\text{E}_{\text{red}} + \text{Produkt}$  zerfallen kann, während Dissoziation in Radikale kaum zu erwarten ist, es sei denn durch artifizielle (photo)chemische Eingriffe [94]. – Dieses rein spekulative Schema soll nur zeigen, daß nicht unbedingt „nichtklassische“ Bindungstypen zur molekularen Erklärung solcher Reaktionen herangezogen werden müssen.

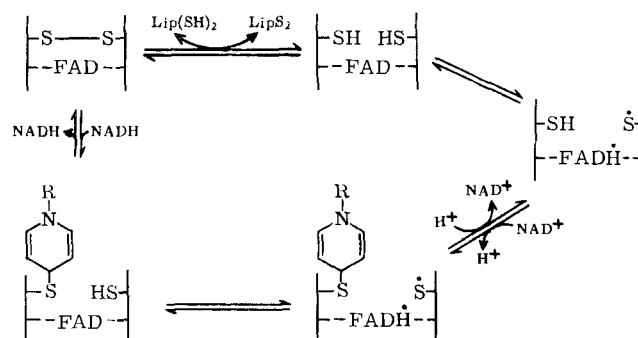
Eine dritte Möglichkeit zur Erklärung roter Zwischenstufen ist indirekt: Die Reaktion mit einem Substrat oder Inhibitor kann die Tertiärstruktur des aktiven Zentrums derart ändern, daß die Umgebung des Flavins lipophileren Charakter annimmt. Diese Polaritätsänderung des Milieus kann erhebliche Rotverschiebungen bei z. B. benzollöslichen Derivaten des freien Coenzyms mit unverändertem Flavochinon-Chromophor ergeben [51, 65].

Rote Zwischenstufen findet man auch bei Flavoproteinen, die redoxaktive Thiolgruppen enthalten (Abschnitt VI,4) und bei Metall-Flavoproteinen, welche auch im aeroben Ruhezustand schon rot sind, was vorwiegend auf die Eisen-Protein-Bindung zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt VI,5).

Es sei daran erinnert (Abschnitt IV,4), daß Flavosemichinon  $\dot{\text{FlH}}_2$  auch in proteingebundener Form blau ist. Umstritten ist aber nach wie vor die optische Absorption des Radikal-Anions  $\dot{\text{FlH}}^{\ominus}$ . Da die Dissoziation  $\dot{\text{FlH}}_2 \rightleftharpoons \dot{\text{FlH}}^{\ominus} + \text{H}^{\oplus}$  jedoch an N-1 eintritt, ist ein bathochromer Effekt zu erwarten;  $\dot{\text{FlH}}^{\ominus}$  sollte daher nicht rot sein.

#### 4. Kontakt Flavin-Schwefel in Flavoproteinen

Wie erstmals Massey und Veeger [95] an der Liponamid-Dehydrogenase ( $\equiv$  Straubs „Diaphorase“) nachwiesen, kann das System  $2 \text{RSH} \rightleftharpoons (\text{RS})_2 + 2 \text{H}$  als korrespondierendes Redox-System bei der Flavin-oxydoreduktion mitwirken, d. h. es ist ein Cysteinrest pro Flavin am aktiven Zentrum der Liponamid-Dehydrogenase und offenbar auch anderer Flavoproteine beteiligt [95–97]. Bei der Reduktion mit Dihydroliponamid oder NADH entstehen rote, offenbar diamagnetische, stabile Intermediärformen des Enzyms. Weitere Reduktion zum



Schema 8. Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Reaktion, vereinfachtes Schema, nach [95]. NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid. Prothetische Gruppen mit Punkt bezeichnen Radikal-Oxydationsstufen, jedoch nicht paramagnetische Spezies; der Gesamtspin ist jeweils null.

[92] A. Ehrenberg u. G. D. Ludwig, Science (Washington) 127, 1177 (1958).

[93] S = Substrat, E = Enzym, P = Produkt.

[94] V. Massey u. Q. H. Gibson, Federat. Proc. 23, 18 (1964).

[95] V. Massey u. C. Veeger, Biochim. biophysica Acta 48, 33 (1961).

[96] V. Massey in [1], Bd. VII, S. 275.

[97] R. L. Searls, J. M. Peters u. D. R. Sanadi, J. biol. Chemistry 236, 2317 (1961).



