

„Turn ON/OFF your LOV light“: Bordipyrrromethen-Flavin-Dyaden als biomimetische, von der LOV-Domäne abgeleitete Schalter***Christian Trieflinger, Knut Rurack* und Jörg Daub**

Viele wichtige biologische Prozesse werden durch Lichtsignale ausgelöst und gesteuert. In Photorezeptoren und Photosensoren beteiligen sich Chromophore dabei an Vorgängen wie der Ladungstrennung, dem Pumpen von Ionen, neuronalen Reaktionen oder photostimulierten Bewegungen.^[1] Im Laufe der Evolution hat die Natur vergleichsweise komplexe biochemische Prozesse hervorgebracht, die photoreguliert oder -gesteuert sind, z. B. der Sehprozess oder die lichtaktivierte Verteidigung bei Pflanzen. Da sich Licht als sehr komfortables Trigger- oder Kontrollsignal einsetzen lässt, sind Chemiker von jeher an einer Adaption photobiologischer Systeme für die Entwicklung von künstlichen supramolekularen Ensembles mit adressierbarer photochemischer Aktivität interessiert. Forschungsschwerpunkte sind auf Photostimuli ansprechende Membranen, die lichtkontrollierte Wirt-Gast-Chemie und das photochemische Schalten.^[2] In letzterem Fall sind biologisch inspirierte Systeme jedoch immer noch selten, und die bisher publizierten Beispiele wurden vor allem in Zusammenhang mit polymeren Strukturen realisiert.^[3]

Über rein molekulare Systeme ist deutlich seltener berichtet worden.^[4] Dies ist verwunderlich, da gerade bestimmte biochemische Funktionseinheiten sehr attraktive Kandidaten für den Aufbau von multimodalen supramolekularen Photoschaltern sind, ein Forschungsgebiet, das uns in den letzten Jahren zunehmend interessiert hat.^[5] Ein solches Beispiel ist der funktionalisierte Isoalloxazin-Chromophor. Flavine gehören zu den wichtigsten biologischen redoxaktiven Stoffeinheiten und ihre mannigfaltige Photo-, Redox- und

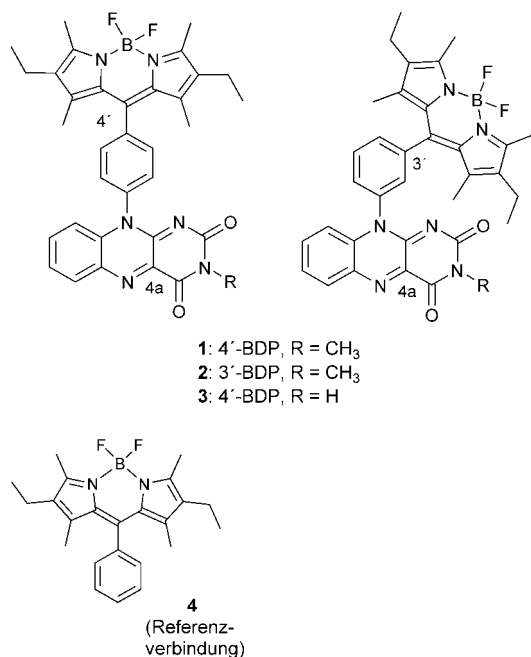
[*] Dr. C. Trieflinger, Prof. J. Daub
Institut für Organische Chemie
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4984
E-mail: joerg.daub@chemie.uni-regensburg.de
Dr. K. Rurack
Div. I.3
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-8104-5005
E-mail: knut.rurack@bam.de

[**] Frei nach dem Titel eines Liedes von D. Malone und J. W. Scott (1961). LOV = light-, oxygen-, or voltage-sensing domain (*Science* **1997**, 278, 2120). Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Studienstiftung des Deutschen Volkes unterstützt und ist Teil des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs „Sensorische Photorezeptoren in natürlichen und artifiziellen Systemen“ (GRK 640).



