

## Enzymatische Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff

Von Volker Ullrich<sup>[\*]</sup>

Biologische Hydroxylierungen können aus thermodynamischen Gründen meistens nicht nach dem Schema der  $\beta$ -Oxidation verlaufen, sondern nur auf dem energetisch aufwendigen Weg mit molekularem Sauerstoff. Die entsprechenden Enzyme, „mischfunktionelle Oxygenasen“ oder besser „Monooxygenasen“ genannt, benötigen zwei Reduktionsäquivalente zur Sauerstoffaktivierung. Der Chemismus der Enzymkatalyse wird am Beispiel der cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen diskutiert. Noch ungelöst ist das zentrale Problem der Sauerstoffaktivierung, jedoch lassen Modelluntersuchungen den Schluß auf einen „oxenoiden“ Mechanismus zu.

### 1. Das Problem der Sauerstoffaktivierung

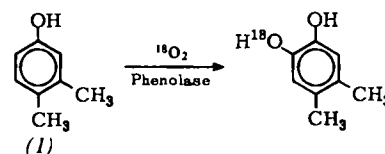
Molekularer Sauerstoff verdankt seine Existenz der Photosynthese und kann daher als Bioelement betrachtet werden. Diese Art seiner Entstehung in biologischen Systemen und sein ubiquitäres Vorkommen lassen oft vergessen, daß zwischen organischer Materie und Sauerstoff nur ein metastabiles Gleichgewicht besteht. Ist einmal die erforderliche Aktivierungsenergie aufgebracht, so läuft eine sehr schnelle Oxidation organischer Verbindungen unter gleichzeitiger Reduktion des Sauerstoffs ab. Die Änderung der freien Enthalpie dieser „Verbrennungsreaktionen“ ist beträchtlich und wird nur noch von denen mit molekularem Fluor übertroffen<sup>[1]</sup>.

Diese beiden Charakteristika des Sauerstoffs – Reaktionsträgheit einerseits und hohes Oxidationspotential andererseits – bedingen seine einzigartige Bedeutung für die Energetik der Lebensprozesse. Es ist daher verständlich, daß viele Untersuchungen zur Aufklärung der komplexen Chemie des Sauerstoffmoleküls durch das Interesse an seinen biologischen Reaktionen begründet waren.

Um die Reaktionsbereitschaft des Sauerstoffs unter physiologischen Bedingungen zu erklären, war die Annahme einer

„Aktivierung des Sauerstoffs“ unumgänglich. Sie wurde schon früh in den Arbeiten von Traube<sup>[2]</sup>, Engler<sup>[3]</sup> und Bach<sup>[4]</sup> postuliert und erhielt ihre experimentelle Grundlage durch die Untersuchungen Otto Warburgs. Seine Modellversuche im Zusammenhang mit den Arbeiten zum photochemischen Wirkungsspektrum der Cytochrom-Oxidase bewiesen die Bedeutung des zweiwertigen Eisen-Ions für die Bindung des Sauerstoffs<sup>[5]</sup>. Berücksichtigt man die neuere Erkenntnis, daß Sauerstoff in seiner paramagnetischen Struktur eine sehr stabile Elektronenkonfiguration besitzt, die durch Bindung an das Eisen teilweise aufgehoben werden kann<sup>[6,7]</sup>, so ist der von Warburg ins Feld geführte Begriff der Sauerstoff-„Aktivierung“ auch nachträglich für die biologische Oxidation zu rechtfertigen.

Erst 1955 konnte der Beweis erbracht werden, daß Warburgs Vorstellungen von einer Sauerstoffaktivierung noch viel unmittelbarer auf enzymatische Reaktionen des Sauerstoffs angewendet werden können. Mit Hilfe des schweren



Sauerstoffisotops  $^{18}\text{O}_2$  konnten Mason et al.<sup>[8]</sup> den direkten Einbau von molekularem Sauerstoff in 3,4-Dimethylphenol (1), ein Substrat der Phenolase, nachweisen.

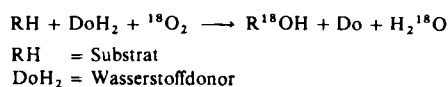
[\*] Prof. Dr. V. Ullrich  
Physiologisch-Chemisches Institut  
der Universität des Saarlandes  
665 Homburg/Saar

Im Gegensatz zum Prinzip der biologischen Oxidation, die dem Sauerstoff nur die Rolle eines Elektronenacceptors zuordnet, greift bei diesen Reaktionen der Sauerstoff das Substrat direkt unter Oxygenierung an. Zweifellos erfordert die Spaltung einer CH-Bindung unter Hydroxylierung des Kohlenstoffs eine enzymatische Aktivierung des Sauerstoffmoleküls, so daß diese Frage einer erneuten Diskussion bedurfte.

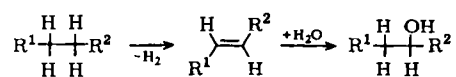
## 2. Allgemeine Eigenschaften von Monooxygenasen

### 2.1. Definition und Nomenklatur

Bei enzymatischen Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff wird ein Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt, während das zweite zu Wasser reduziert wird. Die Bruttogleichung für die Reaktion wurde zum erstenmal von *Mason*<sup>[9]</sup> aufgestellt:



Der Wasserstoffdonor ist bei vielen Reaktionen reduziertes Nicotin-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH<sub>2</sub>) oder auch reduziertes Nicotin-adenin-dinucleotid (NADH<sub>2</sub>). Aber auch Tetrahydropteridine, reduzierte Flavine oder Ascorbinsäure können die beiden Elektronen zur Verfügung stellen (vgl. Tabelle 1). Zunächst erscheint es paradox, daß eine Oxidation nur in Anwesenheit und unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten verläuft, die damit der Zelle für die Energiegewinnung verloren gehen. Es taucht daher die Frage auf, warum eine Hydroxylierung nicht über die wesentlich ökonomischere Dehydrierung des Substrats und eine anschließende Wasseranlagerung erfolgt.



Auf diese Weise entsteht z. B. im Citratzyklus aus Bernsteinsäure über Fumarsäure die Äpfelsäure, und der bei dieser Hydroxylierung anfallende Wasserstoff kann über die Atmungskette 2 ATP liefern.

Ähnlich verlaufen die Hydroxylierungen mit der Xanthin-Oxidase<sup>[10]</sup> oder einer Nicotinsäure-Hydroxylase<sup>[11]</sup>. Die thermodynamische Betrachtung ergibt, daß für aliphatische oder aromatische Verbindungen ohne polarisierende Gruppen dieser Weg aus energetischen Gründen nicht gangbar ist, so daß die Hydroxylierung mit Sauerstoff als einziger Ausweg bleibt.

Die Tatsache, daß Hydroxylierungen prinzipiell auf den beiden geschilderten Wegen möglich sind, macht eine eindeutige Nomenklatur notwendig. Wegen der „gemischten“ Funktion des Sauerstoffs als oxidierendes und oxygenierendes Agens schlug *Mason* den Begriff „mixed func-

tion oxidase“ vor, dem von *Hayaishi*<sup>[12]</sup> später die Bezeichnung „Monooxygenase“ gegenübergestellt wurde. Dieser Vorschlag *Hayaishis* weist mehr auf die oxygenierende Funktion dieser Enzyme hin und erlaubt eine systematischere Abgrenzung zu den „Dioxygenasen“, bei denen beide Atome des molekularen Sauerstoffs in das Substrat eingeführt werden<sup>[13]</sup>.

Die offizielle Nomenklatur der Enzyme Commission faßt die Enzyme als „Hydroxylasen“ unter der Nummer 1.14. zusammen. Dem systematischen Namen wird dabei die Bezeichnung „Sauerstoff-Oxidoreduktase“ zugrunde gelegt; er enthält außerdem neben dem Substrat den Elektronendonator und den Zusatz „hydroxylierend“; z. B. 1.14.1.2. L-Kynurenin, reduziertes NADP: Sauerstoff-Oxidoreduktase (hydroxylierend). Wir werden hier vom Begriff Monooxygenase ausgehen und so z. B. für das obengenannte Enzym die einfachere Bezeichnung „L-Kynurenin-3-Monooxygenase“ verwenden. Auf eine zusätzliche Erwähnung des Elektronendonors kann verzichtet werden, da er im allgemeinen wenig spezifisch ist.

### 2.2. Bedeutung im Stoffwechsel

Um aliphatische oder aromatische CH-Bindungen mit funktionellen Gruppen zu versehen, stehen dem Chemiker eine Reihe von Reaktionen, z. B. die Halogenierungen, die Sulfonierung oder die Nitrierung mit anschließender Reduktion unter Aminierung zur Verfügung. Im Stoffwechsel erfordert der Auf- und Abbau von Substraten immer das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, an denen die enzymatischen Reaktionen angreifen. Fehlen diese, wie es bei vielen lipophilen Verbindungen der Fall ist, so bleibt die Einführung der Hydroxygruppe über die Monooxygenasen der einzige Weg zur Bildung von Derivaten. Diese Notwendigkeit besteht z. B. bei den Steroidbiosynthesen, bei denen aus Cholesterin durch Einführung von Hydroxygruppen die hochaktiven Hormone gebildet werden. Auch im Aminosäurestoffwechsel sind Monooxygenierungen vielfach anzutreffen, so bei der Synthese von Tyrosin, Hydroxyprolin, Hydroxykynurenin oder Dopamin. Die größte Bedeutung haben Monooxygenierungen für den Abbau und die Ausscheidung lipophiler Verbindungen. Solche Substanzen können den Körper nur verlassen, wenn sie zuvor durch Hydroxylierung wasserlöslich gemacht werden. Die Monooxygenasen für Fremdstoffe in der Leber beanspruchen seit etwa zehn Jahren das Interesse der Pharmakologen und Mediziner. Für die hormonelle Regulation durch Steroide ist deren kontinuierliche Inaktivierung notwendig, die ebenfalls in der Leber durch Monooxygenasen erreicht wird.

Erst in neuester Zeit ist die Bedeutung der Monooxygenasen für die adaptiven Mikroorganismen erkannt worden. Bakterien und Hefen können auch auf unphysiologischen Kohlenstoffquellen, z. B. aromatischen oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen, wachsen. Voraussetzung dafür ist die spezifische Induktion von Monooxygenasen, die den Abbau dieser inerten Substrate durch eine oder mehrere Hydroxylierungsreaktionen einleiten, bis dann die Metabolite in die normalen Stoffwechselwege einmünden können. Aufgrund der meistens sehr geringen

Aktivitäten der Monooxygenasen sind die Hydroxylierungen fast immer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Abbaureaktionen. Um einen schnellen Abbau der organischen Verbindungen und damit ein rasches Zellwachstum zu gewährleisten, enthalten solche adaptierten Mikroorganismen sehr hohe Konzentrationen an Monooxygenase-Proteinen. Auf diesem Wege ist die Umwandlung von Erdöl in tierische Nahrungsstoffe möglich und auch schon verifiziert worden<sup>[14]</sup>.