Flavohydrochinon kann durch NADH nur bewerkstelligt werden, wenn das Produkt  $\text{NAD}^+$  aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Das Enzym ist unter diesen Umständen nicht mehr aktiv. Dihydroliponamid kann hingegen das Enzym nicht bis zur  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_3$ -Stufe reduzieren. Massey und Veeger [95] geben die in Schema 8 dargestellte strukturelle Deutung der Reaktion. Die Natur der Wechselwirkung  $\text{Fl-S}$  bleibt Objekt der Spekulation, keinesfalls aber können den Partnern eines ( $\text{FlS}$ )-Komplexes vorläufig Oxydationsstufen zugeordnet werden, vor allem aber kein Radikal-Charakter.

Gemeinsam ist offenbar den metallhaltigen und metallfreien Flavoproteinen, daß die vollständige Reduktion zur Flavohydrochinonstufe im nativen System unter Umständen gar nicht aufzutreten braucht. Beide Enzymtypen unterscheiden sich aber insofern, als in den Metallflavoproteinen auch Einelektronen-Schritte möglich sind, wobei vermutlich der Übergang zum oxydierten Zustand, welcher eine Dissoziation des Metallkomplexes impliziert, erschwert ist. Eine solche Stabilität wurde am Modell des Peracetylriboflavin-Cu(I)-Ladungstransferchelats gefunden [55], welches sich mit  $\text{O}_2$  in wasserfreiem Milieu nur sehr langsam oxydieren läßt.

## 5. Kontakt Flavin-Metall in Flavoprotein

Metallflavoproteine enthalten Eisen und in einigen Fällen zusätzlich Molybdän. Das Verhältnis Flavin:Mo ist meist 1:1, während für das Verhältnis Flavin:Fe je nach Enzym Werte von 1:1 bis 1:4 [98] und mehr gefunden werden. Aus allen Eisenflavoproteinen außer der Bernsteinsäure-Dehydrogenase läßt sich das Flavocoenzym herauslösen, jedoch nicht reversibel. Die verbleibenden Eisenproteine lassen sich demzufolge nicht mehr mit dem Flavoproteinsubstrat, sondern nur artifiziell ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ ) reduzieren. Sie behalten jedoch, wie zuerst Handler und Mitarbeiter [98] zeigten, ihre nativen optischen und ESR-Eigenschaften: Die rote Farbe der Eisenflavoproteine rührt also im aeroben Ruhezustand vorwiegend vom Eisenprotein her. Dies gilt jedoch nicht unbedingt für den halbreduzierten Zustand [99], übereinstimmend mit den Eigenschaften des proteinfreien Modells (vgl. Abschnitt V), denen zufolge zwischen  $\text{Fl}_{\text{ox}}$  und  $\text{Fe}_{\text{ox}}$  zunächst keine Wechselwirkung besteht, vielmehr erst nach Zugabe eines Elektrons (Ladungstransferchelat) oder zweier Elektronen (Radikalchelat).

Der direkte Beweis für den Flavin-Metall-Kontakt im Metallflavoprotein gelang jedoch erst kürzlich durch Studien der ESR-Relaxation des Flavosemichinons in metallfreien und metallhaltigen Flavoproteinen (Abb. 7) [100]. In allen Metallenzymen fällt der angeregte Spin des freien Radikalelektrons ( $g = 2,00$ ) um mindestens eine Größenordnung rascher in den Grundzustand zurück als bei irgendeinem metallfreien Flavoprotein. d-Metallionen beeinflussen nur dann die Spin-Relaxa-

[98] P. Handler, K. V. Rajagopalan u. V. Aleman, *Federat. Proc.* 23, 30 (1964).

[99] P. Handler, persönliche Mitteilung.

[100] P. Hemmerich u. H. Beinert, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 18, 212 (1965).

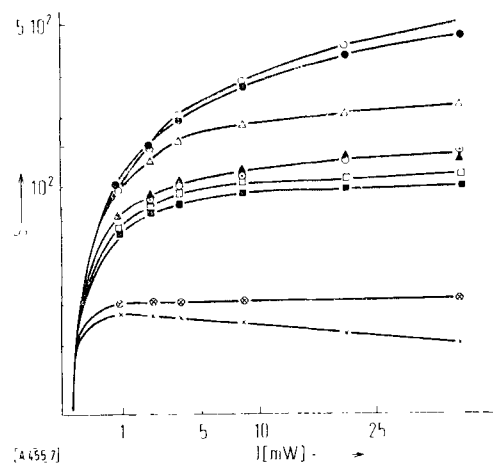


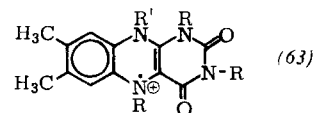
Abb. 7. Spin-Relaxationsverhalten des Flavosemichinons ( $g = 2,00$ ) in Flavoproteinen und freien Flavocoenzymen, nach [100].

Ordinate: Normierte Signalamplitude (S).