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

(inter)molekulare Chemie zeichnet sie als ideale Bausteine für anspruchsvolle chemische Schalter aus.^[6] Des Weiteren befindet sich eine Flavineinheit im aktiven Zentrum eines der interessantesten Photorezeptorproteine, den LOV-Domänen des Phototropins.^[7,8] Vor diesem Hintergrund und aufgrund der sich ausgezeichnet ergänzenden Eigenschaften der Flavin- und Borendipyrromethen(BDP)-Fluorophore, die selbst wichtige Merkmale eines effizienten Photoschalters zeigen,^[9] haben wir die BDP-Flavin-Dyaden **1–3** entwickelt, um unsere Idee eines eindeutig steuerbaren und reversiblen fluoreszierenden Schalters umzusetzen (Details zur Synthese finden sich in den Hintergrundinformationen).



Die Daten in Tabelle 1 und Abbildung 1 unterstreichen den zusammengesetzten Aufbau der Dyaden, da die Absorptionsspektren von **1–3** eine lineare Kombination der Banden der Chromophor-Untereinheiten mit Hauptmaxima bei

Tabelle 1: Absorptions- (in CHCl₃) und Redoxdaten (in MeCN) von **1–3** ($E_{1/2}$ in V vs. Fc⁺/Fc).

	λ_{abs} [nm] ([lg ϵ]/[lg (M ⁻¹ cm ⁻¹)])	$E_{1/2}^{\text{red}}$ [V]	$E_p^{\text{c,red}}$ [V]	$E_{1/2}^{\text{red}}$ [V]	$E_{1/2}^{\text{ox}}$ [V]
1	529 (4.86), 448 (4.15)	−1.11	–	−1.60	0.65
2	531 (4.81), 449 (4.12)	−1.11	–	−1.63	0.66
3	531 (4.81), 448 (4.10)	−1.10	−0.92	−1.63	0.65

530 nm (BDP) und 449 nm (Flavin) sind. Dieser Hinweis auf elektronisch entkoppelte Grundzustände wird zudem durch Cyclovoltammogramme gestützt, die die reversible Reduktion des Flavins (−1.1 V vs. Fc⁺/Fc) und die quasi-reversible Oxidation und Reduktion des BDP (0.65 V, −1.6 V vs. Fc⁺/Fc) bei den erwarteten Potentialen zeigen. Die Unterschiede im elektrochemischen Verhalten von **3** gegenüber **1** und **2**, die an dem zusätzlichen Reoxidationspeak bei

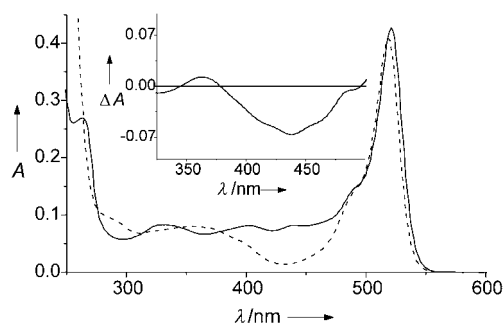


Abbildung 1. Absorptionsspektren von **1** (durchgezogene Linie) und zweifach reduziertem **1**^{red} ($c = 5 \times 10^{-6}$ M; gestrichelte Linie) in MeCN/MeOH 1:1. Einset: Differenzspektrum aus der Flavinregion.

−0.92 V vs. Fc⁺/Fc (Tabelle 1) abzulesen sind, lassen sich dem bekannten ECE-Mechanismus des Flavins zuordnen. Letzterem liegt eine intermolekulare protonenunterstützte Redoxreaktion zugrunde.^[10] Die bislang zu den Grundzustandseigenschaften von **1–3** präsentierten Ergebnisse zeigen, dass eine wichtige Vorbedingung für die einfache Steuerung eines Schalters erfüllt ist, nämlich, dass beide Schaltmodule unabhängig sind. Um aber richtiges „AN/AUS“-Verhalten zu bekommen, wie es durch starke Änderungen des Lichtsignals ausgedrückt wird, ist ein wohldefinierter „AUS“-Zustand nötig. Dies gilt insbesondere dann, wenn ein Schalter aus zwei stark fluoreszierenden Fluorophoren wie Flavin und BDP aufgebaut ist. Diesbezüglich wird die Eignung unseres Designkonzepts aus Tabelle 2 deutlich (siehe auch die theoretischen Überlegungen in den Hintergrundinformationen).

Tabelle 2: Fluoreszenzeigenschaften von **1–3**.