Kommerzielles Interesse besitzen auch Bakterienstämme, die hochspezifische Steroid-Monooxygenasen enthalten und damit zur Synthese der chemisch schwer zugänglichen

hydroxylierten Steroidhormone herangezogen werden können<sup>[15]</sup>.

### 2.3. Übersicht der wichtigsten Monooxygenasen

Die erwähnten adaptiven Eigenschaften von Mikroorganismen erlauben die Induktion von Monooxygenasen für praktisch jede organische Verbindung. In der Übersicht (Tabelle 1) sollen daher nur solche Monooxygenasen erwähnt werden, die auch im Säugetier eine Bedeutung im Stoffwechsel besitzen und schon ausreichend untersucht sind.

Tabelle 1. Übersicht der wichtigsten Säugetier-Monooxygenasen.

Enzym	Elektronendonator	Vorkommen [a]	Bemerkungen	Lit.
<i>Steroid-Monooxygenasen</i>				
Squalen-2,3-Monooxygenase (epoxidierend) (EC 1.14.1.3.)	NADPH <sub>2</sub>	ER der Leber	Epoxid bildet die Vorstufe zum Lanosterin	[16, 17]
11 $\beta$ -Monooxygenase (EC 1.14.1.6.)	NADPH <sub>2</sub>	Mitochondrien der NNR	besteht aus FAD-haltiger Reduktase, Nicht-Häm-Eisenprotein und Cytochrom P 450, rekonstituierbar	[18–20]
C-21-Monooxygenase (EC 1.14.1.8.)	NADPH <sub>2</sub>	ER der NNR	enthält Cytochrom P 450	[21, 22]
Cholesterin-20-Monooxygenase (EC 1.14.1.9.)	NADPH <sub>2</sub>	Mitochondrien von NNR, Testes, Ovar, Placenta	enthält Cytochrom P 450, Vorstufe zur Seitenketten-Abspaltung	[23, 24]
2 $\beta$ -, 6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 1 $\alpha$ -, 1 $\beta$ -, 15 $\alpha$ -, 16 $\alpha$ -, 18 $\alpha$ -Monooxygenasen	NADPH <sub>2</sub>	ER der Leber	am Abbau von Steroiden beteiligt	[25–28]
<i>Aminosäure-Monooxygenasen</i>				
L-Kynurenin-3-Monooxygenase (EC 1.14.1.2.)	NADPH <sub>2</sub> , NADH	Leber-Mitochondrien (äußere Membran)	enthält FAD	[29, 30]
Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase (EC 1.14.2.1.)	Ascorbat	Nebennieren-Mark	enthält 2 Cu	[31, 32]
4-Hydroxyphenylpyruvat-1-Monooxygenase (EC 1.14.2.2.)	intermediär gebildeter Aldehyd	Leber-Cytoplasma	empfindlich gegen Oxidation. Seitenkette wandert in <i>ortho</i> -Stellung	[33, 34]
Phenylalanin-4-Monooxygenase (EC 1.14.3.1.)	Tetrahydrobiopterin	Leber-Cytoplasma		[35, 36]
Prolin-4-Monooxygenase	Ascorbat	kollagen-synthetisierende Gewebe	enthält Fe <sup>2+</sup> , hydroxyliert Prolin nur im Peptidverband	[37, 38]
<i>Verschiedene</i>				
Häm- $\alpha$ -Monooxygenase	NADPH <sub>2</sub>	ER der Leber	enthält Cytochrom P 450, Produkte sind Biliverdin und CO. Induzierbar durch Hämin	[39]
Fettsäure- $\omega$ -Monooxygenase	NADPH <sub>2</sub>	ER der Leber und Niere	enthält Cytochrom P 450. Induzierbar durch Laurat	[40–42]
<i>Xenobiotika-Monooxygenasen</i>				
Aryl-4-Monooxygenase	NADPH <sub>2</sub>	ER der Leber	enthält wahrscheinlich Cytochrom P 450 und Flavoprotein. Induzierbar durch polycyclische Kohlenwasserstoffe; unspezifisch	[43, 44]
Alkan-Monooxygenase	NADPH <sub>2</sub> (NADH <sub>2</sub> )	ER der Leber	enthält Cytochrom P 450 und Flavoprotein. Induzierbar durch Barbiturate. Unspezifisch, bevorzugt $\omega$ -1-Stellung und tertiäre CH-Bindungen	[41, 45–47]

[a] ER = Endoplasmatisches Reticulum,  
NNR = Nebennierenrinde.

## 2.4. Probleme der Wirkungsweise von Monooxygenasen

Jede Monooxygenase benötigt für die Katalyse außer dem Substrat zusätzlich molekularen Sauerstoff und einen Elektronendonator als Cosubstrate. Das Zusammenspiel dieser drei Komponenten bei der Monooxygenierung läßt viele Kombinationsmöglichkeiten zu, die alle ausführlich diskutiert worden sind<sup>[9]</sup>.

Gemeinsam ist allen Monooxygenasen die Aktivierung des Sauerstoffmoleküls, die unter Aufnahme von zwei Elektronen erfolgt. Das Prinzip dieser Sauerstoffaktivierung ist erst in groben Umrissen aus den bisher vorliegenden Ergebnissen über die enzymatischen Reaktionen und ihre Modelle erkennbar. In den übrigen Eigenschaften weisen die Monooxygenasen aber weitreichende Unterschiede auf. Im wesentlichen sind die folgenden drei Gesichtspunkte für die Charakterisierung dieser Enzyme ausschlaggebend.

### 2.4.1. Die Substratspezifität

Die Spezifität einer enzymatischen Reaktion wird von der Bindung der Substrate im „aktiven Zentrum“ des Proteins bestimmt. Entscheidend für die Affinität des Substrates zum Enzym sind Art und Anzahl der Wechselwirkungskräfte. Für eine stereospezifische Fixierung des Substratmoleküls im Protein müssen mindestens drei Bindungsstellen vorhanden sein<sup>[48]</sup>. Dies ist z. B. für die stereospezifisch verlaufenden Steroid- oder Aminosäurehydroxylierungen zu fordern.

Bei einigen Monooxygenasen kann die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes direkt optisch verfolgt werden. In diesem Fall läßt sich die Affinität von Enzym und Substrat durch diejenige Substratkonzentration beschreiben, die benötigt wird, um die Hälfte des Enzyms in den Enzym-Substrat-Komplex zu überführen (spektrale Dissoziationskonstante, „ $K_s$ “).

### 2.4.2. Die „terminale Oxidase“

Unter diesem Begriff versteht man diejenige Komponente des Monooxygenase-Systems, die den Sauerstoff bindet und ihn mit Hilfe der beiden Elektronen aktiviert. Für die Bindung des Sauerstoffs bietet sich seine Eigenschaft als ausgezeichneter Elektronenacceptor an. Die terminalen Oxidasen sind daher immer Elektronendonoren. Eine besonders stabile Bindung des Sauerstoffs an das aktive Zentrum der terminalen Oxidase kommt zustande, wenn zusätzlich eine Rückbindung der  $p_\pi$ -Orbitale des Sauerstoffs mit den  $d$ -Orbitalen von Schwermetall-Ionen erfolgt<sup>[49]</sup>. Eisen(II)- und Kupfer(I)-Komplexe sind daher die am häufigsten anzutreffenden terminalen Oxidasen. Aber auch organische Verbindungen wie reduzierte Flavinsysteme können Sauerstoff aktivieren. Monooxygenasen dieses Typs findet man vorwiegend bei den bakteriellen Enzymen<sup>[50–52]</sup>.

### 2.4.3. Der Elektronentransport

Die terminale Oxidase ist ein Redoxsystem, das durch Übertragung von zwei Elektronen den Sauerstoff in eine aktive Form überführt.

Nach der Hydroxylierung des Substrates bleibt die terminale Oxidase in ihrer oxidierten Form zurück und muß

für den folgenden Zyklus wieder in die reduzierte, sauerstoffbindende Form überführt werden. Diese Reduktion ist im Prinzip mit jedem Elektronendonator möglich, der über ein genügend negatives Potential verfügt. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß bei einigen Monooxygenasen Ascorbinsäure und Tetrahydropteridine die Rolle des Elektronendonors übernehmen, aber die Mehrzahl aller Monooxygenasen auf reduzierte Pyridinnucleotide angewiesen ist.

In diesem Fall kompliziert sich der Elektronentransport zum Sauerstoff, da das Pyridinnucleotid seine Reduktionsäquivalente nur durch Hydridion-Übertragung in einem Zweielektronenschritt abgeben kann<sup>[53]</sup>, Sauerstoff aber nur in Einelektronenschritten reduzierbar ist. NADPH<sub>2</sub> oder NADH<sub>2</sub>-abhängige Monooxygenasen enthalten daher zusätzlich noch Redoxkomponenten wie Flavin- und Nicht-Häm-Eisenproteide, die die Auflösung des Zweielektronenübergangs in Einelektronenschritte ermöglichen. Diese pyridinnucleotid-abhängigen Monooxygenasen bilden ähnlich wie die Atmungskette Multienzymkomplexe, die oft an biologische Membranen gebunden sind. Es sei erwähnt, daß diese Reduktionssysteme nicht immer sehr spezifisch sind und oftmals in verwandten Systemen sogar ausgetauscht werden können.

Charakterisiert wird eine Monooxygenase daher nicht durch das Elektronentransportsystem, sondern in erster Linie durch die Natur ihrer terminalen Oxidase. Die Monooxygenasen sollten daher in die eisen-, kupfer- und flavinhaltigen Enzyme unterteilt werden. Am besten untersucht sind bis heute die eisenhaltigen Monooxygenasen mit Cytochrom P 450 als sauerstoffaktivierender Komponente. Die Wirkungsweise dieser Enzyme soll in den folgenden Abschnitten exemplarisch für alle Monooxygenasen besprochen werden.

## 3. Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasen

Eisen-Ionen sind, wie die Versuche Warburgs schon zeigten, die wichtigsten Cofaktoren im Stoffwechsel des Sauerstoffs. Besondere Bedeutung besitzen die Porphyrinkomplexe des Eisens, in denen die Stickstoffatome der vier Pyrrolringe eine Ebene der oktaedrischen Koordinationssphäre des Eisen-Ions fixieren. Dadurch werden die fünfte und sechste Koordinationsstelle räumlich getrennt, so daß ein Ligandenaustausch unmöglich ist. Dies erlaubt bei allen Enzymen mit Eisen-Porphyrin-Komplexen als prosthetische Gruppen eine stereospezifische Fixierung des Sauerstoffmoleküls. Die Bindung des Sauerstoffs erfolgt an der sechsten Koordinationsstelle, während für die Bindung an das Protein die fünfte Koordinationsstelle verwendet wird.