Abszisse: Mikrowellen-Intensität (I) [mW].

o: Xanthin-Oxydase; ●: Dihydroorotsäure-Dehydrogenase; Δ: NADH-Dehydrogenase; ○: Bernsteinsäure-Dehydrogenase; ▲: Bernsteinsäure-Ubichinon-Oxydoreduktase; □: Aldehyd-Oxydase; ■: freies Flavin + 10 Äquiv.  $\text{Ni}^{2+}$ ; ⊙: Liponsäure-Dehydrogenase; x: übrige metallfreie Flavoproteine sowie freie Flavocoenzyme.

tion in Modell-Flavosemichinonen, wenn N-5 unsubstituiert ist, also z. B. in (63) für  $\text{R} = \text{H}$ , nicht aber für  $\text{R} = \text{Alkyl}$ . Es ist also die Bildung einer – wenn auch noch so kurzlebigen –  $\sigma$ -Bindung zwischen Fe und Fl Voraussetzung; ein reiner  $\pi$ -Kontakt genügt nicht.



Flavin koordiniert demnach im Metallflavoprotein nur zeitweilig, und zwar im Intermediärstadium der Reduktion, mit dem Metall, wobei die Gleichgewichtskonzentration des metallgebundenen Flavin-Anteils von Enzym zu Enzym sehr verschieden sein kann. Die Koordinationssphäre des Flavoprotein-Eisens wird demnach in erster Linie durch das Apoprotein bestimmt. Der Einfluß von Substraten, artifiziellen Reduktionsmitteln oder Inhibitoren auf die optischen Eigenschaften von Metallflavoproteinen ist daher äußerst komplex und fast nicht molekular deutbar [101], solange die Umgebung des Eisens unbekannt ist.

## 6. Die Bindung des Nighthäm-Eisens im Flavoprotein

Der einzig verlässliche Hinweis auf eine intakte Metall-Koordinationssphäre in Nighthäm-Eisenproteinen ist das charakteristische ESR-Signal bei der Reduktion (Abb. 8) [102]. Die Signal-Asymmetrie ( $g_x \approx 2,00$ ,  $g_y \approx g_z \approx 1,94$ ) weist auf ein Koordinationspolyeder von höchstens rhombischer Symmetrie hin. Da bis in jüngste Zeit keine definierten  $\text{Fe(II)}$ -Komplexe mit  $g$ -Werten unter 2,00 bekannt waren, bestanden erhebliche

[101] D. V. DerVartanian u. C. Veeger, *Biochem. J.* 84, 65 P (1962).

[102] H. Beinert u. R. H. Sands, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 3, 41 (1960).

Zweifel an der Zuordnung des „ $g \approx 1,94$  Signals“ zu einem reduzierten Eisenkomplex, zumal auch reduziertes Eisen in Ligandfeldern beliebiger Stärke kein solches Spektrum theoretisch erwarten ließ. *Beinert* und Mitarbeiter [103] haben aber inzwischen diese Zuordnung

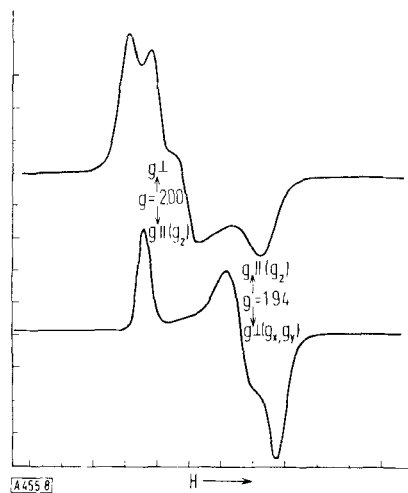


Abb. 8. Vergleich der ESR-Signale eines reduzierten Nischthäm-Eisenproteins (Fe-Protein aus *Azotobacter*, untere Kurve), nach [103], und eines ersten Modellkomplexes definierter Struktur ( $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ , obere Kurve), der dieselben  $g$ -Werte zeigt, nach [104].

$g_{\perp}$  oben:  $^{14}\text{N}$ -Hyperfeinstruktur, zurückzuführen auf Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit dem Kernspin  $I = 1$  des Isotops  $^{14}\text{N}$  im NO-Ligand des Modells.

Die Schulter im  $g_{\perp}$  des Eisenprotein-Spektrums ist hingegen einer Aufspaltung in  $g_x$ ,  $g_y$  zuzuschreiben, welche aus der im Vergleich zum  $\text{Fe}(\text{CN})_4$ -Tetragon geringeren Symmetrie des natürlichen Fe-Koordinationspolyeders folgt. Wir danken Prof. H. Beinert, Madison, für die spezielle Aufnahme.

durch Vergleich der ESR Spektren von  $^{56}\text{Fe}$  und  $^{57}\text{Fe}$ -Protein bewiesen: Das  $^{57}\text{Fe}$ -Präparat ergab die auf Grund seines Kernspins zu erwartende Hyperfein-Verbreiterung des Signals.