	Lösungsmittel	$\Phi_f \times 10^{-3}$ [a]	τ_f [ps] ^[b]	τ_f [ns] ^[c]
1	MeCN/Toluol ^[d]	1.3/2.3	10/17	–
	EtOH	1.6	13	5.33
2	MeCN/Toluol ^[d]	0.7/1.3	6/11	–
	EtOH	1.0	8	5.54
3	MeCN/Toluol ^[d]	0.8/1.5	6/10	–
3 ^{−[e]}	MeCN	8.8	96	–

[a] Bezogen auf Fluorescein 27 in 0.1 N NaOH (0.90 ± 0.03),^[15] $\pm 15\%$. [b] Bei 298 K, ± 3 ps. [c] Bei 77 K, ± 0.003 ns. [d] Erster Wert in MeCN, zweiter in Toluol. [e] Deprotoniert mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DBU.

Unabhängig von der Lösungsmittelpolarität und -protizität zeigen alle drei Dyaden nur eine schwache, BDP-typische Fluoreszenz. Keine Isoalloxazin-Emission konnte detektiert werden, auch nicht durch Anregung bei 449 nm. Zudem klingt die Fluoreszenz sehr schnell ab, was darauf hinweist, dass ein sehr effizienter strahlungsloser Desaktivierungskanal in den Titelverbindungen existiert. Des Weiteren ist auffällig, dass **1** und **2** ein sehr ähnliches Verhalten zeigen, was den Einfluss eines „meta-Effektes“ ausschließt.^[11] Die wichtige Rolle des direkt zwischengekoppelten Phenylen-Abstandshalters wird insbesondere anhand der Emissionsdaten deutlich. Diese Einheit fungiert zugleich als Orbitalisolator, der eine Mischung von Zuständen verhindert (wie es oft beim „meta-Effekt“ beobachtet wird), und als elektronischer Ver-

mittler, der die effiziente Fluoreszenzlöschung ermöglicht. Bei 77 K ist die Fluoreszenz stark erhöht, und es werden Abklingzeiten gemessen, die typisch für BDP-Farbstoffe und vergleichbar mit dem Wert der Referenzverbindung **4** (6.27 ns) sind. Nach Anregung des Flavins wird auch hier wieder nur die Emission des BDP detektiert, was darauf hindeutet, dass ein effizienter Energietransfer zum BDP stattfindet. Bei Raumtemperatur verursacht ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET) vom BDP zum elektronenarmen Flavin höchstwahrscheinlich die starke Löschung der Fluoreszenz.

Im glasartigen Ethanol bei 77 K ist der PET unterbrochen, da sowohl die Lösungsmittelreorganisation als auch die intramolekulare Bewegung eingefroren sind. Diese Interpretation wird durch Ergebnisse gestützt, die bei der Deprotonierung von **3** an der N3-Position erhalten worden sind. Solch ein Anstieg der Elektronendichte im Flavin hat eine mehr als zehnfache Erhöhung der BDP-Emission zur Folge (Tabelle 2). **1** und **2**, die an N3 methyliert sind, zeigen keine spektroskopische Veränderung bei Zugabe einer Base.

Nachdem wir den herkömmlichen AUS-Zustand definiert haben, ist der nächste Schritt die Installation einer Kontrollfunktion, die es ermöglicht, diesen Zustand „freizuschalten“. Dank der vielfältigen Redoxchemie des Flavins^[6] lässt sich solch eine Aktivierung chemisch durchführen. In Analogie zu natürlichen Thiol-Systemen haben wir bei diesem Experiment die spektroskopischen Änderungen bei der Reduktion der Flavineinheit mit 1,3-Propandithiol und DBU in MeCN/MeOH 1:1 unter Argonatmosphäre in situ verfolgt.^[12] Als Produkte entstehen die zweifach reduzierten Dyaden **1^{red}** und **2^{red}** neben [1,2]Dithiolan. Wie aus Abbildung 1 deutlich wird, verringert sich die Flavin-Absorption bei 440 nm, während die BDP-Absorption nicht betroffen ist. Dieser Befund deutet zweifelsfrei darauf hin, dass der Redoxprozess am Flavin stattfindet. Dennoch sind **1^{red}** und **2^{red}** auch nur schwach fluoreszierend und zeigen Fluoreszenzlebensdauern im Rahmen der instrumentellen Auflösung ($\tau_f = 3\text{--}5$ ps). Diese Beobachtungen kennzeichnen jetzt den chemisch kontrollierten AUS-Zustand und lassen sich durch eine Umkehr des ET-Prozesses erklären (Hintergrundinformationen). In den reduzierten Dyaden ist die Elektronendichte am Flavin so hoch, dass Anregung des BDP einen PET vom Flavin zum BDP auslöst, wobei reduktive PET-Prozesse für donorsubstituierte BDPs wohl bekannt sind (Abbildung 2).^[9b]