1958 entdeckten Klingenberg<sup>[54]</sup> und Garfinkel<sup>[55]</sup> ein Cytochrom in der Mikrosomenfraktion von Rattenlebern, das im reduzierten Zustand eine Kohlenmonoxid-Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm bildete. Die Lage dieser Bande war ungewöhnlich, da alle bekannten Kohlenmonoxid-Verbindungen von Eisen-Porphyrin-Komplexen wesentlich kurzwelliger (bei etwa 420 nm) absorbieren. Auch in der Mikrosomenfraktion der Nebennierenrinde ließ sich dieses neue Cytochrom

nachweisen. Durch Versuche von *Ryan und Engel*<sup>[21]</sup> war bekannt, daß dieselbe Fraktion Steroide an C-21 hydroxylieren konnte und Kohlenmonoxid die Hydroxylierung hemmte. Zurückgehend auf die Beobachtung der Lichtreversibilität der Eisen(II)-Kohlenmonoxid-Komplexe und mit der klassischen Versuchsanordnung von *Warburg* für das photochemische Wirkungsspektrum zeigten *Estabrook et al.*<sup>[56]</sup>, daß dieses Cytochrom an der C-21-Hydroxylierung als terminale Oxidase beteiligt ist (Abb. 1).

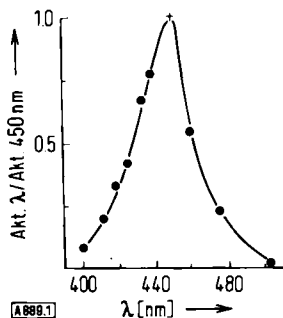


Abb. 1. Photochemisches Wirkungsspektrum der Steroid-C-21-Monooxygenase in Gegenwart von Kohlenmonoxid [56].

Aufgrund der ungewöhnlichen Absorptionsbande seiner CO-Verbindung erhielt das Hämprotein den vorläufigen Namen „Cytochrom P 450“, der jedoch bis heute nicht durch eine systematischere Bezeichnung ersetzt wurde.

Das Cytochrom wurde in den darauffolgenden Jahren nicht nur in Säugern, sondern auch in Insekten<sup>[57]</sup>, Hefen<sup>[58, 59]</sup> und Bakterien<sup>[60–62]</sup> gefunden.

Ermöglicht wurde dieser Nachweis durch die von *Chance*<sup>[63]</sup> entwickelten Methoden der Absorptionsmessung in trüben Lösungen. Jeder Versuch einer proteinchemischen Reinigung der partikulären Zellfraktion hatte zu einer raschen Zerstörung des Cytochroms geführt. Das aktive Cytochrom ging dabei in eine inaktive Form über, deren CO-Verbindung nicht mehr bei 450, sondern bei 420 nm absorbierte und die deshalb die Bezeichnung „Cytochrom P 420“ erhielt<sup>[64, 65]</sup>.

In fast allen Fällen konnte dem gefundenen Cytochrom P 450 eine Funktion bei einer Hydroxylierung zugeordnet werden, so daß man es mit Recht als die bevorzugte prosthetische Gruppe der Monooxygenasen betrachten kann.

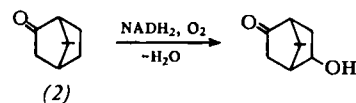
Bei der Untersuchung der C-21-Hydroxylierung in der Mikrosomenfraktion der Nebennierenrinde stellten *Cooper et al.*<sup>[22]</sup> eine Änderung im Spektrum des Cytochroms P 450 fest, wenn Substrate der C-21-Monooxygenase zugesetzt wurden. Die gleiche Beobachtung in Rattenlebermikrosomen nach Zusatz von Hexobarbital wurde von *Schenkman et al.*<sup>[66]</sup> als Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes interpretiert. Eine weitere Aufklärung der Wirkungsweise des Enzyms in diesen Mikrosomenfraktionen wurde durch die feste Bindung des Monooxygenase-Systems an die Membran erschwert.

Die erste Anreicherung und Auftrennung eines strukturgebundenen Monooxygenase-Systems gelang *Omura et al.*<sup>[19]</sup> im Falle der Steroid-11 $\beta$ -Monooxygenase aus Mitochondrien

der Nebennierenrinde (siehe Tabelle 1). Aus Detergens-Auflösungen ließen sich drei Proteinkomponenten isolieren, die zusammen wieder die volle Aktivität des Enzyms ergaben. Es handelte sich um ein NADPH-oxidierendes Flavoprotein<sup>[67]</sup>, ein Nicht-Häm-Eisenprotein<sup>[68]</sup> und das Cytochrom P 450<sup>[69]</sup>. Rekonstitutionsversuche zeigten, daß das Nicht-Häm-Eisenprotein durch das Flavoprotein reduziert wurde, welches seinerseits die Elektronen auf das Cytochrom P 450 übertrug. Die weitere proteinchemische Reinigung des Cytochroms erwies sich auch bei diesem System als schwierig, da in Gegenwart des Detergens nur eine „Pseudo-Solubilisierung“ erreicht werden konnte. Wichtige Hinweise zum Verlauf der Cytochrom-P-450-Katalyse konnten dennoch aus spektroskopischen Untersuchungen des membrangebundenen Cytochroms der verschiedenen Gewebe erhalten werden. Eine Klärung vieler offener Fragen war jedoch erst nach dem Auffinden eines löslichen, cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenase-Systems aus Bakterien möglich.

### 3.1. Die Campher-5-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida*

1968 berichteten *Katagiri et al.*<sup>[61, 70]</sup> über das Vorkommen von Cytochrom P 450 in der vom Gunsaluschen Arbeitskreis<sup>[71, 72]</sup> untersuchten (+)-Campher-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida*. Dieses Enzym findet sich in hoher Konzentration in den Zellen eines auf Campher gezüchteten Stammes von *Pseudomonas putida* und ist für den ersten hydroxylierenden Schritt beim Abbau des Camphers (2) verantwortlich.



Die Stöchiometrie der Hydroxylierung erfordert 1 mol NADH<sub>2</sub> und 1 mol Sauerstoff pro mol 5-Hydroxycampher<sup>[72, 73]</sup>. Das gesamte Monooxygenase-System bestand wie das der 11 $\beta$ -Monooxygenase aus einem Flavoprotein, einem Nicht-Häm-Eisenprotein und Cytochrom P 450. Das Cytochrom war jedoch voll löslich und konnte daher rein erhalten werden<sup>[74]</sup>. Die ungewöhnlichen spektralen Eigenschaften des Cytochroms ließen sich dadurch an den Absolutspektren genau studieren (Abb. 2).

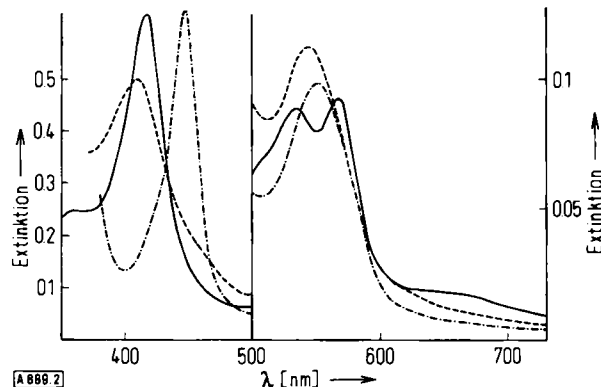


Abb. 2. Absolutspektrum des Cytochroms P 450 aus *Ps. putida* [73]. (—) oxidiertes Cytochrom, (---) reduziertes Cytochrom, (---) reduziertes Cytochrom + Kohlenmonoxid.

In Gegenwart von Sauerstoff liegt das Cytochrom nur in seiner oxidierten Form mit dreiwertigem Eisen vor, in der es eine Soret-Bande bei 417 nm mit einer ausgeprägten  $\alpha$ -Bande bei 578 nm und der  $\beta$ -Bande bei 535 nm besitzt. Unter anaeroben Bedingungen läßt es sich durch Natriumdithionit oder nach Zusatz des Flavoproteins und des Nicht-Häm-Eisens auch durch  $\text{NADH}_2$  reduzieren. Dabei wird die Soret-Bande ungewöhnlich verbreitert und kurzwellig verschoben (Maximum bei 410 nm). Im sichtbaren Spektralbereich befindet sich nur eine einzige Bande bei 540 nm. Diese Eisen(II)-Form kann Kohlenmonoxid anlagern und besitzt dann das typische Maximum bei 448 nm. Diese Reaktion konkurriert mit der Anlagerung von Sauerstoff und hemmt dadurch die Hydroxylierung des Camphers<sup>[75]</sup>.

In Anwesenheit von D-(+)-Campher zeigt sich die schon bei anderen Cytochrom-P-450-Präparationen beobachtete Änderung im Spektrum des oxidierten Cytochroms bei Zusatz von Substraten (Abb. 3).

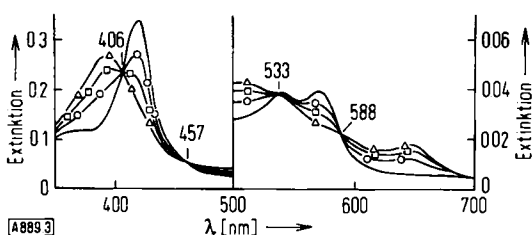


Abb. 3. Titration von Cytochrom P 450 aus *Ps. putida* mit Campher [73]. Konzentrationen: Cytochrom P 450 3,3  $\mu\text{mol/l}$ , Campher (—) 0, (—○—○—) 2  $\mu\text{mol/l}$ , (—□—□—) 6  $\mu\text{mol/l}$ , (—Δ—Δ—) 20,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Steigende Konzentrationen von (+)-Campher führen zur Ausbildung einer neuen Absorptionsbande bei 388 nm. Gleichzeitig verschwinden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden, und eine neue langwellige Absorption entsteht bei 646 nm. Die Konzentrationen an Campher, die für die vollständige Umwandlung benötigt werden, entsprechen den Sättigungskonzentrationen für die Hydroxylierungsreaktion<sup>[73]</sup>. Nur wenige Derivate des Camphers haben einen ähnlichen Effekt, und diese wirken auch nur in wesentlich höherer Konzentration. Alle Ergebnisse deuten auf die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes hin. Durch die Bindung des Substrates wird eine wesentliche Stabilisierung des Cytochroms erreicht, so daß sogar die Kristallisation des Enzym-Komplexes gelang<sup>[74]</sup>.