Danach war zu vermuten, daß es sich beim reduzierten Flavoprotein-Eisen um ein  $\text{Fe}(\text{II})$  in starkem Ligandfeld mit einem zusätzlichen, stark delokalisierten Elektron handeln müsse, was das Vorhandensein mindestens eines selbst redox-aktiven Liganden bedingt. Ein Modell ähnlicher Feldsymmetrie und Elektronenverteilung fanden wir gemeinsam mit *Beinert* und *van Voorst* im  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ , das ein starkes Feld mit tetragonaler

[103] Y. I. Shethna, P. W. Wilson, R. E. Hansen u. H. Beinert, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1263 (1964).

[104] H. Beinert, P. Hemmerich, D. V. DerVartanian, C. Veeger u. J. D. W. van Voorst, Biochim. biophysica Acta, im Druck.

Symmetrie und ein ungepaartes Elektron besitzt, welches so stark delokalisiert ist, daß eine ausgeprägte  $^{14}\text{N}$ -Hyperfeinstruktur neben der  $g$ -Aufspaltung ( $g_z \approx 1,93$ ,  $g_x \approx g_y \approx 2,00$ ) beobachtet wird (Abb. 8). Die absolute Lage der  $g$ -Werte ist praktisch die gleiche wie beim Fe-Protein. Dort allerdings ist nicht in erster Linie Stickstoff (also z. B. Flavin-N-5) als stabilisierender Acceptorligand anzunehmen, sondern Schwefel [105]; ESR-aktive Fe-Proteine enthalten eine zum Metall stöchiometrische Menge Schwefel, welche mit Säure als  $\text{H}_2\text{S}$  frei wird [106]. Es kann sich also nicht um normalen Cyst(e)inschwefel handeln. In welcher Weise dieser bislang unerforschte, offenbar aber biochemisch sehr wesentliche „labile“ Schwefel gebunden ist – außer an das Eisen – bleibt ein Zukunftsproblem. Vorläufig scheint es, als seien beim Nischthäm-Fe vier Koordinationsstellen in einem starken Ligandfeld fixiert, jedoch nicht tetragonal wie beim Häm-Fe, sondern (verzerrt) tetraedrisch, so daß zweizählige redox-aktive Liganden wie Disulfide und Flavin in reaktionsfähige cis-Positionen 5 und 6 eintreten können. Die Stabilität einer solchen Konfiguration kann nur kinetisch oder sterisch bedingt sein, so daß sich ein gutes niedermolekulares Modell nicht leicht finden lassen dürfte. Dies erklärt, warum einwertiges Kupfer ein besseres Modell für die natürliche Flavin-Metall-Wechselwirkung abgibt als  $\text{Fe}(\text{II})$  in wäßriger Lösung.

Wir danken unsern Mitarbeitern D. DerVartanian, U. Hartmann, F. Müller, L. Nebel, E. Rommel und T. Rowan, sowie den Kollegen befreundeter Arbeitskreise H. Beinert (Madison), A. Ehrenberg (Stockholm), P. H. Gibson (Philadelphia), O. Gawron (Pittsburgh), M. Klingenberg (Marburg), D. McCormick (Cornell), V. Massey und G. Palmer (Ann Arbor), D. E. Metzler (Iowa State), W. Pfeleiderer (Stuttgart), Th. Singer (Detroit), E. C. Slater (Amsterdam), J. Spence (Utah State) und J. van Voorst (Amsterdam) für die mit Rat und Tat geleistete Hilfe.

Eingegangen am 4. Januar 1965 [A 455]

Nachbemerkung bei der Korrektur: Die vorliegende Übersicht wurde abgeschlossen, ehe das „Internationale Symposium über Flavine und Flavoproteine“ in Amsterdam stattfand (10. bis 15. Juni 1965). Die dort vorgetragenen neuesten Entwicklungen des Gebietes werden demnächst in Buchform (Herausgeber E. C. Slater und C. Veeger) bei Elsevier, Amsterdam, vorgelegt.

[105] Vgl. z.B. W. A. Pryor: Mechanisms of Sulfur-Reactions. McGraw-Hill, New York 1962, S. 37 ff.

[106] J. S. Rieske, D. H. McLennan u. R. Coleman, Biochem. biophysic. Res. Commun. 15, 338 (1964).