Da wir jetzt zwischen einem inaktiven und einem aktivierten AUS-Zustand hin- und herschalten können, betrifft die letzte Anforderung das Eingabesignal, das reversibles AUS/AN-Schalten ermöglicht. Wenn wir uns die Ausführungen aus dem einleitenden Absatz noch einmal vergegenwärtigen, kommt an dieser Stelle der durch Licht gesteuerte Reaktionszyklus der LOV-Domäne ins Spiel. Bestrahlt man eine Lösung des chemisch aktivierten Ensembles mit UV-Licht von 254 nm, so beobachtet man einen starken Anstieg der BDP-Fluoreszenz. Die enorme Effizienz des Schaltprozesses wird eindrucksvoll an der weit mehr als 100fachen Erhöhung der BDP-Emission deutlich und manifestiert sich in τ_f -Werten von 4.96 und 5.27 ns für die **1**- und **2**-haltigen Systeme. Eine volle Umwandlung der beiden reduzierten Dyaden wird sehr schnell erreicht, und nach Abschalten der

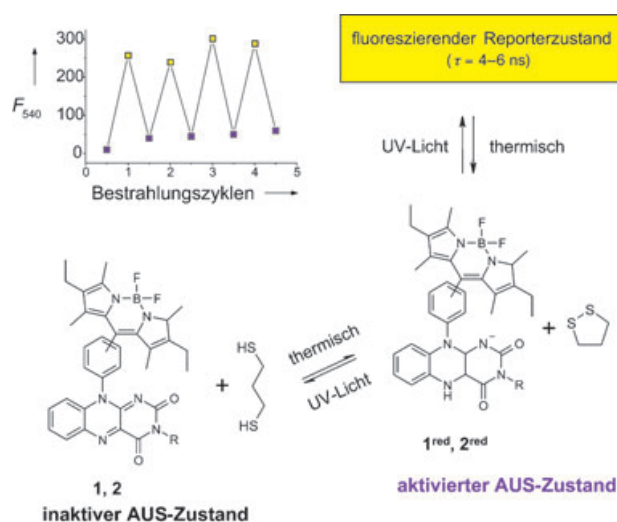


Abbildung 2. Reaktionsschema des thermischen und photochemischen Schaltens zwischen dem inaktiven AUS-Zustand (**1**, **2**), dem aktivierten AUS-Zustand (**1^{red}**, **2^{red}**) und dem AN-Zustand (Reporterzustand). Einschub: reversibles Schalten zwischen dem aktivierten AUS-Zustand (violett) und dem AN-Zustand (gelb) von **1^{red}**, dargestellt als Änderung der Emissionsintensität in MeCN/MeOH 1:1 während mehrerer Bestrahlungszyklen mit 30 s Belichtung und 300 s thermischer Rückreaktion ($c_1 = 1 \times 10^{-6}$ M).

UV-Lichtquelle fällt die Fluoreszenz wieder auf ihren Eingangswert ab.