Die Ausbildung der langwelligen Absorption ist charakteristisch für „high-spin“-Eisen-Porphyrin-Komplexe<sup>[76]</sup>, so daß als Ursache für diese spektrale Änderung der Übergang einer „low-spin“-Form in einen „high-spin“-Komplex des dreiwertigen Cytochroms wahrscheinlich ist. Diese Annahme wurde mit Hilfe der Elektronenspin-Resonanz (EPR)<sup>[73, 77]</sup> und durch Messung der magnetischen Suszeptibilität<sup>[73]</sup> bestätigt. Das anisotrope EPR-Spektrum des oxidierten Cytochroms P 450 ist typisch für „low-spin“-Häminverbindungen, jedoch mit der Besonderheit, daß die g-Werte eng zusammenliegen. In Gegenwart von (+)-Campher verschwindet das Signal größtenteils, und es entsteht eine neue Absorption bei g = 7,9, die jedoch nur bei etwa 7°K beobachtet werden kann (Abb. 4).

Die Messung der magnetischen Suszeptibilität zeigt für diesen Übergang eine Vermehrung der Anzahl ungepaarter Elektronen an, die der Umwandlung eines Häms mit einem ungepaarten Elektron in einen Zustand mit fünf ungepaarten Elektronen entspricht<sup>[73]</sup>.

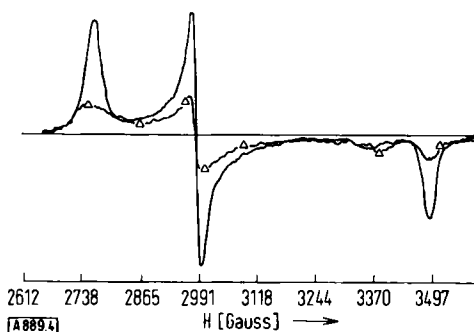
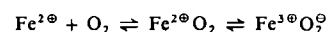


Abb. 4. EPR-Spektrum von Cytochrom P 450 aus *Ps. putida* mit (—Δ—Δ—) 5  $\mu\text{mol/l}$  und (—) ohne Campher [73]. Cytochrom P 450: 68  $\mu\text{mol/l}$ , Temperatur: -170°C.

Nach vorläufigen Ergebnissen ist mit der Spinnwandlung auch eine Potentialänderung verknüpft. Das freie Cytochrom verfügt über ein stark negatives Normalpotential bei pH = 7,0 ( $E'_0$ ) von etwa -380 mV, während nach der Bindung des Camphers der „high-spin“-Komplex ein entsprechendes Potential von etwa -170 mV aufweist<sup>[78]</sup>. Diese Potentialänderung spielt vermutlich bei der Hydroxylierung (Abschnitt 3.3) eine bedeutende Rolle.

Die Sauerstoffaktivierung beginnt mit der Anlagerung des Sauerstoffmoleküls an die reduzierte Form des Cytochroms P 450. Da das Cytochrom ein Einelektronenakceptor und -donor ist<sup>[73, 79]</sup>, sollte zunächst der Übergang von einem Elektron auf den Sauerstoff erfolgen und sich eine „Oxy-Form“ des Cytochroms ausbilden:



Ein solches Sauerstoffaddukt läßt sich beobachten, wenn die reduzierte Form des Cytochroms schnell mit Sauerstoff gemischt und sofort das Spektrum registriert wird (Abb. 5)<sup>[80, 81]</sup>.

Das „Oxy“-Cytochrom P 450 wird zu einer sehr stabilen Verbindung mit einer Halbwertszeit von 10–20 Minuten, wenn man die anschließende Weiterreduktion verhindert.

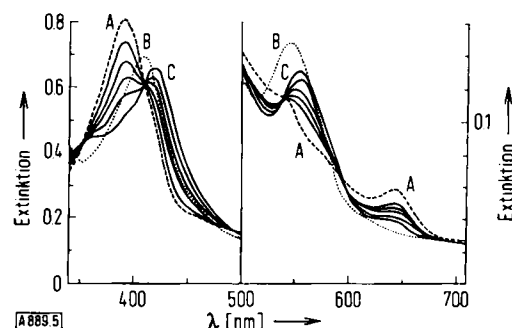
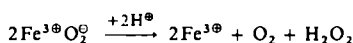


Abb. 5. Autokatalytische Zersetzung von „Oxy“-Cytochrom P 450 aus *Ps. putida* bei 5°C [81]. A (---) Cytochrom-P-450-Campher-Komplex, B (.....) reduziertes Cytochrom P 450, C (—) reduziertes Cytochrom P 450 mit Sauerstoff begast. Die Spektren wurden im Verlauf von 45 min registriert.

Als Zerfallsreaktion ist nur eine Disproportionierung möglich, bei der Wasserstoffperoxid und die „high-spin“-Form entstehen<sup>[80]</sup>:



Die Absorptionsmaxima der oxygenierten Verbindung liegen bei 418, 555 und 580 nm. Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs zeigt sie kein EPR-Spektrum, so daß diese Form ähnlich wie Oxyhämoglobin wahrscheinlich diamagnetisch ist. Der eigentliche „aktive Sauerstoff“ entsteht erst durch Reduktion des Oxy-Komplexes mit einem zweiten Elektron. Dieser Vorgang wurde bisher noch nicht untersucht, ist aber der interessanteste Schritt im Verlauf der Enzymreaktion. Mögliche Strukturen für den zu erwartenden „aktiven Sauerstoff“ werden anhand von Modelluntersuchungen in Abschnitt 4 diskutiert.

### 3.2. Die mikrosomalen Monooxygenasen der Leber

Die „Mikrosomen“-Fraktion der Leber besteht zum überwiegenden Teil aus den Resten des endoplasmatischen Reticulums. Seit etwa 1950 ist bekannt, daß diese Zellorganellen für den Abbau von Steroiden, Pharmaka und Fremdstoffen („Xenobiotica“)<sup>[82]</sup> verantwortlich sind<sup>[83]</sup>. Das in dieser Mikrosomenfraktion enthaltene Monooxygenase-System hydroxyliert eine Vielzahl organischer, lipophiler Verbindungen, die durch die Einführung der Hydroxygruppe wasserlöslich werden und damit über die Niere aus dem Organismus eliminiert werden können. Die Besonderheit der mikrosomalen Hydroxylierungen besteht in der großen Unspezifität des dafür verantwortlichen Enzymsystems. Dadurch ist der Organismus jedoch in der Lage, jede sogar völlig neu synthetisierte Verbindung auszuscheiden und damit eine Vergiftung zu vermeiden.

Mit der schon erwähnten Methode des photochemischen Wirkungsspektrums wurde gezeigt, daß die Monooxyge-

Der Einfluß von Substrat auf die spektralen Eigenschaften des oxidierten Cytochroms kann wegen der Trübung der Mikrosomenlösungen nicht anhand von Absolut-, sondern nur anhand von Differenzspektren untersucht werden. Die halbmaximale Sättigungskonzentration („K<sub>s</sub>“) für die Bindung des Substrates an das Cytochrom entspricht wie bei der Campher-Monooxygenase der Michaelis-Menten-Konstanten (K<sub>M</sub>) für die Hydroxylierung von Cyclohexan zu Cyclohexanol<sup>[86]</sup>, was auch hier auf die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes hinweist. Wie beim bakteriellen Cytochrom P 450 ist die spektrale Änderung mit dem Übergang von der „low-spin“- in die „high-spin“-Form des Cytochroms P 450 verbunden<sup>[88]</sup>. Die Tatsache, daß ein Molekül ohne funktionelle Gruppen, wie Cyclohexan, an das Cytochrom gebunden werden kann, setzt starke lipophile Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und dem aktiven Zentrum voraus. Wegen der Unspezifität dieser Bindungskräfte lag es nahe, daß auch dem Cyclohexan verwandte Kohlenwasserstoffe vom selben Cyto-

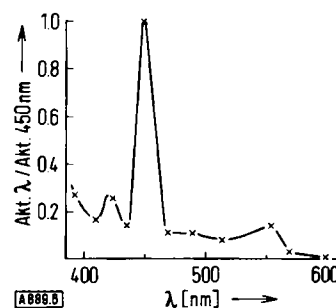


Abb. 6. Photochemisches Wirkungsspektrum der Cyclohexan-Hydroxylierung mit Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von Kohlenmonoxid [45].

chrom gebunden und umgesetzt werden. Dies konnte für die C<sub>4</sub>- bis C<sub>7</sub>-Alkane wahrscheinlich gemacht werden<sup>[46, 87]</sup>.

Eine weitere Konsequenz der unspezifischen hydrophoben Bindung ist die Vielfalt der Hydroxylierungsprodukte,

Tabelle 2. Produktverteilung bei Monooxygenierungen in Rattenlebermikrosomen.

Substrat	Produkte (% relative Ausbeute)	Bemerkungen	Lit.
Cyclohexan	Cyclohexanol (100)	Induzierbar durch Barbiturate	[86]
n-Butan	2-Butanol (<100)	Induzierbar durch Barbiturate	[87]
Isobutan	2-Methyl-2-propanol (<100)	Induzierbar durch Barbiturate	[87]
2-Methylbutan	(2-Methyl-1-butanol + 3-Methyl-1-butanol), 3-Methyl-2-butanol, 2-Methyl-2-butanol (6:20:74)	Induzierbar durch Barbiturate	[87]
Methylcyclohexan	1-, 2-, 3-, 4-Methylcyclohexanol, Hexahydrobenzylalkohol (25:8:43:23:1)	Induzierbar durch Barbiturate	[87]
Toluol	Benzylalkohol ≫ Kresole (o- : m- : p-Kresol = 59:13:28)	ω-Hydroxylierung durch Barbiturate induzierbar	[88-90]
Anisol	Phenol, 2-, 4-Hydroxyanisol (60:7:33)	O-Desalkylierung über hypothetisches α-hydroxyliertes Zwischenprodukt	[90]

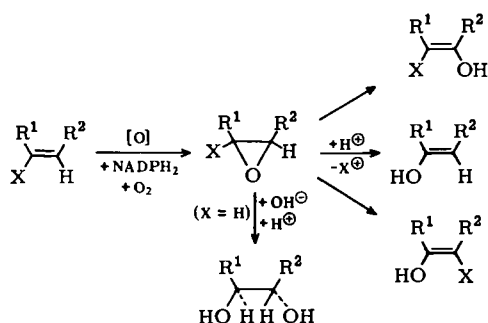
nierung von Codein, 4-Methylaminoantipyrin, Acetanilid und Testosteron durch das mikrosomale Cytochrom P 450 katalysiert wird<sup>[84]</sup>. Bevorzugte Substrate sind jedoch die aliphatischen Kohlenwasserstoffe<sup>[46, 47, 85-87]</sup>, für deren typischen Vertreter Cyclohexan das Wirkungsspektrum in Abbildung 6 dargestellt ist<sup>[45]</sup>.

unter denen fast alle der möglichen isomeren Alkohole nachgewiesen wurden<sup>[87]</sup> (Tabelle 2). Bevorzugt werden beim Angriff des aktiven Sauerstoffs immer die tertiären CH-Bindungen, gefolgt von den sekundären und primären CH-Bindungen. Der relative Angriff auf diese Bindungen beträgt für die aufgeführten Kohlenwasserstoffe etwa

150:25:1 und entspricht damit dem einer sehr selektiven Substitutionsreaktion.

Ein ganz ähnliches Ergebnis erhält man bei der Hydroxylierung mono- und disubstituierter Aromaten (Tabelle 2). Die Hydroxylierung folgt hier eindeutig den Regeln der elektrophilen aromatischen Substitution und dürfte daher über eine Addition des aktiven Sauerstoffs an das  $\pi$ -Elektronensystem verlaufen. Daß isolierte Doppelbindungen zu Epoxiden umgewandelt werden, bestätigt diese Vermutung. Bei polycyclischen Kohlenwasserstoffen, deren  $\pi$ -Bindungen teilweise Doppelbindungscharakter aufweisen, führt die Addition zu Epoxiden als Zwischenprodukte<sup>[91, 92]</sup>. Sie werden jedoch enzymatisch und auch spontan sehr rasch zu *trans*-Dihydro-diolen hydrolysiert.

Daß auch die Hydroxylierung einfacher Aromaten über Arenoxide verlaufen könnte, legt die beobachtete Substituentenwanderung zum benachbarten Kohlenstoffatom des Ringes nahe, die als „NIH-shift“ in die Literatur eingegangen ist<sup>[93]</sup>. Unter Hydroxylierung des aromatischen Kohlenstoffatoms werden nicht nur Chlor und Brom, sondern auch Tritium, Deuterium und Wasserstoff in oft hohem Ausmaß in die *ortho*-Stellung verschoben<sup>[94, 95]</sup>. Auch bei isolierten Doppelbindungen wird dieser Effekt beobachtet<sup>[96]</sup>, so daß man bei der Monooxygenierung des  $sp^2$ -hybridisierten C-Atoms auf die abgebildeten Reaktionsmöglichkeiten schließen muß.



Ist nun an allen von der Mikrosomenfraktion katalysierten Monooxygenierungen das gleiche Cytochrom P 450 beteiligt? Zu dieser wichtigen Frage gibt es eine Reihe Anhaltspunkte, die darauf hindeuten, daß tatsächlich mehrere Cytochrom-P-450-Spezies existieren, von denen jede eine gewisse Gruppenspezifität besitzt. Wichtige Hinweise dafür stammen aus pharmakologischen Untersuchungen zur Induktion des Monooxygenase-Systems der Leber<sup>[97, 98]</sup>. Die Vorbehandlung von Versuchstieren mit Pharmaka oder anderen Fremdstoffen führt zu einem Anstieg der Cytochrom-P-450-Konzentration und der Konzentration seiner Reduktase in der Mikrosomenfraktion, die eine Steigerung der spezifischen Monooxygenase-Aktivität um das Vier- bis Achtfache bedingt und die Ursache für die „Pharmakagewöhnung“ ist.

Bei diesen Induktionsversuchen zeigte es sich jedoch, daß je nach Art der verabreichten Verbindung unterschiedliche Steigerungen für die verschiedenen Substrate resultieren. Barbiturate zum Beispiel erhöhten die Monooxygenase-Aktivität gegenüber den vorwiegend aliphatischen Substraten, während Vorbehandlung mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen stark die Aktivität der Aromaten-Hydro-

xylierung steigert. Auch Unterschiede in den spektralen Eigenschaften der Cytochrome<sup>[99, 100]</sup> sowie in ihrem Hemmverhalten<sup>[47, 101, 102]</sup> sind berichtet worden.

Geringe Unterschiede bezüglich der Substrat- und Produktspezifität existieren auch innerhalb dieser beiden Gruppen<sup>[103]</sup>, so daß anstelle der bisher vermuteten völligen Unspezifität der mikrosomalen Monooxygenasen eine Gruppenspezifität angenommen werden muß.

### 3.3. Der Verlauf der Cytochrom-P-450-katalysierten Monooxygenierung

Soweit wir heute die Reaktionen am Cytochrom P 450 überblicken können, ist ihr Verlauf unabhängig von der Herkunft des Cytochroms. Die Sequenz der einzelnen Reaktionsschritte ergibt sich logisch aus den bisher erhaltenen Ergebnissen; sie ist in Abbildung 7 zusammengefaßt.

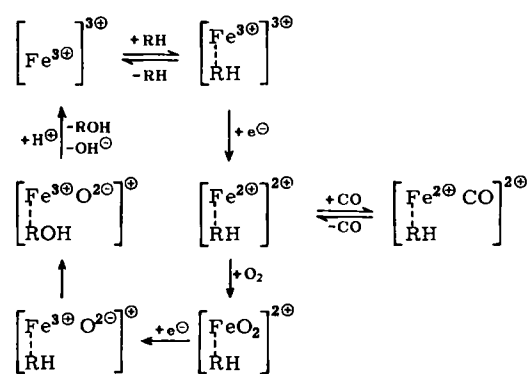


Abb. 7. Reaktionsschema zur Wirkungsweise cytochrom-P-450-abhängiger Monooxygenasen.

Wie bei jeder enzymatischen Katalyse steht am Anfang die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Die damit verbundene Konformationsänderung am Enzym ermöglicht die Spinumwandlung und führt damit zu den spektralen Verschiebungen. Dieser Vorgang verläuft mit hoher Geschwindigkeit. So beträgt z. B. die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die Bildung des Campher-Cytochrom-P-450-Komplexes bei 8°C  $3.7 \cdot 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>[104]</sup>. Die Gleichgewichtskonstante besitzt in Anwesenheit von Kalium-Ionen den folgenden Wert<sup>[73]</sup>:

$$K = \frac{[\text{E} \cdot \text{Campher}]}{[\text{E}][\text{Campher}]} = 0.47 \cdot 10^6 \text{ l mol}^{-1}$$

Neben den Dipol-Wechselwirkungen zwischen Substrat und Protein kommen vor allem die apolaren Bindungen in Betracht, die im wesentlichen für die Entropievermehrung beim Übergang des lipophilen Substrates von der wässrigen Phase in das hydrophobe Milieu des aktiven Zentrums verantwortlich sind. Durch Zusatz organischer Lösungsmittel kann das Substrat oft vollständig aus dem aktiven Zentrum verdrängt werden<sup>[105]</sup>.

Über die genaue Lokalisierung des Substrates wird erst die Röntgen-Strukturanalyse des kristallisierten Cytochrom-P-450-Campher-Komplexes<sup>[74]</sup> Auskunft geben können. Daß die Bindungsstelle des Substrates in unmittelbarer Nähe der Sauerstoffbindungsstelle, also des Eisen-Ions, liegen muß, geht aus Hemmversuchen mit Metyrapon

[2-Methyl-1,2-bis(3-pyridyl)-1-propanon]<sup>[106]</sup> hervor. Dieses Molekül bindet sich stöchiometrisch über einen Pyridin-Stickstoff an das Eisen und verhindert gleichzeitig kompetitiv die Campher-Bindung. Im reduzierten Zustand hemmt diese Verbindung auch die Anlagerung von Kohlenmonoxid, so daß die sechste Koordinationsstelle als Ort der Sauerstoffbindung besetzt sein muß<sup>[106]</sup>. Die besonderen Eigenschaften des Cytochroms P 450 lassen sich befriedigend durch den Liganden an der fünften Koordinationsstelle erklären, bei dem es sich wahrscheinlich um die SH-Gruppe eines Cysteins handelt<sup>[107]</sup>. Als Beweis dient neben der Reaktivierung des Cytochroms P 420 zu Cytochrom P 450 durch Cystein<sup>[108]</sup> vor allem das ungewöhnliche EPR-Spektrum, das sehr genau in einem Modell aus Myoglobin und Alkylthiolen simuliert werden konnte (Abb. 8)<sup>[109]</sup>.



Abb. 8. EPR-Spektren von Rattenlebermikrosomen (unten) und dem Metmyoglobin-Butanthiol-Komplex (oben) bei  $-170^{\circ}\text{C}$  [109a].

Der Schwefel als „weicher“ Ligand<sup>[110]</sup> könnte gut für das stark negative Potential des Cytochroms verantwortlich sein.

Noch unklar sind die Einzelheiten der Spinumkehr bei der Bindung des Substrates. Es wird angenommen<sup>[73, 77, 111]</sup>, daß durch das Substrat ein Histidinrest von der sechsten Koordinationsstelle verdrängt und dadurch die Ausbildung des „high-spin“-Komplexes ermöglicht wird. In diesem Fall könnte der gesamte Vorgang der Substratverbindung so verlaufen, wie es in der hypothetischen Abbildung 9 dargestellt ist.

Als nächster Schritt der Reaktion muß ein Elektron auf das Cytochrom übertragen werden. Für das mikrosomale Cytochrom P 450 läßt sich zeigen, daß der Cytochrom-Substrat-Komplex um eine Größenordnung schneller als das freie Cytochrom reduziert wird<sup>[112]</sup>. Dadurch wird der Elektronentransport mit der Anwesenheit des Substrates im aktiven Zentrum gekoppelt und eine „Leeroxi-

dation“ des Wasserstoffdonors vermieden. Dieser Reduktionsschritt verläuft relativ langsam; er ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei den durch Monooxygenasen katalysierten Reaktionen<sup>[112, 113]</sup>. An den reduzierten Enzym-Substrat-Komplex lagert sich das Sauerstoffmolekül zur Oxy-Form an, aus der es durch Kohlenmonoxid wieder verdrängt werden kann.

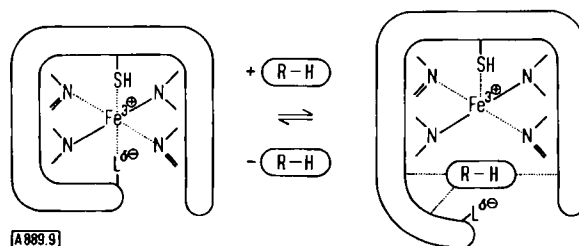


Abb. 9. Hypothetisches Schema zur Substratbindung an Cytochrom P 450. Links: „low-spin“-Komplex, Potential  $-380\text{ mV}$ , Soret-Bande bei  $418\text{ nm}$ ; rechts: „high-spin“-Komplex, Potential ca.  $-170\text{ mV}$ , Soret-Bande bei  $390\text{ nm}$ .