Die Reversibilität dieser Reaktion ist in Abbildung 2 gezeigt, wobei deutlich wird, dass irreversible Nebenreaktionen keine große Rolle spielen. Die UV-Bestrahlung initiiert höchstwahrscheinlich die Bildung einer thermisch instabilen, aber stark emittierenden Spezies, die bei kontinuierlicher Bestrahlung angereichert wird. Die Dyaden **1^{red}** und **2^{red}** werden dann in einer thermischen Rückreaktion regeneriert. Obwohl die wahre Natur des emittierenden Zustandes bisher analytisch nicht zweifelsfrei mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden bestimmt werden konnte, deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die Elektronendichte am Flavin deutlich niedriger als im oxidierten Zustand, aber höher als im voll reduzierten Zustand ist. Ein einfach reduzierter Zustand kann dabei ausgeschlossen werden, da solche Radikale ebenfalls die Emission löschen würden. Wir nehmen daher an, dass in Analogie zum Photozyklus der LOV-Domänen unter den hier vorherrschenden Bedingungen die durch Licht induzierte Bildung eines emittierenden Flavin-Thiol-Adduktes erfolgt. Die thermische Rückbildungsgeschwindigkeit für LOV-Domänen wird in der Literatur für gewöhnlich mit 0.02 bis 0.003 s⁻¹ angegeben, wobei die Geschwindigkeit vom Typ der Domäne, der Umgebung und einer möglichen Unterstützung durch das Protein abhängt.^[7,13] Dieses Verhalten legt nahe, dass unter den hier vorherrschenden, extremeren Bedingungen ein C(4a)-Addukt oder, genauer, ein C(4a)-C(10a)-Cycloaddukt beteiligt sein könnte. Weitere Experimente, die eine genauere Erklärung des Mechanismus ermöglichen sollten, werden von uns derzeit durchgeführt.

Zusammenfassend haben wir hier neuartige BDP-Flavin-Dyaden mit bemerkenswerten elektrochemischen und opti-

schen Eigenschaften vorgestellt, die eine Modulation der Emission sowohl durch Energie- als auch durch Elektronentransfer ermöglichen. Die Richtung und Effizienz des ET-Prozesses kann dabei durch verschiedene Eingangssignale gesteuert werden, z. B. durch Zugabe von Base, Redoxreaktionen oder Bestrahlung mit Licht. Diese Charakteristika zeichnen **1** und **2** als wirksame biomimetische photochemische Schalter aus,^[14] bei denen der aktivierte Zustand unabhängig gesteuert und das Emissionssignal reversibel geschaltet werden kann.

Eingegangen am 20. Oktober 2004

Online veröffentlicht am 8. März 2005

Stichwörter: Bor · Flavin · Fluoreszenz · Molekulare Schalter · Photorezeptoren

- [1] M. A. van der Horst, K. J. Hellingwerf, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 13–20.
- [2] a) T. Kinoshita, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, *42*, 12–19; b) I. Willner, B. Willner in *Molecular Switches* (Hrsg.: B. L. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, S. 165–218.
- [3] a) O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 9–17; b) I. Willner, S. Rubin, *React. Polym.* **1993**, *21*, 177–186.
- [4] a) A. Niemz, V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 44–52; b) Z. Shen, R. Prochazka, J. Daub, N. Fritz, N. Acar, S. Schneider, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 3257–3269.
- [5] a) H. Spreitzer, J. Daub, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1150–1158; b) K. Rurack, M. Kollmannsberger, J. Daub, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 396–399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 385–387; c) K. Rurack, A. Koval'chuck, J. L. Bricks, J. L. Slominskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6205–6206.
- [6] *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, Vol. 1* (Hrsg.: F. Müller), CRC, Boca Raton, **1991**.
- [7] a) 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; b) E. Schleicher, R. M. Kowalczyk, C. W. M. Kay, P. Hegemann, A. Bacher, M. Fischer, R. Bittl, G. Richter, S. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11067–11076.
- [8] LOV-Domänen sind die primären signalgebenden Untereinheiten der Photorezeptoren für blaues Licht und reagieren auf Licht, Sauerstoff oder Potentialdifferenzen (light, oxygen, or voltage). Sie transferieren die Information auf Serin/Threonin-Kinasen, wobei im ersten Schritt ein C(4a)-Thiol-Addukt des FMN gebildet wird.
- [9] a) R. A. Wagner, J. S. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9759–9760; b) M. Kollmannsberger, T. Gareis, S. Heinl, J. Breu, J. Daub, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1391–1393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1333–1335; c) M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, W. Rettig, J. Daub, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *329*, 363–369.
- [10] A. Niemz, J. Imbriglio, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 887–892.
- [11] F. D. Lewis, J.-S. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3834–3835.
- [12] E. L. Loechler, T. C. Hollocher, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7312–7321.
- [13] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, W. R. Briggs, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9401–9410.
- [14] Eine native LOV-Domäne als photochromer Schalter wurde kürzlich beschrieben: J. T. M. Kennis, I. H. M. van Stokkum, S. Crosson, M. Gauden, K. Moffat, R. van Grondelle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4512–4513.
- [15] J. Olmsted III, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 2581–2584.