Die eigentliche aktive Form des Sauerstoffs entsteht aus dem Oxy-Komplex durch die Übertragung eines weiteren Elektrons. Dies folgt zunächst aus der Stöchiometrie der Monooxygenasen und aus den in Abschnitt 4 zu besprechenden Modellreaktionen. Als experimenteller Beweis können die Befunde von Cooper<sup>[114]</sup> angesehen werden, die zeigen, daß das Cytochrom P 450 der  $11\beta$ -Hydroxylase nach stöchiometrischer Reduktion und anschließender Sauerstoffzugabe nicht zur Hydroxylierung von Desoxycorticosteron in der Lage ist. Erst der Zusatz von reduziertem Nicht-Häm-Eisenprotein (Adrenodoxin) führt zur  $11\beta$ -Hydroxylierung des Substrates.

Über die Geschwindigkeit dieses zweiten Reduktionsschrittes liegen noch keine Messungen vor. Die Beobachtung, daß in Mikrosomen im stationären Zustand der Hydroxylierung die Oxy-Form des Cytochroms nachzuweisen ist<sup>[115, 116]</sup>, läßt eine relativ langsame Reduktion vermuten, die jedoch nicht langsamer als der erste Elektronenübergang sein kann.

Die Struktur des aktiven Sauerstoffs am Cytochrom P 450 ist noch völlig unbekannt; in Abbildung 7 ist zunächst nur formal ein Peroxid-Komplex angegeben. Die eigentliche Monooxygenierung des Substrates beim Übergang eines Sauerstoffatoms erfolgt wahrscheinlich schnell. Sie ist wahrscheinlich nicht geschwindigkeitsbestimmend, wie das Fehlen eines Isotopeneffektes bei der Cyclohexan-Hydroxylierung in Mikrosomen beweist<sup>[86]</sup>.

Nach der Aufnahme eines Protons kann sich das zur Oxidationsstufe des Wassers reduzierte zweite Sauerstoffatom vom Cytochrom P 450 ablösen und es dadurch erneut zur Bindung des nächsten Substratmoleküls freisetzen.

Eine besondere Situation ergibt sich, wenn eine Verbindung zwar die Substratbindung eingehen kann, aber keine hydroxylierbare Position enthält. Dieser Fall trifft besonders für das mikrosomale Cytochrom P 450 zu, dessen Substrate schon allein aufgrund ihrer Fettlöslichkeit gebunden werden können. So können z. B. perfluorierte Kohlenwasserstoffe ebenso gut wie die entsprechenden Alkane den Enzym-Substrat-Komplex bilden, werden aber wegen der Stabilität

der CF-Bindung nicht hydroxyliert<sup>[117]</sup>. In diesem Fall kommt es zur Weiterreduktion des aktiven Sauerstoffs zu Wasser; das System wird also „entkoppelt“. Diese Erscheinung ist beim unspezifischen Monooxygenase-System häufig anzutreffen.

#### 4. Modelluntersuchungen zur Sauerstoffaktivierung durch Monooxygenasen

Wie bei vielen enzymatischen Reaktionen ist auch bei denen der Monooxygenasen die direkte Untersuchung des Übergangszustandes noch nicht möglich. In solchen Fällen bietet sich das Studium von Modellreaktionen an, wobei jedoch auf die Probleme hingewiesen werden muß, die sich aus der Übertragung von Ergebnissen an Modellen auf enzymatische Reaktionen ergeben. Gerade bei den Monooxygenase-Modellen muß wegen der Vielfalt der Sauerstoffreaktionen die Übereinstimmung von Enzym- und Modellreaktionen immer wieder überprüft werden.

Wesentlich ist, daß jedes Modell die Stöchiometrie der Monooxygenierung von zwei Elektronen pro mol Sauerstoff und hydroxyliertes Produkt erfüllen muß. Eine Nachprüfung dieser Stöchiometrie an Modellhydroxylierungen gestaltet sich immer schwierig, weil nur das Enzym durch Konformationsänderungen im Protein die Möglichkeit hat, die Reduktion und Aktivierung des Sauerstoffs mit der Hydroxylierung des Substrates zu koppeln. Bei allen bisher bekannten Modellen findet gleichzeitig und sogar überwiegend neben der Hydroxylierung auch die Weiterreduktion des Sauerstoffs zu Wasser statt.

Die Verteilung der Produkte bei der enzymatischen Katalyse liefert im allgemeinen wegen der hohen Spezifität der Reaktionen nur wenig Hinweise auf den Übergangszustand. Im Falle der mikrosomalen Monooxygenasen der Leber handelt es sich jedoch um ein weitgehend unspezifisches Enzymsystem, das, wie Tabelle 2 zeigt, aliphatische Verbindungen selektiv und Aromaten elektrophil hydroxyliert. Ein weiteres Kennzeichen ist die Epoxidbildung und die Wanderung des aromatischen Substituenten in *ortho*-Stellung, die damit die chemischen Eigenschaften des „aktiven Sauerstoffs“ schon weitgehend charakterisieren. Ähnliche Angriffe von CH-Bindungen und Additionen an  $\pi$ -Elektronensysteme sind auch von Carbenen oder Carbenoiden<sup>[118]</sup> bekanntgeworden. Es liegt daher nahe, für den aktiven Sauerstoff eine „oxenoid“ Struktur anzunehmen<sup>[119, 120]</sup>, womit ein Angriff des Sauerstoffs als elektrophiles Teilchen mit sechs Valenzelektronen definiert sein soll<sup>[121]</sup>.

##### 4.1. Oxenoid Reaktionen

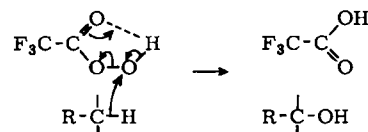
Die Stöchiometrie der Monooxygenase-Reaktionen läßt vermuten, daß der aktive Sauerstoff die Oxidationsstufe des Peroxids oder die des Sauerstoffatoms besitzt. Wasserstoffperoxid selbst ist ein zu schwaches Oxidationsmittel, um für die beobachteten Hydroxylierungen verantwortlich zu sein. In dem Maße aber, in dem die O—O-Bindung durch Substitution polarisiert wird, steigt auch ihr Oxidationspotential an. Perbenzoesäure oder Peressigsäure

sind noch relativ schwache Oxidantien, die aber schon die Bildung von Epoxiden ermöglichen<sup>[122]</sup>. Wesentlich stärker ist die Trichlorperessigsäure, und die stärkste polarisierende Wirkung wird durch die Trifluormethylgruppe erreicht<sup>[123]</sup>. Tabelle 3 enthält die Oxidationsprodukte einiger Verbindungen, die mit Trifluorperessigsäure umgesetzt wurden.

Tabelle 3. Hydroxylierungen mit Trifluorperessigsäure.

Verbindung	Produkte (% relative Ausbeute)	Lit.
2-Methylbutan	(2-Methyl-1-butanol + 3-Methyl-1-Butanol), 3-Methyl-2-butanol, 2-Methyl-2-butanol (1.7:5.8:92.5)	[124]
Methylcyclohexan	1-, 2-, 3-, 4-Methylcyclohexanol, Hexahydrobenzylalkohol (88.7:3.4:3.6:4.2:0.2)	[124]
[4-D]-Toluol	4-Methylphenol, [2-D]-4-Methylphenol (32:68)	[125]
Acetanilid	2-, 3-, 4-Hydroxy-acetanilid (43:1:56)	[44]
4-Bromacetanilid	2-, 3-Hydroxy-4-bromacetanilid, 4-Hydroxy-3-bromacetanilid, 4-Hydroxy-acetanilid (41:5:45:9)	[44]

Die wesentlichsten Charakteristika der enzymatischen Reaktionen – Selektivität, Elektrophilie und Substituentenwanderung – finden sich auch bei den Oxidationen mit Trifluorperessigsäure, die am besten durch Annahme einer Mehrzentrenreaktion gedeutet werden<sup>[123, 125, 126]</sup>.



Damit steht auch der beobachtete Isotopeneffekt von 2.9 bei der Hydroxylierung von Cyclohexan und Perdeuteriocyclohexan in Einklang<sup>[86]</sup>. Aromatische Verbindungen zeigen bei ihrer Hydroxylierung keinen Isotopeneffekt, da die Rearomatisierung des Zwischenproduktes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist<sup>[86]</sup>. Für das Auftreten eines Hydroxyl-Kations ( $\text{OH}^+$ ) konnte aus Isotopenexperimenten kein Anhalt gefunden werden<sup>[125, 127]</sup>.

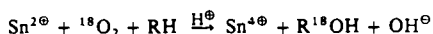
##### 4.2. Modellhydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff

Wenn auch ein oxenoider Reaktionsverlauf für die Monooxygenasen sehr wahrscheinlich ist, so bleibt zunächst offen, wie ein solches Peroxid aus molekularem Sauerstoff entstehen kann und ob sich die Umsetzung einer Säure in fast wasserfreiem Medium mit einer Enzymreaktion in wäßrigem Milieu vergleichen läßt.

Das erste Hydroxylase-Modell mit molekularem Sauerstoff wurde von Udenfriend et al.<sup>[128, 129]</sup> vorgeschlagen. Es bestand aus dem Eisen(II)-Äthylendiamintetraessigsäure-Komplex und Ascorbinsäure und katalysierte unter Einbau von molekularem Sauerstoff bei pH = 7 die elektrophile Hydroxylierung aromatischer Verbindungen. Breslow und Lukens<sup>[130]</sup> wiesen jedoch nach, daß dieses System nur ein modifiziertes Fenton-Reagens ist, welches über intermediär auftretendes Wasserstoffperoxid OH-Radikale

liefert. Diese Radikale bilden jedoch keine Epoxide und Alkohole, zeigen auch keine Substituentenwanderung und müssen daher als Modell für den aktiven Sauerstoff ausgeschlossen werden<sup>[120]</sup>.

Das „Udenfriend-System“ konnte in darauffolgenden Untersuchungen sehr vereinfacht werden, indem Ascorbinsäure durch andere Reduktionsmittel und der Eisenkomplex durch weitere autoxidable Metallkomplexe des Eisen(II)-, Kupfer(I)-, Titan(III)-, Vanadin(III)- und Zinn(II)-Ions ersetzt werden konnte. Diese Hydroxylierungssysteme enthalten neben den OH-Radikalen eindeutig noch eine weitere Form des aktiven Sauerstoffs, die wesentlich reaktionsfähiger ist und auch Aliphaten unter Hydroxylierung angreift. Diese neue Hydroxylierungsreaktion ließ sich am besten bei der Sauerstoffreduktion mit Zinn(II)-phosphat-Komplexen beobachten, da hier Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt sofort zu Wasser reduziert wurde, ohne daß OH-Radikale auftreten können<sup>[131]</sup>. Der Sauerstoff der eingeführten Hydroxygruppe stammte ausschließlich aus der Gasphase, und auch die Stöchiometrie erfüllte die Bedingung der enzymatischen Reaktionen<sup>[131]</sup>:



Allerdings erfolgte der Angriff der unbekannten, aktiven Form des Sauerstoffs unselektiv und fast statistisch an allen vorhandenen CH-Bindungen<sup>[131, 132]</sup>.

Diese erhöhte Reaktivität im Vergleich zum postulierten „oxenoiden“ Komplex der Monooxygenasen könnte durch eine geringere Stabilisierung des aktiven Sauerstoffs am Zinn(IV)-Ion hervorgerufen sein. Um die Modelle weiter den enzymatischen Reaktionen anzugleichen, wurden Eisen(II)-Chelate untersucht, die den für das Cytochrom P 450 charakteristischen Thiol-Liganden enthielten. Die schlechte Wasserlöslichkeit der organischen Chelatbildner zwang dazu, in organischer Phase zu arbeiten.

Ein hydroxylierendes System mit neuen Eigenschaften wurde im Eisen(II)-2-Mercaptobenzoessäure-Komplex und Aceton als Lösungsmittel gefunden. Unter Reduktion des molekularen Sauerstoffs hydroxyliert dieses System in guten Ausbeuten nicht nur Aromaten nach einem elektrophilen Mechanismus, sondern auch selektiv aliphatische Verbindungen<sup>[124]</sup>. Nicht gebildet werden jedoch Epoxide, und auch die charakteristische Substituentenwanderung läßt sich nicht nachweisen. Inwieweit dieses System als Modell für die Hydroxylierung dienen kann, steht daher noch nicht fest.

Wesentlich für die Weiterentwicklung der Modellreaktionen kann aber die Verwendung organischer Lösungsmittel sein, da sie sicher eher den Verhältnissen im aktiven Zentrum der Monooxygenase entsprechen als wäßrige Lösungen. Die Chemie und Thermodynamik der Sauerstoffre-

duktion durch Metallkomplexe in nichtwäßrigen Lösungen muß jedoch erst noch näher untersucht werden. Es ist aber denkbar, daß sich unter Umgehung der wäßrigen Phase auch die Protonierung der  $\text{O}_2^-$ -Zwischenstufe vermeiden läßt, wodurch bisher in den Modellreaktionen die Ausbeute vermindert wird.

## 5. Ausblick

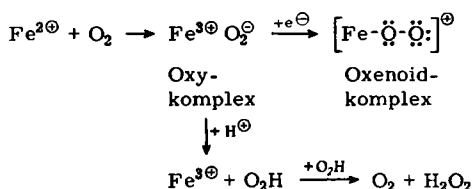
Diese Übersicht mußte sich aus Gründen der Anschaulichkeit auf die exemplarische Besprechung der cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen beschränken. Aber auch von den kupfer-<sup>[31, 32]</sup> und flavinhaltigen Enzymen<sup>[50–52]</sup> sind einige Vertreter gut untersucht und auch in zusammenfassenden Arbeiten aufgeführt worden<sup>[8, 13, 15, 52, 95, 121, 133, 134]</sup>. Gemeinsam scheint allen Monooxygenasen der oxenoid Mechanismus zu sein. Die notwendige Kopplung von Sauerstoffreduktion und Monooxygenierung wird offensichtlich immer durch die substratinduzierte Konformationsumwandlung der terminalen Oxidase erreicht.

Da die Spinumkehr beim Cytochrom P 450 nach der Substratbindung leicht optisch und über die Elektronenspin-Resonanz verfolgt werden kann, verspricht dieses Cytochrom ein geeignetes Modell für das Studium der Enzym-Substrat-Komplexe zu werden. Auch für die direkte Verfolgung der Sauerstoffaktivierung im Übergangszustand, für die allerdings noch keine geeigneten Meßmethoden zur Verfügung stehen, bietet das Cytochrom P 450 gute Erfolgsaussichten. Alle dazu bisher herangezogenen Modellreaktionen weisen den Nachteil auf, daß die Sauerstoffreduktion bei homogener Katalyse nicht auf der Stufe des aktiven Peroxids stehenbleibt, sondern überwiegend unter Wasserbildung weiterverläuft.

Es ist sogar denkbar, daß die enzymatischen Monooxygenierungen in Zukunft als Modelle für chemische Hydroxylierungsprozesse dienen können. Auch unter diesem Aspekt erscheint ein weiteres Studium der Monooxygenasen lohnend, da die spezifische Einführung von Hydroxygruppen in organische Verbindungen zweifellos ein wichtiges Anliegen der präparativen Chemie ist und sogar technisch wegen der billigen Reaktionspartner – Sauerstoff und elektrische Energie – interessant ist.

*Den bei den eigenen Ergebnissen erwähnten Mitarbeitern möchte ich für ihre Zusammenarbeit herzlich danken, ebenso der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 38) und der Stiftung Volkswagenwerk für die gewährte finanzielle Unterstützung. Viele wertvolle Hinweise und Diskussionsbeiträge entstanden aus der Zusammenarbeit mit den Herren Prof. Dr. R. W. Estabrook, Prof. Dr. D. Y. Cooper und Dr. J. A. Peterson. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hj. Staudinger für viele gemeinsam durchgeführte Untersuchungen und die langjährige Unterstützung meiner Arbeiten.*

Eingegangen am 26. Mai 1971 [A 889]



[1] P. George in T. King, H. S. Mason u. M. Morrison: Oxidases and Related Redox Systems. Wiley, New York 1965.

[2] M. Traube, Ber. dtsch. chem. Ges. 15, 666 (1882).

[3] C. Engler u. W. Wild, Ber. dtsch. chem. Ges. 30, 1669 (1897).

[4] A. Bach, Chem.-Ztg. 398, 436 (1897).

- [5] O. Warburg: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. 2. Aufl., Cantor, Freiburg 1949.
- [6] M. Zerner, M. Gouterman u. H. Kobayashi, Theor. Chim. Acta 6, 303 (1966).
- [7] J. B. Wittenberg, B. A. Wittenberg, J. Peisach u. W. E. Blumberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1846 (1970).
- [8] H. S. Mason, W. Fowlks u. E. Peterson, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2914 (1955).
- [9] H. S. Mason, Advan. Enzymol. 19, 79 (1957).
- [10] A. White, P. Handler u. E. L. Smith: Principles of Biochemistry. McGraw-Hill, New York 1968, S. 378.
- [11] A. L. Hunt, D. E. Hughes u. J. M. Lowenstein, Biochem. J. 69, 170 (1958).
- [12] O. Hayaishi, Proceedings of the Plenary Sessions, Vol. 33, S. 31. Sixth Int. Congr. Biochemistry, New York City, 1964, J. U. B.
- [13] O. Hayaishi in O. Hayaishi: Oxygenases. Academic Press, New York 1962.
- [14] J. Someya, T. Murakami, N. Tagaya, N. Futai u. Y. Sonoda, J. Ferment. Technol. 48, 291 (1970).
- [15] R. Abraham, E. Balke, K. Krisch, S. Leonhäuser, K. Leybold, K. A. Sack u. H. J. Staudinger in Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Aufl., Bd. VI/A, Springer, Berlin 1964, S. 917.
- [16] J. Willett, K. Sharpless, K. Lord, E. van Tameln u. R. Clayton, J. Biol. Chem. 242, 4182 (1967).
- [17] T. Scallen, W. Dean u. M. Schuster, J. Biol. Chem. 243, 5202 (1968).
- [18] M. L. Sweat u. M. D. Lipscomb, J. Amer. Chem. Soc. 77, 5185 (1955).
- [19] T. Omura, E. Sanders, R. W. Estabrook, D. Y. Cooper u. O. Rosenthal, Arch. Biochem. Biophys. 117, 660 (1966).
- [20] W. Cammer, D. Y. Cooper u. R. W. Estabrook in K. W. McKerns: Functions of the Adrenal Cortex. Appleton-Century-Crofts, New York 1968.
- [21] K. J. Ryan u. L. L. Engel, J. Biol. Chem. 225, 103 (1957).
- [22] D. Y. Cooper, S. Narasimhulu, O. Rosenthal u. R. W. Estabrook in K. W. McKerns: Function of the Adrenal Cortex. Appleton-Century-Crofts, New York 1968.
- [23] E. R. Simpson u. G. S. Boyd, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 10 (1966).
- [24] E. R. Simpson u. G. S. Boyd, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 945 (1967).
- [25] A. H. Conney u. A. Klutch, J. Biol. Chem. 238, 1611 (1963).
- [26] B. P. Lisboa u. J.-A. Gustafsson, Eur. J. Biochem. 6, 419 (1968).
- [27] K. Leybold u. H. J. Staudinger, Biochem. Z. 331, 399 (1959).
- [28] R. Abraham u. H. J. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346, 198 (1966).
- [29] H. Okamoto u. O. Hayaishi, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 394 (1967).
- [30] U. Horn, V. Ullrich u. H. J. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck.
- [31] S. Friedman u. S. Kaufman, J. Biol. Chem. 240, 763 (1965).
- [32] M. Goldstein, T. H. Joh u. T. Q. Garvey, Biochemistry 7, 2724 (1968).
- [33] B. N. La Du u. V. G. Zannoni, Nature 177, 574 (1956).
- [34] B. N. La Du u. V. G. Zannoni, J. Biol. Chem. 217, 777 (1955).
- [35] S. Kaufman, J. Biol. Chem. 234, 2677 (1959).
- [36] S. Kaufman in O. Hayaishi: Oxygenases. Academic Press, New York 1962, S. 129.
- [37] S. Udenfriend, Science 152, 1335 (1966).
- [38] B. Peterkowsky u. S. Udenfriend, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 335 (1963).
- [39] R. Tenhunen, H. S. Marver u. R. Schmidt, J. Biol. Chem. 244, 6388 (1969).
- [40] B. Preiss u. K. Bloch, J. Biol. Chem. 239, 85 (1964).
- [41] M. L. Das, S. Orrenius u. L. Ernster, Eur. J. Biochem. 4, 519 (1968).
- [42] A. Y. H. Lu u. M. J. Coon, J. Biol. Chem. 239, 1331 (1968).
- [43] C. Mitoma, H. S. Posner, H. C. Reitz u. S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophys. 61, 431 (1956).
- [44] V. Ullrich, J. Wolf, E. Amadori u. H. J. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 85 (1968).
- [45] H. Diehl, S. Capalna u. V. Ullrich, FEBS-Lett. 4, 99 (1969).
- [46] U. Frommer, V. Ullrich u. H. J. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 903 (1970).
- [47] K. Ichihara, E. Kusunose u. M. Kusunose, Biochem. Biophys. Acta 176, 713 (1969).
- [48] H. R. Mahler u. E. H. Cordes: Biological Chemistry. Harper & Row, New York 1967, S. 316.
- [49] E. Bayer u. P. Schretzmann, Structure and Bonding 2, 181.
- [50] M. Katagiri, S. Takemori, K. Suzuki u. H. Yasuda, J. Biol. Chem. 241, 5675 (1966).
- [51] K. Hosokawa u. R. Y. Stanier, J. Biol. Chem. 241, 2453 (1966).
- [52] O. Hayaishi, Annu. Rev. Biochem. 38, 21 (1969).
- [53] H. Sund, H. Diekmann u. K. Wallenfels, Advan. Enzymol. 26, 115 (1964).
- [54] M. Klingenberg, Arch. Biochem. Biophys. 75, 376 (1958).
- [55] D. Garfinkel, Arch. Biochem. Biophys. 77, 493 (1958).
- [56] R. W. Estabrook, D. Y. Cooper u. O. Rosenthal, Biochem. Z. 338, 741 (1963).
- [57] S. E. Lewis, C. F. Wilkinson u. J. W. Ray, Biochem. Pharmacol. 16, 1195 (1967).
- [58] A. Lindenmayer u. L. Smith, Biochim. Biophys. Acta 93, 445 (1964).
- [59] J.-M. Lebeault, E. T. Lode u. M. J. Coon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 413 (1971).
- [60] C. A. Appleby, Biochim. Biophys. Acta 172, 71 (1969).
- [61] M. Katagiri, B. N. Ganguli u. I. C. Gunsalus, Fed. Proc. 27, 525 (1968).
- [62] G. Gardini u. P. Jurtshuk, J. Biol. Chem. 245, 2789 (1970).
- [63] B. Chance in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1957, Bd. 4, S. 273.
- [64] T. Omura u. R. Sato, J. Biol. Chem. 239, 2370 (1964).
- [65] T. Omura u. R. Sato, J. Biol. Chem. 239, 2379 (1964).
- [66] J. B. Schenkman, H. Remener u. R. W. Estabrook, Mol. Pharmacol. 3, 113 (1967).
- [67] E. Sanders, R. W. Estabrook, D. Y. Cooper u. O. Rosenthal, Arch. Biochem. Biophys. 117, 660 (1966).
- [68] T. Kimura u. K. Suzuki, J. Biol. Chem. 242, 485 (1967).
- [69] D. Y. Cooper, S. Narasimhulu, A. Slade, W. Raich, O. Foroff u. O. Rosenthal, Life Sci. 4, 2109 (1965).
- [70] M. Katagiri, B. N. Ganguli u. I. C. Gunsalus, J. Biol. Chem. 243, 3543 (1968).
- [71] J. Hedegaard u. I. C. Gunsalus, J. Biol. Chem. 240, 4038 (1965).
- [72] H. E. Conrad, K. Lieb u. I. C. Gunsalus, J. Biol. Chem. 240, 4029 (1965).
- [73] J. A. Peterson, Arch. Biochem. Biophys. 144, 678 (1971).
- [74] C.-A. Yu u. I. C. Gunsalus, Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1431 (1970).
- [75] J. A. Peterson, unveröffentlicht.
- [76] A. S. Brill u. R. J. P. Williams, Biochem. J. 78, 246 (1961).
- [77] J. Peisach u. W. E. Blumberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 172 (1970).
- [78] J. A. Peterson, persönliche Mitteilung.
- [79] V. Ullrich, B. Cohen, D. Y. Cooper u. R. W. Estabrook in K. Okunuki, M. D. Kamen u. I. Sekuzu: Structure and Function of Cytochromes. University Park Press, Baltimore, Md. 1968, S. 649.
- [80] I. C. Gunsalus: Wenner-Gren Symposium on Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes. Stockholm, August 1970.
- [81] Y. Ishimura, V. Ullrich u. J. A. Peterson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 140 (1971).
- [82] A. S. Mason, J. C. North u. M. Vanneste, Fed. Proc. 24, 1172 (1965).
- [83] B. B. Brodie, J. Axelrod, Y. R. Cooper, L. Gaudette, B. N. La Du, C. Mitoma u. S. Udenfriend, Science 121, 603 (1955).
- [84] D. Y. Cooper, S. Levin, S. Narasimhulu, O. Rosenthal u. R. W. Estabrook, Science 147, 400 (1965).
- [85] M. P. Mitchell u. G. Hübscher, Biochem. J. 103, 23 P (1967).
- [86] V. Ullrich, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 357 (1969).
- [87] U. Frommer, V. Ullrich u. H. J. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 913 (1970).
- [88] M. Waterman, V. Ullrich u. R. W. Estabrook, unveröffentlicht.
- [89] V. Ullrich, Z. Naturforsch. 24b, 699 (1969).
- [90] V. Ullrich, unveröffentlicht.
- [91] D. M. Jerina, J. W. Daly, B. Witkop, P. Zaltzman-Nirenberg u. S. Udenfriend, Biochemistry 9, 147 (1970).
- [92] B. M. Bloom u. G. M. Shull, J. Amer. Chem. Soc. 77, 5767 (1955).
- [93] G. Guroff, J. W. Daly, D. M. Jerina, J. Renson, B. Witkop u. S. Udenfriend, Science 158, 1524 (1967).

- [94] J. W. Daly, G. Guroff, D. M. Jerina, S. Udenfriend u. B. Witkop, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 1000 (1968).
- [95] L. Nover, Pharmazie 7, 361 (1969).
- [96] K. H. Byington u. K. C. Leibman, Mol. Pharmacol. 1, 247 (1965).
- [97] H. Renner, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 235, 279 (1959).
- [98] A. H. Conney u. J. J. Burns, Nature 184, 363 (1959).
- [99] A. P. Alvares, G. Schilling, W. Levin u. R. Kuntzman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 521 (1967).
- [100] A. Hildebrandt, H. Remmer u. R. W. Estabrook, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 607 (1968).
- [101] Y. Imai u. R. Sato, Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 80 (1966).
- [102] K. Ichihara, E. Kusunose u. M. Kusunose, Biochim. Biophys. Acta 176, 704 (1969).
- [103] W. Bohn, V. Ullrich, u. H. Staudinger, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., im Druck.
- [104] J. A. Peterson u. B. Griffin, Fed. Proc. 30, 1143 (1971).
- [105] V. Ullrich, J. A. Peterson u. M. Waterman, noch unveröffentlicht.
- [106] J. A. Peterson, V. Ullrich u. A. Hildebrandt, Arch. Biochem. Biophys. 145, 531 (1971).
- [107] H. A. O. Hill, A. Röder u. R. J. P. Williams, Structure and Bonding 8, 123 (1970).
- [108] I. C. Gunsalus, Symposium on Cytochrome P 450, Philadelphia, März 1970.
- [109] C. R. E. Jefcoate u. F. C. Gaylor, Biochemistry 8, 3464 (1969).
- [109a] H. H. Ruf u. V. Ullrich, unveröffentlicht.
- [110] Ch. K. Jørgensen, Z. Naturwiss.-Med. Grundlagenforsch. 2, 248 (1965).
- [111] Y. Ichikawa, B. Hagihara, K. Mori u. T. Yamano in K. Bloch u. O. Hayaishi: Biological and Chemical Aspects of Oxygenases. Maruzen, Tokyo 1966, S. 211.
- [112] H. Diehl, J. Schädlein u. V. Ullrich, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 1359 (1970).
- [113] P. L. Gigon, T. E. Gram u. J. R. Gillette, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, (1968).
- [114] D. Y. Cooper, Int. Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Tübingen, Juli 1969.
- [115] R. W. Estabrook, A. Hildebrandt u. V. Ullrich, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 1605 (1968).
- [116] R. W. Estabrook, A. G. Hildebrandt, J. Baron, K. J. Netter u. K. Leibman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 132 (1971).
- [117] V. Ullrich u. H. Diehl, Eur. J. Biochem. 20, 509 (1971).
- [118] W. Kirmse: Carbene, Carbenoide und Carbenanaloge. Verlag Chemie, Weinheim 1969.
- [119] G. A. Hamilton, J. Amer. Chem. Soc. 86, 339 (1964).
- [120] V. Ullrich u. H. Staudinger in K. Bloch u. O. Hayaishi: Biological and Chemical Aspects of Oxygenases. Maruzen, Tokyo 1966, S. 235.
- [121] S. K. Erickson, J. Schädlein, U. Schmeling, H.-H. Schott, V. Ullrich u. H. Staudinger in S. Patai: The Chemistry of the Hydroxyl Group. Interscience, New York 1971, S. 755.
- [122] N. Prileschajew, Ber. dtsch. chem. Ges. 42, 4811 (1909).
- [123] K. M. Ibne-Rasa u. J. O. Edwards, J. Amer. Chem. Soc. 84, 763 (1962).
- [124] U. Frommer u. V. Ullrich, Z. Naturforsch., im Druck.
- [125] D. M. Jerina, J. W. Daly u. B. Witkop, Biochemistry 10, 366 (1971).
- [126] P. O. Bartlett, Rec. Chem. Progr. 11, 47 (1950).
- [127] A. G. Davies: Organic Peroxides. Butterworths, London 1961, S. 128.
- [128] S. Udenfriend, G. T. Clark, J. Axelrod u. B. B. Brodie, J. Biol. Chem. 208, 731 (1954).
- [129] B. B. Brodie, J. Axelrod, P. A. Shore u. S. Udenfriend, J. Biol. Chem. 208, 741 (1954).
- [130] R. Breslow u. L. N. Lukens, J. Biol. Chem. 235, 292 (1960).
- [131] V. Ullrich u. H. Staudinger, Z. Naturforsch. 24b, 583 (1969).
- [132] V. Ullrich u. H. Staudinger in B. Hess u. H. Staudinger: Biochemie des Sauerstoffs. Springer, Berlin 1969, S. 229.
- [133] S. Kaufman, Pharmacol. Rev. 18, 61 (1966).
- [134] O. Hayaishi, Y. Ishimura, T. Nakazawa u. M. Nozaki in B. Hess u. H. Staudinger: Biochemie des Sauerstoffs. Springer, Berlin 1969, S. 196.